

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**OBTENÇÃO E SEPARAÇÃO DE POLIFENÓIS DE SEMENTES DE
CACAU POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA ASSOCIADA A
MEMBRANAS.**

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan

Co-orientador: Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus

LUIZ ALBERTO VIEIRA SARMENTO

Florianópolis – 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**OBTENÇÃO E SEPARAÇÃO DE POLIFENÓIS DE SEMENTES DE
CACAU POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA ASSOCIADA A
MEMBRANAS.**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Engenharia Química como
requisito final para obtenção do Grau de Doutor
em Engenharia Química.**

Orientador: Prof. Dr. Ariovaldo Bolzan

Co-orientador: Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus

LUIZ ALBERTO VIEIRA SARMENTO

Florianópolis 2007

Agradecimentos

Aos professores Dr. Ariovado Bonzan, Dr. José Carlos Cunha Petrus e Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado pela orientação e colaboração com a realização desta tese.

A banca examinadora pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

A empresa Joanes Industrial S/A – Produtos Químicos e Vegetais – ADM Cocoa, pela doação das amostras de sementes de cacau.

A empresa Duas Rodas Industrial Ltda, pela doação de amostras de sementes de cacau e realização das análises cromatográficas da matéria-prima utilizada nos experimentos e dos extratos obtidos nas extrações e separações.

A aluna Thaisa Tamanini pela colaboração em todos os experimentos realizados ao longo do desenvolvimento desta tese.

Aos amigos do Laboratório de Controle de Processos (LCP), especialmente aos colegas da extração supercrítica.

Aos meus filhos e esposa pela compreensão e carinho.

A UTFPR pela liberação das minhas atividades.

RESUMO

Os antioxidantes são alguns dos mais importantes ingredientes que devem estar disponíveis em alimentos funcionais e fazer parte da dieta das pessoas. Dentre os antioxidantes, os fenólicos e os tocoferóis constituem-se numa categoria de compostos comumente presentes em uma grande variedade de alimentos naturais, assim como é importante que estejam presentes em produtos alimentares sintéticos. No centro das atenções, encontra-se um grupo de compostos polifenólicos denominados flavonóides. Os flavonóides, aos quais foi dado maior importância neste trabalho são constituídos de três subgrupos: catequinas, epicatequinas e procianidinas. Pesquisas recentes têm mostrado que em plantas como cacau *Theobroma cacao* L encontra-se uma grande quantidade de polifenóis em suas folhas e principalmente em suas sementes, nas quais a concentração destes compostos pode variar de 3% em sementes fermentadas e torradas até 13% em sementes que não passaram pelos processos de fermentação e torrefação. O objetivo deste trabalho foi aplicar o método de extração convencional de polifenóis a partir de sementes de cacau utilizando etanol como solvente à pressão atmosférica e também extração com fluido supercrítico, empregando CO₂ puro e também em mistura com etanol utilizado como co-solvente. Para esta finalidade foi utilizado o CO₂ supercrítico (CO₂SC) em diferentes densidades, promovendo a extração a pressões de trabalho de 80 e 150 bar, temperatura de 40°C e álcool etílico 85 e 92,8 °GL em proporções que variaram de 10 a 200% em relação à massa de cacau. O tempo das extrações foi mantido para todos os experimentos em 5 horas com um tempo estático de 1 hora. Variou-se a vazão do CO₂ denso de 5,34 ml.min⁻¹ para a pressão de 80 bar a 1,84 ml.min⁻¹ para pressão de 150 bar. Membranas orgânicas microporosas foram utilizadas para a separação do polifenóis extraídos. Foram usadas membranas comerciais de nanofiltração denominadas DL e HL e de osmose inversa, SG (GE-Osmonics). Utilizaram-se também, membranas de nanofiltração NF e NF-90 e de osmose inversa BW-30 (Filmtec/Dow). Os resultados indicaram que a quantidade de polifenóis extraída variou de 3 a 42% de acordo com a quantidade e graduação do co-solvente adicionado e também da pressão utilizada. As membranas apresentaram índices de retenção de polifenóis de 70 a 94%, boa resistência mecânica quando submetidas aos diferenciais de pressão aplicados e bom comportamento químico quando expostas ao CO₂SC puro e ao extrato de cacau, indicando a possibilidade de utilização deste sistema de separação em um processo combinado de extração e separação ou de concentração do extrato, permitindo a repressurização dos solventes com um baixo consumo de energia.

ABSTRACT

The antioxidants are some of the most important ingredients that must be available in people's daily dieting functional foods. Among the antioxidants, the phenolics and the tocopherols, set up as a category of compounds that are commonly presented in a wide variety of natural foods, as well as it's important the presence of these in synthetic feeding products. In the center of attention, there is a group of polyphenolic compounds called flavonoids. The flavonoids, which were considered the most important in this work, are set up of three subgroups: catequins, epicatequins and procyanidins. Recent researches have shown that in plants like cocoa *Theobroma cacao* L it is found a great quantity of polyphenols in its leaves and principally in its seeds, in which the concentration of these compounds may vary from 3%, in fermented and toasted seeds, until 13% in seeds that weren't subjected to the fermentation and roasting processes. The objective of this work was applying the conventional method of polyphenols extraction, from cocoa seeds using ethanol as a solvent under atmospheric pressure and also the extraction with a supercritical fluid, using pure CO₂ and also mixed with ethanol, used as a cosolvent. For this end was used the supercritical CO₂ (CO₂SC) in different densities, causing the extraction under work pressures of 80 and 150 bar, temperature of 40°C and ethyl alcohol 85 and 92,8 °GL in proportions that vary from 10 to 200% regarding to the cocoa mass. The length of the extractions was remained for all the experiments in 5 hours with a static length of 1 hour. It varied the flow of the dense CO₂ from 5,34 ml.min⁻¹ under the pressure of 80 bar to 1,84 ml.min⁻¹ under the pressure of 150 bar. Microporous organic membranes were used for the separation of extracted polyphenols. DL and HL commercial nanofiltering, and SG (GE-Osmonics) inverted osmosis membranes were used. NF and NF-90 nanofiltering and BW-30 (Filmtec/Dow) inverted osmosis membranes were used so. The results indicated that the quantity of polyphenols extracted varied from 3 to 42% according to the quantity and graduation of the added cosolvent and to the pressure used. The membranes presented polyphenols retention rating from 70 to 94%, good mechanical strength when subjected to the applied pressure differentials and good chemical behavior when exposed to the pure CO₂SC and to the cocoa extract, indicating that this system can be used for separation in a combined process of extraction and separation, or for a concentration of this extract, permitting the repressurization of the solvents with a low energy consumption.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Estrutura básica dos flavonóides.....	11
Figura 3.2	Exemplos de polifenóis encontrados em sementes de cacau	12
Figura 3.3	Estruturas de monômero, dímero e trímero de procianidinas	13
Figura 3.4	Redução dos níveis de polifenóis em sementes de cacau durante os diferentes estágios no processo de fabricação de chocolate.....	14
Figura 3.5	Estrutura básica dos tocoferóis	17
Figura 3.6	Estrutura básica dos tocotrienóis	17
Figura 3.7	Diagrama de fase pressão-temperatura para o dióxido de carbono	20
Figura 3.8	Comparação das quantidades de cafeína, catequinas e ácido graxo extraído do chá verde com e sem a adição de co-solvente	24
Figura 3.9	Representação esquemática do transporte de massa de uma membrana.....	25
Figura 3.10	Espectro de filtração	28
Figura 3.11	Representação esquemática da osmose direita e inversa	31
Figura 3.12	Representação esquemática de uma curva obtida pelas medidas de fluxo permeado estacionário através de uma membrana em função do diferencial de pressão aplicado.....	32
Figura 3.13	Representação esquemática da teoria do filme, que representa o fenômeno de concentração de polarização e colmatagem da membrana.....	35
Figura 4.1	Equipamento de extração a alta pressão e separação com membranas.....	42
Figura 4.2	Planta piloto de extração e separação com membranas	43
Figura 4.3	Equipamento de extração a alta pressão	44
Figura 4.4	Equipamento de separação com membranas.....	47
Figura 4.5	Tela principal do <i>software</i> de monitoramento e controle dos processos de extração e separação.....	50
Figura 5.1	Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando CO ₂ SC puro e pressão de 80 bar. (massa de cacau utilizada = 69,1 g, amostra com gordura)	53
Figura 5.2	Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando CO ₂ SC puro e pressão de 150 bar. (massa de cacau utilizada = 68,8g, amostra com gordura)	53
Figura 5.3	Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando CO ₂ SC + 10% (V/m) de etanol 92,8GL pressão de 150 bar. (massa de cacau utilizada = 74,5g, amostra com gordura)	54
Figura 5.4	Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando CO ₂ SC + 100% (V/m) de etanol 92,8GL pressão de 80 bar. (massa de cacau utilizada = 70,3g, amostra com gordura).....	55
Figura 5.5	Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando CO ₂ SC + 100% (V/m) de etanol 92,8GL pressão de 150 bar. (massa de cacau utilizada = 73,6g, amostra com gordura)	55
Figura 5.6	Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando CO ₂ SC + 200% (V/m) de etanol 92,8GL pressão de 150 bar.(massa de cacau utilizada = 63,2g, amostra com gordura).....	56

Figura 5.7	Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando CO ₂ SC + 100% (V/m) de etanol 85GL pressão de 80 bar. (massa de cacau utilizada = 71,4g, amostra com gordura)	57
Figura 5.8	Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando CO ₂ SC + 100% (V/m) de etanol 92,8GL pressão de 80 bar. (massa de cacau utilizada = 72,1g, amostra sem gordura).....	57
Figura 5.9	Curva de nível para a variável resposta rendimento para os fatores pressão/graduação de etanol	60
Figura 5.10	Curva de nível para a variável resposta rendimento para os fatores pressão/quantidade de etanol	60
Figura 5.11	Curva de nível para a variável resposta rendimento para os fatores graduação do etanol/quantidade de etanol	61
Figura 5.12	Comportamento do fluxo permeado de CO ₂ SC puro em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo quando da pressurização e despressurização da membrana SG.....	63
Figura 5.13	Comportamento do fluxo permeado de CO ₂ SC puro em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo quando da pressurização e despressurização da membrana DL.....	63
Figura 5.14	Comportamento do fluxo permeado de CO ₂ SC puro em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo quando da pressurização e despressurização da membrana NF.....	64
Figura 5.15	Comportamento do fluxo permeado de CO ₂ SC puro em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo quando da pressurização e despressurização da membrana NF-90.....	64
Figura 5.16	Comportamento do fluxo permeado de CO ₂ SC puro em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo quando da pressurização e despressurização da membrana BW-30.....	65
Figura 5.17	Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO ₂ SC puro em função do diferencial de pressão aplicado durante a pressurização e despressurização da membrana SG.....	65
Figura 5.18	Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO ₂ SC puro em função do diferencial de pressão aplicado durante a pressurização e despressurização da membrana DL.....	66
Figura 5.19	Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO ₂ SC puro em função do diferencial de pressão aplicado durante a pressurização e despressurização da membrana NF.....	66
Figura 5.20	Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO ₂ SC puro em função do diferencial de pressão aplicado durante a pressurização e despressurização da membrana NF-90.....	67
Figura 5.21	Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO ₂ SC puro em função do diferencial de pressão aplicado durante a pressurização e despressurização da membrana BW-30.....	67
Figura 5.22	Comportamento do fluxo permeado de CO ₂ SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo, da membrana SG.....	68
Figura 5.23	Comportamento do fluxo permeado de CO ₂ SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo, da membrana DL.....	69

Figura 5.24	Comportamento do fluxo permeado de CO ₂ SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo, da membrana HL.....	69
Figura 5.25	Comportamento do fluxo permeado de CO ₂ SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo, da membrana NF.....	70
Figura 5.26	Comportamento do fluxo permeado de CO ₂ SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo, da membrana NF-90.....	70
Figura 5.27	Comportamento do fluxo permeado de CO ₂ SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo, da membrana BW-30.....	71
Figura 5.28	Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO ₂ SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado da membrana SG.....	71
Figura 5.29	Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO ₂ SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado da membrana DL.....	72
Figura 5.30	Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO ₂ SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado da membrana HL.....	72
Figura 5.31	Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO ₂ SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado da membrana NF.....	73
Figura 5.32	Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO ₂ SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado da membrana NF-90.....	73
Figura 5.33	Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO ₂ SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado da membrana BW-30.....	74
Figura 5.34	Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau permeado pela membrana SG.....	76
Figura 5.35	Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau retentado pela membrana SG.....	76
Figura 5.36	Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau permeado pela membrana DL.....	77
Figura 5.37	Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau retentado pela membrana DL.....	77
Figura 5.38	Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau permeado pela membrana HL.....	78
Figura 5.39	Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau retentado pela membrana HL.....	78
Figura 5.40	Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau permeado pela membrana NF.....	79
Figura 5.41	Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau retentado pela membrana NF.....	79
Figura 5.42	Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau permeado pela membrana NF-90.....	80
Figura 5.43	Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau retentado pela membrana NF-90.....	80

Figura 5.44	Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau permeado pela membrana BW-30.....	81
Figura 5.45	Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau retentado pela membrana BW-30.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Estrutura de compostos polifenólicos	10
Tabela 3.2	Principais polifenóis encontrados em sementes e produtos a base de cacau	13
Tabela 3.3	Quantidades de favan-3-ol e procianidinas ($\mu\text{g/g}$) em sementes de cacau ao longo do processo de fermentação	14
Tabela 3.4	Conteúdo de tocoferóis ($\text{mg}/100\text{g}$) em partes de sementes de cacau.....	16
Tabela 3.5	Frações não saponificáveis (%) de partes de sementes de cacau	18
Tabela 3.6	Força motriz e o processo de separação correlato	26
Tabela 4.1	Valores da densidade do CO_2SC a 40°C	38
Tabela 4.2	Características das membranas fornecidas pelos fabricantes.....	40
Tabela 4.3	Condições de trabalho dos principais experimentos realizados durante as extrações a temperatura de 40°C	45
Tabela 4.4	Fatores e níveis estabelecidos para o planejamento experimental fracionado 2^3	45
Tabela 4.5	Planejamento experimental fracionado 2^3	46
Tabela 4.6	Condições de trabalho dos principais experimentos realizados durante as extrações à temperatura de 40°C estabelecidos pelo planejamento experimental fracionado 2^3	46
Tabela 5.1	Rendimentos das extrações para obtenção do extrato de cacau referentes aos experimentos preliminares	52
Tabela 5.2	Polifenóis extraídos nos experimentos estabelecidos pelo planejamento experimental com amostras de cacau desengordurado a 40°C	59
Tabela 5.3	Análise de variância e estimativa de efeitos significativos que influenciaram na variável resposta rendimento das extrações realizadas de acordo com o planejamento experimental	59
Tabela 5.4	ANOVA para a resposta rendimento.	60
Tabela 5.5	Permeabilidade das membranas frente ao CO_2SC e ao extrato de cacau	74
Tabela 5.6	Polifenóis encontrados no permeado, no retentado e índices de retenção da membrana SG.....	76
Tabela 5.7	Polifenóis encontrados no permeado, no retentado e índices de retenção da membrana DL.....	77
Tabela 5.8	Polifenóis encontrados no permeado, no retentado e índices de retenção da membrana HL.....	78
Tabela 5.9	Polifenóis encontrados no permeado, no retentado e índices de retenção da membrana NF.....	79
Tabela 5.10	Polifenóis encontrados no permeado, no retentado e índices de retenção da membrana NF-90.....	80
Tabela 5.11	Polifenóis encontrados no permeado, no retentado e índices de retenção da membrana BW-30.....	81
Tabela 5.12	Quantidade de polifenóis encontrados no permeado das membranas testadas.....	82
Tabela 5.13	Quantidade de polifenóis encontrados no retentado das membranas testadas.....	82
Tabela 5.14	Resumo dos índices de retenção dos componentes do extrato de cacau para cada uma das membranas.....	83

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Justificativa	3
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo Geral	6
2.2 Objetivos Específicos	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 Alimentos funcionais.....	7
3.2 Polifenóis	9
3.3 Tocoferóis e tocotrienóis	16
3.4 Fluido supercrítico (FSC)	18
3.5 CO ₂ supercrítico (CO ₂ SC)	19
3.6 Processo de extração com CO ₂ SC	20
3.7 Processo de separação com membranas	25
3.8 Processo combinado de extração e separação com membranas	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Solvente	38
4.2 Co-solvente	39
4.3 Membranas	39
4.4 Amostras de cacau	40
4.5 Análises cromatográficas	41
4.6 Equipamentos para extração e separação com membranas	42
4.7 <i>Software</i> para monitoramento e controle dos processos de extração e separação com membranas.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
5.1 Identificação das condições de extração	52
5.2 Permeabilidade das membranas ao CO ₂ SC puro	61
5.3 Permeabilidade das membranas a mistura CO ₂ SC e extrato de cacau.....	68
5.4 Índices de retenção dos polifenóis pelas membranas	75
5.4.1 Membrana SG	76
5.4.2 Membrana DL	77
5.4.3 Membrana HL	78
5.4.4 Membrana NF	79
5.4.5 Membrana NF-90	80
5.4.6 Membrana BW-30	81
6. CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1. INTRODUÇÃO

A evolução da pesquisa científica e a facilidade de acesso aos resultados dessas pesquisas têm proporcionado, de alguma forma, uma melhor qualidade de vida às pessoas no que diz respeito aos alimentos, sob aspectos nutricionais ou de saúde.

Se anteriormente a quantidade dos alimentos era importante, atualmente a qualidade passa a ter também um caráter prioritário. Nesse aspecto, a partir da segunda metade do século XX, a preocupação pela maior quantidade e qualidade dos alimentos se disseminou pelo meio científico mundial. As pesquisas em tecnologia de alimentos tomaram impulso nos anos 70 e 80 e o enfoque principal permaneceu sobre a eliminação de componentes prejudiciais à saúde humana, assim como na produção de alimentos com baixos teores de energia, açúcares e gorduras (produtos *Light* e *Diet*). A partir dos anos 90, os alimentos passaram a ser vistos como sinônimos de bem-estar e redução de riscos de doenças.

Dentro desta perspectiva, é crescente a preocupação de pesquisadores, produtores, instituições de saúde e normatizadoras em disponibilizar às pessoas, alimentos e bebidas que possam, além da função energética, apresentar propriedades especiais obtidas pela presença de compostos específicos. Atualmente, existe grande interesse nos chamados alimentos funcionais ou macrobióticos que apresentam benefícios adicionais, além de nutricionais e energéticos, como antihipertensivos, antiinflamatórios e antioxidantes.

Frequentemente, alimentos funcionais são obtidos originariamente de alimentos tradicionais enriquecidos com um ou mais ingredientes capazes de fornecer benefícios à saúde humana. A preferência é que estes ingredientes sejam derivados de fontes, tais como plantas e outros alimentos naturais.

Dentre os compostos com propriedades funcionais destacam-se os antioxidantes. Em função da importância de tais compostos na nutrição humana, estes estão sendo cada vez mais utilizados na obtenção de produtos com características diferenciadas e com maior valor agregado. Alimentos que possuem na sua composição fontes destes antioxidantes, como por exemplo, vinho tinto, chá verde e chocolate, no qual a matéria-prima principal é o cacau, naturalmente irão apresentar os benefícios desta classe de compostos. Entretanto, outros alimentos que não possuem fontes naturais de antioxidantes podem ser especialmente formulados.

Pesquisas recentes têm mostrado que em plantas como o cacau (*Theobroma cacao* L) encontra-se uma grande quantidade de compostos polifenólicos com características antioxidantes, onde se destacam os flavonóides. Os flavonóides de maior importância nesse

trabalho são constituídos de três subgrupos: catequinas, epicatequinas e procianidinas. Uma outra série de compostos com características antioxidantes existentes no cacau são os tocoferóis e tocotrienóis, mas por existirem em menor quantidade nas sementes, não serão dedicados estudos visando extração.

Para a formulação de alimentos e bebidas enriquecidos com compostos antioxidantes, estas substâncias devem ser extraídas das fontes naturais. Polifenóis de fontes naturais, podem ser extraídos pelo uso de diversos solventes como água, metanol, etanol, acetato de etila e acetona ou uma mistura desses solventes. A extração supercrítica, utilizando-se CO₂ puro ou pela adição de um co-solvente, pode ser usada para esta finalidade com vantagens sobre os métodos tradicionais de obtenção destes compostos.

Um processo de extração com gás carbônico supercrítico (CO₂SC) pode ser desenvolvido à temperaturas moderadas, o que, além do baixo consumo de energia, evita a degradação dos compostos termosensíveis, diferentemente dos processos clássicos como destilação e extração por solventes líquidos onde são necessárias temperaturas mais elevadas. A combinação de CO₂SC com um co-solvente acelera o processo de extração de compostos cujas polaridades são elevadas. Nesse sentido, o etanol tem se mostrado como uma alternativa bastante viável. O extrato final pode ser utilizado em alimentos sem a preocupação de separar o co-solvente que não possa ser consumido por humanos. Outra perspectiva otimista sobre o uso do CO₂SC como solvente na extração de compostos é a possibilidade de fracionamento na separação pelo uso de separadores colocados em série operando a pressões e temperaturas diferentes das condições de extração, explorando, assim, a diferença de solubilidade dos compostos no fluido supercrítico.

Existem outros processos clássicos de separação de espécies químicas presentes em mistura tais como filtração, destilação, centrifugação, decantação, absorção, floculação, troca iônica, extração por solvente líquido, cristalização e outros.

Da mesma forma que os processos de extração supercrítica com CO₂ puro ou com adição de um co-solvente, os processos de separação com membranas vêm despertando grande interesse industrial e apresentam algumas vantagens sobre os processos clássicos.

Os processos de separação por membranas, apesar de se tratar de uma tecnologia relativamente nova, representam hoje um grande avanço nos métodos de separação. Apresentam uma alternativa de baixo consumo de energia, de grande seletividade, de facilidade de separação de compostos termolábeis, de tecnologia limpa e facilidade de operação em relação aos métodos de separação tradicionais.

Com o avanço das tecnologias de materiais e preparação de membranas, assim como também dos processos que as utilizam, tornam-se meios adequados para separação e purificação de produtos.

As ações benéficas dos polifenóis flavonóides no organismo humano, como agentes antioxidantes no combate aos radicais livres e outras funções fisiológicas, têm sido amplamente estudadas e comprovadas. Este aspecto caracteriza a importância deste trabalho.

Diversos processos têm sido propostos para extração de polifenóis de fontes naturais, pelo uso de vários solventes diferentes puros ou pela combinação de duas ou mais substâncias para esta finalidade. A extração de polifenóis de sementes de cacau também tem sido feita pelo uso de diversos solventes, exceto pelo uso de CO₂ supercrítico puro ou combinado com um co-solvente, especialmente etanol, como método adequado para obtenção de flavonóides com a possibilidade de disponibilizá-los para outras finalidades.

1.1. Justificativa

Levando-se em conta aos aspectos de nutrição e saúde humana, podemos considerar que vivemos na era do alimento funcional, na qual a ciência dedica esforços para mostrar os valores dos alimentos contendo fatores capazes de proporcionar efeitos benéficos e protetores. Este e os aspectos seguintes justificam a importância deste trabalho.

Os polifenóis existem como componentes intrínsecos do cacau, e assim, produtos derivados do cacau podem ser considerados um alimento funcional para conferir efeitos à saúde humana, como é o caso sugerido para o vinho tinto quando consumido em doses moderadas e o chá verde ou preto. O Brasil é produtor de cacau com altos teores de polifenóis em suas sementes, com potencialidade de ampliação da produção pela adequação do solo e clima em diversas regiões do país, além do desenvolvimento de novas variedades de plantas mais produtivas e resistentes às doenças do cacauero.

A produção de alimentos a base de cacau, em relação a mudanças na composição e no conteúdo de polifenóis não tem sido objeto de investigação, com exceção dos casos de aplicação de patente. Além disso, é ainda muito limitado o conhecimento sobre o teor e a composição de polifenóis nos diversos tipos de produtos a base de cacau apesar de serem largamente consumidos.

Devido à evidência de que os polifenóis podem agir como potenciais antioxidantes, desempenhar uma importante função na redução do risco ou retardo do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer e outras relacionadas a idade; e ainda, modular processos

biológicos essenciais em mamíferos *in vivo* as áreas de nutrição e medicina têm tido um especial interesse nestes compostos.

Cada vez mais, têm-se desenvolvido métodos de seleção e/ou processamento de sementes de cacau para produzir componentes do cacau ou de seus derivados com níveis maiores de polifenóis.

Um alimento funcional pode ser enriquecido com polifenóis para melhorar a sua capacidade de fornecer efeitos benéficos á saúde humana. Para tanto, estes compostos devem ser obtidos de fontes naturais e a fonte tomada como base para este estudo são as sementes de cacau.

Os processos de extração com fluido supercrítico têm se mostrado eficientes na obtenção de compostos de fontes naturais, em especial a extração com CO₂ supercrítico (CO₂SC), que apresenta vantagens adicionais por possibilitar a obtenção de produtos de alta pureza e isentos de resíduos de solvente.

Os processos de separação com membranas também têm se caracterizado como uma tecnologia eficiente e com vantagens quando comparada aos processos convencionais de separação, principalmente por permitir o reciclo de solvente quando utilizada em sistema combinado com extração com CO₂SC puro ou com adição de um co-solvente.

O presente estudo visa contribuir com uma proposta de uso de técnicas de obtenção de polifenóis, utilizando extração supercrítica empregando CO₂ e etanol como co-solvente que, ao contrário de outros solventes, são viáveis para uso em alimentos sob ponto de vista de toxicidade e de baixo custo. Ele visa contribuir também com a proposta de uso dos processos de separação com membranas pelo emprego de membranas poliméricas que permitem concentração do extrato e a separação e fracionamento de polifenóis com a possibilidade de reuso dos solventes empregados na extração.

Para facilidade de compreensão de todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho, sua apresentação foi dividida em capítulos. No capítulo 2 são apresentados os objetivos, no capítulo 3 é apresentada uma revisão bibliográfica que trata de alimentos funcionais, fluidos supercríticos, do CO₂SC com relação às suas propriedades como solvente, dos mecanismos de obtenção de extratos a partir de matrizes vegetais pelo uso do processo de extração convencional ou pelo uso do CO₂SC puro. Trata também da combinação deste com outros solventes que atuam como co-solvente e, da extração de antioxidantes presentes em matrizes vegetais. Este capítulo destaca, ainda, informações sobre antioxidantes com relação à sua importância para a saúde humana. Também trata da tecnologia de membranas destacando os principais processos de separação, aplicações de interesse industrial e fenômenos decorrentes

das características das membranas e dos fluidos a serem separados. O capítulo 4, referente a materiais e métodos, descreve os detalhes dos equipamentos e experimentos de extração, de separação e combinados de extração e separação com membrana. Os resultados e discussão dos experimentos realizados são apresentados no capítulo 5 e finalmente a conclusão e sugestões são apresentadas no capítulo 6.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar as técnicas de extração de polifenóis a partir de sementes de cacau e separação com membranas, de modo a selecionar a técnica mais adequada para extração e classificar as membranas de acordo com as suas eficiências na obtenção de extrato concentrado.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar as condições experimentais do processo de extração convencional utilizando etanol como solvente, para extração de polifenóis presentes em sementes de cacau.
2. Avaliar as condições experimentais da técnica de extração de polifenóis de sementes de cacau com CO₂ supercrítico puro e com a adição de etanol como co-solvente.
3. Determinar uma condição de operação adequada para extração de polifenóis presentes em sementes de cacau.
4. Avaliar o processo de separação através de membranas comerciais de nanofiltração e osmose inversa para purificar e concentrar o extrato obtido no processo de extração.
5. Classificar as membranas com as melhores características físico-químicas para obtenção dos polifenóis.
6. Determinar a concentração de polifenóis na matéria-prima, nos extratos obtidos pelos processos de extração e nos extratos permeado e retentado através de cromatografia líquida de alta eficiência.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Alimentos Funcionais ou Macrobióticos

Levando-se em conta dados estatísticos, cada vez mais se observa o aumento da expectativa de vida das pessoas em todo o mundo. No Brasil, principalmente a partir do início do século passado, este crescimento tem sido mais acentuado. Acompanhando esta tendência e contribuindo não só com uma maior expectativa, mas com uma melhor qualidade de vida, têm sido crescentes as pesquisas com relação à qualidade dos alimentos como peça chave na diminuição do risco de doenças crônicas como obesidade, arteriosclerose, diabetes e câncer, desde a infância até o envelhecimento.

Nos países asiáticos, especialmente no Japão, tem surgido a maior contribuição com o estudo de alimentos destinados a valorizar a qualidade de vida humana. É neste país que em 1991, uma categoria de alimentos foi regulamentada recebendo a denominação de “*Foods for Specified Health Use (FOSHU)*”. Este programa é administrado pelo Ministério da Saúde e Bem Estar do Japão. No Brasil esta expressão recebe a denominação de Alimentos Funcionais.

O conceito de alimentos funcionais ainda não obteve consenso, mas podemos considerá-los como “Alimento semelhante em aparência aos alimentos convencionais, consumidos como parte da dieta, que produz benefício específico à saúde, além de satisfazer os requerimentos nutricionais”. Ou “alimentos em forma natural ou processada que contêm níveis significativos de componentes ativos biologicamente que, além da nutrição básica, trazem benefícios à saúde, à capacidade física e ao estado mental” (ANVISA, 1999)

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de acordo com a portaria 398 de 03/04/99, resoluções ANVS/MS nº 17 de 30 de abril de 1999, ANVS/MS nº 18 de 30 de abril de 1999 e ANVS/MS nº 19 de 30 de abril de 1999, “alimentos com alegação de propriedades funcionais são aqueles que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos pela atuação de nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. Alimentos com alegação de propriedades de saúde são aqueles que afirmam, sugerem ou implicam na existência de relação entre o alimento ou ingrediente com a doença ou condição relacionada à saúde”. Ou seja, de acordo com a ANVISA, o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais, além de atuar em funções nutricionais básicas, irá desencadear efeitos benéficos à saúde e deverá ser também seguro para o consumo sem supervisão médica (ANVISA-VISALEGIS, 1999).

Desta forma, seguindo a tendência mundial, cresce no Brasil um novo conceito em nutrição segundo o qual os alimentos não devem servir apenas para atender as necessidades sensoriais, nutricionais e para fornecer energia ao organismo, mas precisam igualmente contribuir para melhorar a saúde das pessoas. Na composição dos alimentos funcionais devem conter substâncias capazes de reduzir os riscos de doenças e alterar benéficamente as funções orgânicas

Nesse momento é importante ressaltar que alguns alimentos e bebidas, mesmo não sendo classificados como funcionais, apresentam substâncias caracterizadas como antioxidantes, de origem natural e que podem fornecer os mesmos benefícios obtidos dos alimentos funcionais. É o caso do chá verde (MCKAY & BLUMBERG, 2002), vinho tinto e chocolate (HAMMERSTONE et. al., 2000).

Desde a antiguidade o homem tem produzido e consumido alimentos com propriedades antioxidantes, é o caso do chocolate que ainda hoje é redescoberto pelos seus benefícios para a saúde (COE & COE, 1996). Mais recentemente, o chocolate tem recebido maior atenção pelas suas propriedades antioxidantes que reduzem os riscos de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (WOLLGAST & ANKLAM, 2000). O consumo nacional de chocolate não ultrapassa a 0,75 kg por pessoa por ano. Entretanto, em países de clima frio e alta renda “per capita”, destacando-se a Bélgica (consumo de 5,5 kg/habitante/ano), a Suíça (3,6 kg/hab./ano), a Áustria (3,6 kg/hab./ano), a Inglaterra (3,4 kg/hab./ano) e a Islândia (3,04 kg/hab./ano) o consumo é mais acentuado. Enquanto algumas pesquisas têm procurado atender de forma mais eficiente às exigências dos consumidores quanto às características organolépticas (ZHU et al., 2002; KRIS-ETHERTON & KEEN, 2002; REIN et al., 2000; WAN et al., 2000), os métodos para identificar e caracterizar as propriedades antioxidante do chocolate estão constantemente em evolução (KEALEY et al., 1998).

A Associação Dietética Americana (ADA) especifica que as substâncias nos alimentos, por exemplo, os fitoquímicos que são componentes naturais e constituintes dos chamados alimentos funcionais, podem desempenhar uma importante função benéfica para a saúde como parte de uma dieta variada (BLOCH & THOMSOM, 1995). Dentre os fitoquímicos, os polifenóis constituem um dos grupos de substâncias mais numerosas e largamente distribuídas no Reino Vegetal (BRAVO, 1998).

3.2. Polifenóis

Por décadas, os polifenóis de plantas despertam o interesse de cientistas, porque eles são essenciais à fisiologia das plantas, pela contribuição em sua morfologia (pigmentação), envolvimento no crescimento e reprodução, e ainda oferecendo resistência a patógenos e predadores (SAITO et al., 1998).

Os perfis de polifenóis de plantas diferem entre variedades da mesma espécie e, portanto, eram pesquisadas com propósitos taxonômicos ou para determinar adulterações em produtos alimentícios (SINGLETON, 1981).

Os polifenóis possuem várias aplicações industriais, como produção de tintas, papéis e cosméticos, como agentes tânicos e como aditivos (corantes naturais e conservantes) na indústria de alimentos. Além disso, alguns compostos fenólicos, os flavonóides, têm aplicações como antibióticos e agentes antidiarréicos, antiúlceraivos e anti-inflamatórios, bem como no tratamento de doenças como a hipertensão, fragilidade vascular, alergias, hipercolesterolemia e outros (SINGLETON, 1981).

Os compostos polifenólicos estão presentes em órgãos de todas as plantas e são, portanto, parte integrante da dieta humana. Até bem pouco tempo atrás, a maior parte do interesse nutricional nos compostos polifenólicos era sobre os efeitos deletérios causados pela habilidade de certos polifenóis em se ligar e precipitar macromoléculas, como as proteínas dietéticas, carboidratos e enzimas digestivas; reduzindo, assim, sua digestibilidade (BRAVO, 1998).

Recentemente, os polifenóis têm recebido muita atenção, devido a sua capacidade antioxidante (reagindo com radicais livres) e suas possíveis implicações benéficas na saúde humana, como na prevenção e tratamento do câncer, doenças cardiovasculares e outras patologias (WOLLGAST & ANKLAM, 2000).

Os polifenóis naturais podem abranger desde moléculas simples, como os ácidos fenólicos, até compostos altamente polimerizados, como os taninos condensados.

Os polifenóis podem ser divididos em pelo menos 10 classes diferentes, dependendo da sua estrutura básica. A Tabela 3.1 apresenta algumas estruturas de polifenóis, entre os quais, os flavonóides.

Tabela 3.1 Estruturas de compostos polifenólicos

Composto	Estrutura
Naftoquinonas	
Xantonas	
flavonóis	
Antraquinonas	
Stilbenas	
Ligninas, Neoligninas	

Os flavonóides constituem um dos mais importantes subgrupos dos polifenóis e podem ser divididos em até 13 classes com mais de 5000 compostos diferentes. Sua estrutura principal é constituída do difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$) onde os dois anéis aromáticos **A** e **B** estão ligados por 3 carbonos, que geralmente formam um heterociclo oxigenado **C**. A Figura 3.1 representa a estrutura básica principal dos flavonóides.

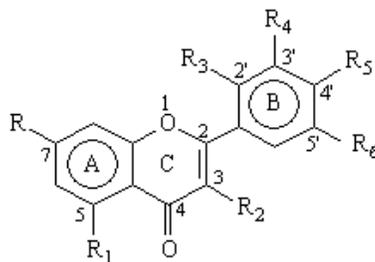


Figura 3.1. Estrutura básica dos flavonóides

Pesquisas recentes têm mostrado que em plantas como cacau (*Theobroma cacao* L) encontra-se uma grande quantidade de polifenóis em suas folhas e principalmente em suas sementes.

Nas sementes de cacau, os polifenóis são armazenados nas células de pigmento, também chamadas células de armazenamento de polifenóis. Dependendo da quantidade de polifenóis, a coloração dessas células varia de branca a púrpura (OSMAN et al., 2004).

A presença de polifenóis em plantas é dependente de vários fatores incluindo grau de maturação, variedade, processo e armazenamento (PORTER et al., 1991; Hammerstone et al., 1999).

A quantidade de polifenóis existente em sementes é sempre mais elevada do que as quantidades em produtos a base de cacau, os quais são produzidos por processos envolvendo fermentação, secagem e torrefação. 60% dos polifenóis encontrados nas sementes de cacau pertencem ao grupo das catequinas, epicatequinas e procianidinas. Outros, em menor quantidade incluem a antocianina que é responsável pela coloração púrpura das sementes.

As sementes de cacau geralmente encontradas nas espécies brasileiras são das variedades Criollo – *Theobroma cacao*, Lenaeus e Forastero ou cacau roxo – *Theobroma leiocarpum*, Bern. Este último possui quatro variedades: Momum, Pará, Maranhão e Catango e representa praticamente a totalidade do cacau de consumo no mundo atual, incluindo o Brasil. Um 3º grupo chamado Trinitário é uma variedade híbrida entre Criollo e Forastero e não encontrada na forma selvagem. De acordo com a CEPLAC – Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, órgão vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Costa do Marfim lidera, desde a década de 60, a produção mundial de cacau em amêndoas secas, seguida, na ordem, por Gana, Indonésia, Nigéria, Brasil, Camboja, Malásia e Equador. Este rol de oito países concentra mais de 90% da oferta mundial. O Brasil, que até a década de 80 ocupava o 2º lugar desse ranking, caiu para o 5º lugar, em razão: (a) da progressiva redução da área plantada e do padrão tecnológico adotado, como resposta à queda

dos preços internacionais, e (b) do alastramento da doença conhecida como “vassoura de bruxa” nos cacauais da Bahia, o principal estado produtor. Como decorrência disso, a década de 90 viu o Brasil se transformar de exportador de cacau em amêndoas em importador do produto. A produção nacional de cacau em amêndoas, de aproximadamente 350.000 toneladas/ano está concentrada no sul da Bahia (83% da oferta brasileira, especialmente nos municípios de Itabuna, Camacã e Ilhéus), seguida, em escala bem inferior, pelo Pará (9,9% da oferta brasileira, focalizada nos municípios de Medicilândia, Uruará, Altamira e Tomé-Açú) e por Rondônia (5,4% da produção brasileira).

A concentração total de polifenóis identificados em sementes secas ou produtos à base de cacau varia de 10 a 15%. Em sementes fermentadas e torradas, a concentração pode ser reduzida para aproximadamente 4%. Estas concentrações variam de acordo com a variedade das sementes, sendo que em algumas, como por exemplo nas sementes da variedade Criollo, o sub-grupo antocianina não é encontrada (LANGE & FINCKE, 1970). A Tabela 3.2 apresenta os principais polifenóis encontrados em sementes secas e alguns produtos obtidos a base de cacau (ROMANCZYK et al., 2002; TAKIZAWA & OSAWA; GOMI & OSAWA, 1998).

O cacau é rico em polifenóis particularmente em catequinas (flavan-3-ols ou sub-classe flavonol) e procianidinas (catequinas oligoméricas e poliméricas).

As catequinas monoméricas predominantemente no cacau são (+)- catequina e (-)-epicatequina. As procinidinas são uma classe de compostos polifenólicos encontradas em várias espécies de plantas e podem estar presentes como monômeros individuais ou, em alguns casos, como unidades oligoméricas.

A Figura 3.2 apresenta alguns exemplos de polifenóis presentes em sementes de cacau.

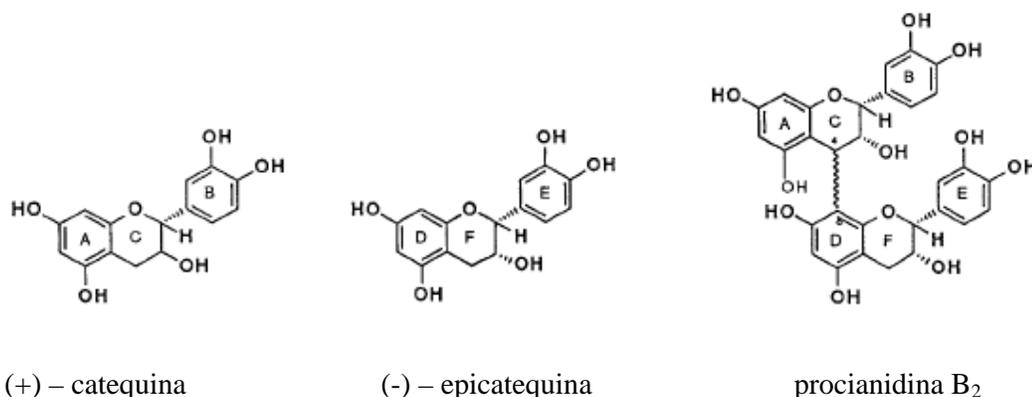


Figura 3.2. Exemplos de polifenóis encontrados em sementes de cacau

As procianidinas são formadas pela associação de várias unidades monoméricas (catequinas e epicatequinas): 2 a 5 unidades, para catequinas oligoméricas; e acima de 5 unidades para catequinas poliméricas. As procianidinas diferem na posição e na configuração de suas ligações monoméricas. As estruturas mais conhecidas são os monômeros, dímeros de procianidinas B1, B2, B3, B4 e B5 e os trímeros C1 e C2, dispostos na Figura 3.3.

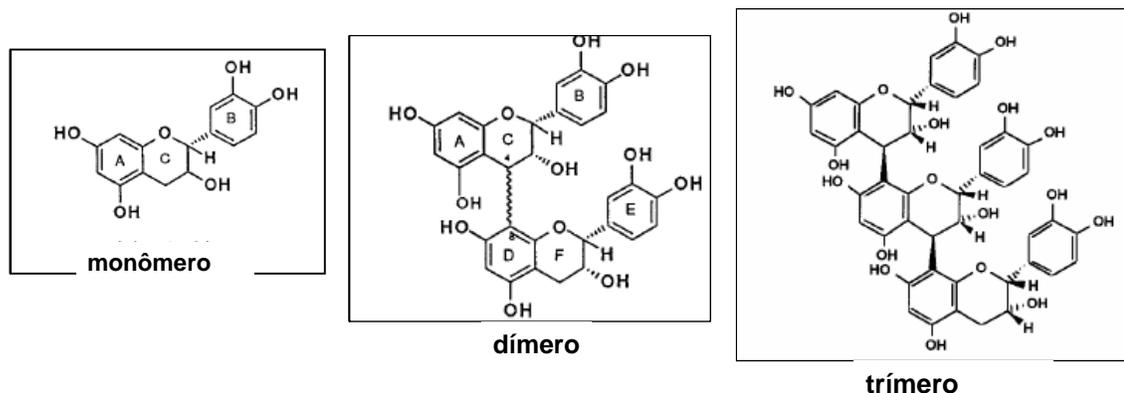


Figura 3.3. Estruturas de monômero, dímero e trímero de procianidinas.

A Tabela 3.2 apresenta outros polifenóis também encontrados em sementes e produtos a base de cacau.

Tabela 3.2. Principais polifenóis encontrados em sementes e produtos à base de cacau.

Catequinas	(-)-epicatequina (+)-catequina (+)-gallocatequina (-)-epigallocatequina
Procianidinas	Procianidina B1 = epicatequina-(4 β →8)-catequina Procianidina B2 = epicatequina-(4 β →8)-epicatequina Procianidina B3 = catequina-(4 α →8)-catequina Procianidina B4 = catequina-(4 α →8)-epicatequina Procianidina B5 = epicatequina-(4 β →6) epicatequina Procianidina C1 = epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina Procianidina C2 = epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-catequina Procyanidin D = epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin

O chocolate é produzido a partir das sementes do cacau *Theobroma cacao* L. Porém antes de transformar-se em chocolate, as sementes passam por um longo processo que inclui fermentação, secagem e torrefação. Em todos os estágios em que passam as sementes, os flavonóides estão presentes e durante as etapas do processamento a composição e concentração destes compostos pode ser reduzida consideravelmente. Durante a fermentação

a antocianina quase desaparece totalmente e a quantidade de catequinas e procianidinas mostra uma drástica redução nos primeiros três dias (CROS, 1982; 1989). Os três maiores modos de depreciação são: oxidação, lixiviação e complexação. A Figura 3.4 mostra a sequência de queda destes componentes ao longo do processo.

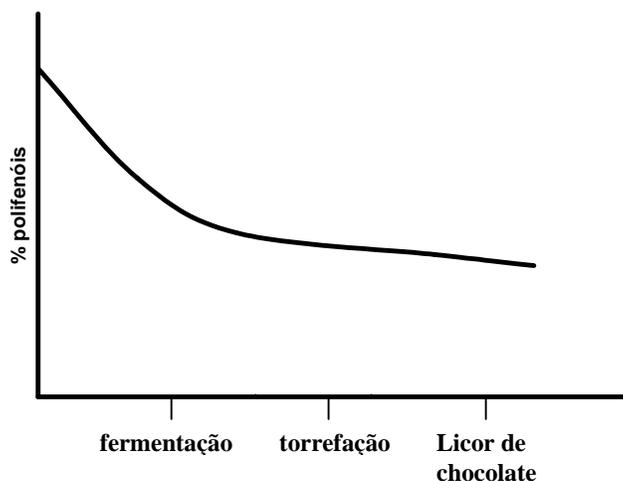


Figura 3.4. Redução dos níveis de polifenóis em sementes de cacau durante os diferentes estágios de fabricação do chocolate (Kealey et al., 1998).

A Tabela 3.3 mostra a variação da quantidade de flavan-3-ol e procianidinas presentes em sementes de cacau ao longo da etapa de fermentação.

Tabela 3.3 . Quantidades de flavan-3-ol e procianidinas ($\mu\text{g/g}$) em sementes de cacau ao longo do processo de fermentação (KEALEY et al. 1998)

Componente	Horas de fermentação				
	0	24	48	96	120
Monômero	21.929	21.088	20.887	9.552	8.581
Dímero	10.072	9.762	9.892	5.780	4.665
Trímero	10.196	9.119	9.474	5.062	4.070
Tetrâmero	7.768	7.064	7.337	3.360	2.557
Pentâmero	5.311	4.744	4.906	2.140	1.628
Hexâmero	3.242	2.906	2.929	1.160	888
Heptâmero	1.311	1.364	1.334	464	328
Octâmero	626	608	692	254	166
Nonâmero	422	361	412	138	123
Decâmero	146	176	302	traços	traços
Total	60.753	57.252	58.165	27.910	22.974

Durante a torrefação a temperatura varia de 100 a 130°C. Nestas condições, uma grande quantidade de polifenóis é perdida, podendo alcançar uma redução de até 50%.

O melhor modo de produzir chocolate ou componentes do cacau com altos conteúdos de polifenóis é pela conservação levando-se em conta fatores tais como: escolha de grãos de

cacau ricos em polifenóis, utilização de grãos sub-fermentados e reduzindo o tempo e/ou temperatura de tratamento térmico do *liquor* de cacau. Entretanto, o conteúdo mais alto de polifenol é tipicamente associado com um sabor amargo e adstringente, pouco apreciado pelos consumidores (KEALEY et. al., 1998).

Vários métodos são realizados para reduzir o amargor e a sensação de adstringência, como os aditivos de *flavour*, leite em pó em uma quantidade maior que 12% do peso para chocolates ao leite e algumas variações no processamento do chocolate (KAELEY et. al., 1998).

Dois *liquores* de chocolate com vários níveis de polifenóis de cacau foram obtidos e patenteados. Aqueles com conteúdos mais baixos em polifenol foram submetidos a altas temperaturas, ao passo que os de conteúdos mais altos em polifenol encontravam-se em temperaturas mais baixas, necessárias para conservar o maior conteúdo de polifenóis. Posteriormente, os dois *liquores* foram combinados por processamento em um produto final de chocolate (KEALEY et. al., 1998).

Há uma vasta literatura sobre a composição e o conteúdo dos polifenóis nos alimentos vegetais e bebidas. Devido à complexidade desse imenso grupo de metabólitos de plantas, muitos polifenóis permanecem sem identificação (BRAVO, 1998).

Além disso, é difícil comparar dados experimentais dentro da literatura, devido à falta de um consenso a respeito de um método apropriado para extrair e determinar os diferentes tipos ou famílias de compostos polifenólicos. Como resultado, a informação na literatura sobre o conteúdo e a composição de polifenóis em alimentos vegetais não é apenas incompleta; mas, algumas vezes também contraditória e de difícil comparação.

Tornou-se claro que existe uma relação entre os antioxidantes da dieta e as funções imunes. Foi sugerido que o chá verde, vinho tinto e produtos a base de cacau e outros contêm grandes quantidades de polifenóis que possuem atividade antioxidante (COUNET & COLLIN, 2003; VERSTRAETEN et al., 2005; GAULEJAC et al., 1999).

As espécies reativas do oxigênio (ERO's) têm papel importante em muitos processos biológicos. São geradas durante reações de transferência de elétrons em células aeróbicas especialmente pelo seu transporte nas cadeias mitocondriais. Incluem o radical hidróxido ($\bullet\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2 \bullet$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio singlete (O_2). Quando produzidos excessivamente e não destruídos pelo sistema antioxidante de defesa do organismo, podem reagir facilmente com DNA, proteínas e lipídeos, provocando doenças como câncer, arteriosclerose, injúria da mucosa gástrica e envelhecimento.

A atividade antioxidante do cacau foi mensurada em vários estudos. Sanbongi *et al.*(1998) avaliou o efeito *in vitro* de extrato rico em flavonóides extraído de *liquor* de cacau com solução alcoólica 80%. Os resultados indicaram que não somente a catequina e a epicatequina mostraram efeito antioxidante, mas também a quercetina, quercetina 3-glicosídeo, quercetina 3-arabinosídeo e a dideoxiclovamida. Wang (2000) administrou chocolate contendo 5,3mg/g de procianidinas das quais 1,3mg/g correspondiam a epicatequina, o qual apresentou efeito antioxidante em seres humanos. Segundo Mao (2000), as procianidinas do cacau possuem boa estabilidade da atividade antioxidante *in vitro*, sendo altamente efetivas na prevenção da formação de dienos conjugados, tanto na fase de indução (atuando como antioxidante preventivo), como na fase de propagação (atuando como antioxidante de quebra de cadeias) da peroxidação de lipídeos. São capazes, ainda, de retardar o ataque de lipídeos durante a fase de quebra das reações de prooxidação, inibindo totalmente a formação de produtos de degradação. Esses efeitos são observados mesmo em concentrações sub-micromoleculares. Desta forma, as procianidinas do cacau podem atuar como inibidoras de inflamações agudas.

Segundo Arts (1999), um chocolate amargo comercial contém 53,5mg/100g de catequina; um ao leite contém 15,9mg/100g e uma infusão de chá preto contém 13,9mg/100g. O autor conclui, portanto, que o chocolate e produtos a base de cacau representam uma boa fonte de antioxidantes.

Outra série de compostos com características antioxidantes existente em sementes de cacau são os tocoferóis.

3.3. Tocoferóis e Tocotrienóis

Bruni et al. (2002) analisaram sementes de cacau quanto à presença e quantidades de tocoferóis. Alguns resultados encontram-se na Tabela 3.4 mostrando os conteúdos em partes dessas sementes.

Tabela 3.4 Conteúdos de tocoferóis (mg/100g) em partes de sementes de cacau.

amostra	α -Tocoferol	β -Tocoferol	γ -Tocoferol	δ -Tocoferol	Total Tocoferois
invólucro	54,7	8,2	43,82	10,28	117
embrião	32,7	4,84	175	9,46	222
endosperma	2,21	1,21	38,54	5,34	47,3
	89,61	14,25	257,36	25,08	386,3
	23,20%	3,70%	66,60%	6,50%	

A Figura 3.5 mostra a estrutura básica dos tocoferóis assim como as condições das diversas variações desses compostos com as substituições dos radicais R_1 e R_2 .

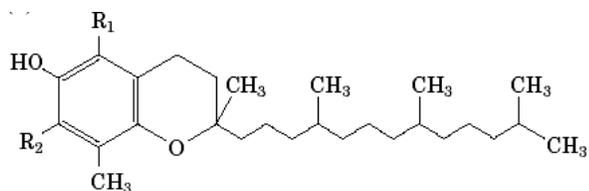


Figura 3.5. Estrutura básica dos tocoferóis

Onde:

	R_1	R_2
α - Tocoferol	CH_3	CH_3
β - Tocoferol	CH_3	H
γ - Tocoferol	H	CH_3
δ - Tocoferol	H	H

A Figura 3.6 apresenta a estrutura básica dos tocotrienóis e mostra que a diferença entre as estruturas destes compostos para os tocoferóis está na posição das ligações duplas entre átomos de carbono da parte linear da estrutura.

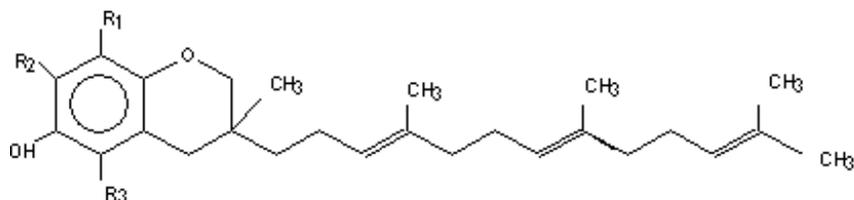


Figura 3.6. Estrutura básica dos tocotrienóis

Onde:

	R_1	R_2
α - Tocotrienol	CH_3	CH_3
β - Tocotrienol	CH_3	H
γ - Tocotrienol	H	CH_3
δ - Tocotrienol	H	H

Outras análises realizadas pelos mesmos autores Bruni et al. (2002) diz respeito às quantidades de substâncias não saponificáveis encontradas também em sementes de cacau. Estes dados são mostrados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 Fracções não saponificáveis (%) encontradas em partes de sementes de cacau

amostra	Squalene	Campesterol	Stigmasterol	Sitosterol	Δ^5 -Avenasterol	Cicloartenol	24-metileno-cicloartenol
invólucro	14	10,7	15,9	56,7		2,75	
embrião	4,4	10	6,53	71,7		7,36	
endosperma	2,58	4,03	12,2	46,1	2,87	29,7	2,59

3.4. Fluido Supercrítico (FSC)

Extração supercrítica e fracionamento de produtos de fontes naturais têm sido um dos mais recentes estudos no campo de fluidos supercríticos. Nos últimos 10 anos, estudos sobre extrações clássicas de óleos essenciais e outros óleos de várias fontes: sementes, frutas, folhas, flores, etc., com ou sem a adição de um co-solvente têm sido publicados. Extração Supercrítica de antioxidantes, fármacos, corantes e pesticidas também foram estudados nos últimos anos (REVERCHON & DE MARCO, 2006)

Um composto puro é considerado em estado supercrítico se a sua temperatura e pressão forem maiores do que os valores de temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c). Nestas condições, passa a ser denominado de fluido supercrítico (FSC) (BRUNNER, 1994).

Um fluido supercrítico apresenta boas propriedades físicas de transporte de massa que realçam sua utilização como solvente para extração. Estas condições se apresentam através da densidade e viscosidade de FSC. A sua densidade é próxima a do líquido e sua viscosidade é baixa, comparada ao seu gás. A alta densidade do FSC contribui com a grande eficiência no poder de dissolução das partículas do soluto favorecendo o seu uso como solvente em processos de extração (RIZVI, 1994).

Várias combinações como solventes de FSC já foram examinadas. Por exemplo, hidrocarboneto como hexano, pentano e butano, óxido nitroso e outros, porém, gás carbônico (CO_2) é o solvente mais conhecido e utilizado como FSC.

A única desvantagem dos processos de extração com FSC é o investimento mais alto quando comparado com as técnicas de extração tradicionais à pressão atmosférica. Porém a combinação dos processos extração mais separação é relativamente barato e muito simples de ampliação para escala industrial.

Levando-se em conta apenas trabalhos desenvolvidos na última década, verificou-se que os primeiros frequentemente usaram pressões superiores a 350 bar, até mesmo quando se utilizou CO_2 supercrítico (CO_2SC) na extração de compostos mais solúveis como terpenos, sesquiterpenos, ácidos graxos, etc. Operando desta maneira, explorou-se apenas o poder solvente do FSC. Então, o conceito de otimização entre poder solvente e seletividade passou a

ser aplicado, e, escolhidas condições operacionais adequadas para realizar uma extração seletiva de compostos de maior interesse, reduzindo a um mínimo a co-extração de compostos indesejáveis.

Separação fracionária dos extratos é outro conceito que pode ser útil para melhorar a seletividade das extrações com FSC.

Em vários casos, não é possível evitar a co-extração de compostos indesejáveis (com solubilidades diferentes, também com resistências de transferência de massa diferentes). Nestes casos, é possível executar a extração elevando-se a pressão progressivamente para obter a extração fracionária dos compostos solúveis no FSC nestas condições.

O uso de separadores em série operando à diferentes pressões e temperaturas induz a precipitação de diferentes compostos como função das condições de saturação do FSC. Por exemplo, este procedimento tem sido aplicado na extração de óleos essenciais.

3.5. CO₂ Supercrítico (CO₂SC)

O CO₂ é um solvente atóxico, não inflamável, com temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c) relativamente baixas (31,1°C e 73,8 bar), o que contribui para a sua utilização como solvente em processos de extração com fluido supercrítico, proporcionando a obtenção de produtos de alta qualidade com elevado grau de pureza. O estado físico do CO₂ pode ser descrito pelo diagrama de pressão e temperatura apresentado na Figura 3.6. O diagrama de fase pressão-temperatura do CO₂ mostra três curvas: da sublimação, de fusão e de ebulição que por sua vez limitam três regiões distintas correspondendo aos estados sólido, líquido e gasoso. A curva de ebulição termina no chamado ponto crítico. Após este ponto, encontra-se a chamada região supercrítica do CO₂ (CALAME & STEINER, 1982).

Na região supercrítica, o CO₂ apresenta a densidade de um líquido, a viscosidade de gás e a difusividade no mínimo uma ordem de magnitude maior que a dos líquidos, resultando em uma capacidade maior de transferência de massa (MADRAS et al., 1994). A extração com CO₂SC é preferível à extração com CO₂ líquido, pois as substâncias a serem extraídas estão muito mais solúveis. A taxa de extração chega até a 2,5 vezes mais alta (tendo em vista a maior difusividade no estado supercrítico) (WILLIAMS, 1981).

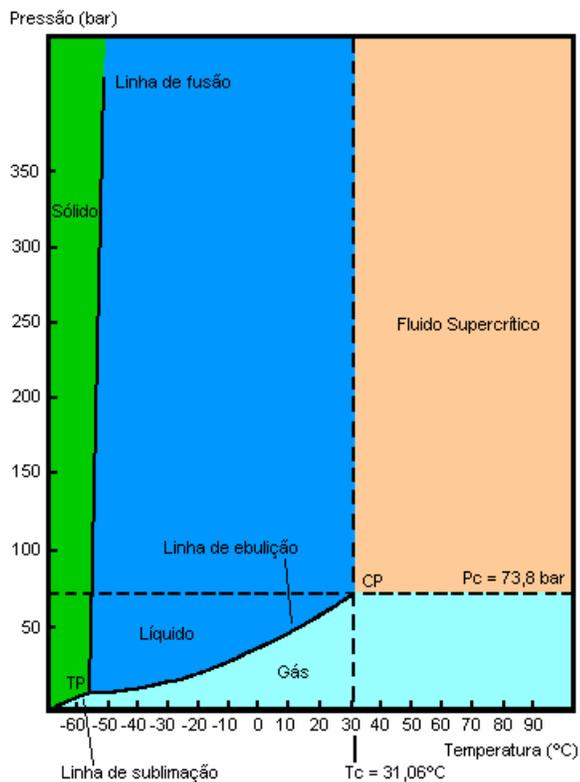


Figura 3.7. Diagrama de fase pressão-temperatura para o dióxido de carbono (SANDERS, 1993)

3.6. Processo de extração com CO₂SC

Dentre os processos de extração com FSC, a obtenção de compostos de matriz sólida pelo mecanismo extração com CO₂SC é o processo que mais se tem estudado. O esquema básico de extração consiste em um recipiente de extração carregado com o material do qual será feita a extração. Como regra, o material deve ser seco e moído para favorecer o processo de extração. O FSC e o extrato fluem para um separador onde, por despressurização, os extratos são separados do meio gasoso e coletados.

A partir de matriz vegetal onde a quantidade de extrato é elevada, os processos de extração com fluido supercrítico apresentam como resultado uma curva típica de extração caracterizada por três etapas:

- 1ª etapa de taxa constante de extração;
- 2ª etapa de taxa decrescente de extração;
- 3ª etapa de taxa de extração nula.

Esquemas de extração mais sofisticados contêm dois ou mais separadores colocados em série que permitem o fracionamento do extrato através de diferentes condições de pressão e temperatura. (DELA PORTA et. al., 1999). Pre-processamento dos sólidos também é um parâmetro que pode influenciar em grande parte o desempenho da extração. Por exemplo, qualidade da secagem, moagem e padronização do tamanho das partículas são condições que podem ser levadas em conta.

Outras possíveis variações dos processos com CO₂SC são: extração de multi-estágios e adição de co-solventes. Operação de multi-estágios é realizada quando a temperatura e/ou a pressão são variadas em cada passo de processo (GASPAR et al., 2003, SMITH JR. Et. al., 2003). Esta estratégia pode ser usada quando for requerida a extração de vários grupos de compostos da mesma matriz e que mostram solubilidades diferentes frente ao CO₂SC. A vantagem dessa estratégia está no fato de que o poder solvente do CO₂SC pode ser continuamente variado com a pressão e temperatura. Por exemplo, é possível executar uma primeira extração operando à baixa densidade do CO₂ (por exemplo, 0,29 g/cm³, 90 bar e 50 °C) e em seguida um segundo passo de extração à densidade de CO₂ alta (por exemplo, 0,87 g/cm³, 300 bar e 50°C). As frações mais solúveis são extraídas no primeiro passo (por exemplo, óleos essenciais) e as menos solúveis no segundo passo (por exemplo, antioxidantes).

Um co-solvente líquido pode ser somado ao CO₂SC para aumentar seu poder solvente para moléculas polares. CO₂SC puro, por ser apolar, é um solvente bom para frações apolares. Considerando que CO₂SC puro tem uma baixa afinidade para compostos polares vários autores utilizaram quantidades pequenas de solventes líquidos (por exemplo, álcool etílico) que é prontamente solubilizado pelo CO₂SC. Quando em solução, eles aumentam o poder solvente do CO₂SC (DAUKSAS et al., 2002, VASAPOLLO et al., 2004, GRIGONIS et al., 2005, TEBERIKLER et al., 2001). Esta estratégia tem a desvantagem de que, um poder solvente maior também diminui a seletividade e como o co-solvente encontra-se no estado líquido à pressão atmosférica, ele é coletado junto com as frações de compostos desejados exigindo, conseqüentemente um processo de separação desses compostos.

A seleção das condições operacionais depende do composto específico ou do grupo de compostos a serem extraídos. Peso molecular e polaridade também devem ser levados em conta para cada caso, mas algumas regras gerais podem ser aplicadas. Em primeiro lugar, a temperatura do CO₂SC para compostos termolábeis deve ser fixada entre 35 e 60 °C para evitar possíveis degradações térmicas. O aumento da temperatura reduz a densidade do CO₂SC (para uma pressão fixa) reduzindo assim o poder solvente do CO₂, mas aumenta a

pressão de vapor das frações a serem extraídas. Então, a tendência destas frações a passarem para a fase fluida é aumentada. Porém, o parâmetro de processo mais pertinente é a pressão de extração que pode ser usada para “afinar” a selectividade do CO₂SC. A regra geral é: pressão mais alta, maior é o poder solvente e menor é a selectividade da extração. Frequentemente, o poder solvente é descrito em termos da densidade do CO₂SC em determinadas condições operacionais. A densidade do CO₂ pode variar de aproximadamente 0,15 a 1,0 g/cm³, alterando-se a pressão e temperatura. Sua variação é fortemente não linear; então, a própria seleção dos parâmetros requer o uso de dados precisos das propriedades de CO₂.

Os outros parâmetros cruciais em FSC com CO₂ são a vazão do solvente, tamanho das partículas da matriz sólida e duração do processo (tempo de extração). A própria seleção destes parâmetros tem o poder de produzir a extração completa das frações desejadas no tempo mais curto. Eles estão relacionados às propriedades termodinâmicas (solubilidade) e as cinéticas das extrações ocorrem dentro dos parâmetros específicos de resistências à transferência de massa. A própria seleção depende do mecanismo que controla o processo: o mais lento passa a determinar a velocidade de processo global. O fluxo de CO₂SC é um parâmetro pertinente quando o processo de extração leva em conta parâmetros externos da taxa de transferência de massa: a quantidade de fluido supercrítico alimentado para o recipiente de extração determina a taxa de extração. Tamanho das partículas representa papel importante em processos de extração controlados por resistência à transferência de massa interna: um tamanho de partícula menor reduz o raio de difusão do solvente facilitando a extração. Porém, se as partículas são muito pequenas, elas podem provocar a formação de caminhos preferencias dentro do leito de extração. Neste caso parte dos fluxos de solvente passam por caminhos formados dentro do leito de extração, não ocorrendo o contato com o material a ser extraído causando uma perda de eficiência e rendimento do processo. Como regra, partículas com diâmetro entre 0,25 e 2,0mm são as mais usadas. Além disso, produção de partículas muito pequenas pode provocar a perda de frações voláteis durante a própria moagem.

Alguns processos industriais que usam CO₂SC como solvente têm sido adotados com sucesso na produção de café descafeinado e alimentos funcionais. Porém muitas outras aplicações são possíveis.

Muitos autores têm se utilizado do processo de extração CO₂SC para obterem extratos e produtos com elevado teor de pureza. Carlson et al. (2001) obtiveram óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) em um processo de extração com CO₂SC a temperaturas de 23 a 50°C e pressões de 85 a 120 bar. Nos experimentos os autores verificaram que a extração dos compostos mais pesados existentes no óleo essencial de capim limão foi

favorecida pela maior densidade do solvente. Desta forma concluíram que as melhores condições de extração acontecem quando a matriz é submetida a uma temperatura de 40°C e pressão de 120 bar, uma vez que o extrato apresentou melhor qualidade e pouca presença de ceras, especialmente na primeira hora de extração.

Para melhorar o processo de extração de compostos polares, além do uso do CO₂ supercrítico, diversos estudos têm sido desenvolvidos utilizando outros compostos como co-solvente.

Pereira et al. (2004) utilizaram CO₂SC e etanol 99% como co-solvente em um processo de extração de alcalóides de jasmim, *Tabernaemontana catharinensis*. Nesta pesquisa, os autores utilizaram 35°C de temperatura, 250 bar de pressão e 4,6% m/m (álcool/CO₂SC) de co-solvente. Obtiveram um rendimento de 44% dos alcalóides existentes na matriz vegetal.

Extração de óleo de semente de jojoba usando CO₂SC e misturas de CO₂SC+etanol foi estudada por Salgin (2006). Foram realizadas extrações às pressões de 250, 350 e 450 bar, temperaturas operacionais de 70 e 80°C, com concentrações de etanol 99% de 2, 4 e 8% m/m (etanol/ CO₂SC). O rendimento das extrações apresentou pequenas variações de acordo com as condições operacionais de pressão, temperatura, concentração de co-solvente, tamanho de partícula e taxa de fluxo solvente. Aproximadamente 80% do óleo de semente de jojoba foi extraído às pressões de 350 e 450 bar, temperatura de 70°C, 8% m/m etanol, partículas de 6,1 x10⁻⁴m., vazão dos solventes de 6,67x10⁻⁸ m³s⁻¹ e tempo de extração de 90 minutos.

A extração de polifenóis depende basicamente de duas ações: a dissolução de cada composto fenólico da matriz vegetal e a difusão destes no meio solvente externo (KALLITHRAKA et al., 1995).

De acordo com a estrutura molecular dos polifenóis, a polaridade destes compostos varia de média para alta. Por apresentarem estas características, os polifenóis requerem tempo de extração mais longo e condições mais severas de pressão e temperatura, como também a adição de quantidades e concentrações maiores de co-solvente. Previamente, todas as extrações de polifenóis foram executadas com solventes orgânicos. Estes procedimentos de extrações eram eficientes, mas os extratos não são considerados seguros para consumo humano devido a potenciais efeitos tóxicos do solvente residual. No passado, solventes, como combinações de hexano e metanol, etanol-benzeno e acetato de etila e dióxido de enxofre foram usadas. Todas estas combinações de solventes são consideradas tóxicas para consumo humano. Estas preocupações com a saúde humana intensificaram as pesquisa em métodos que

reduziriam o uso de solventes orgânicos nos procedimentos de extração (NAWAZ et al., 2006)

O etanol é preferido para extração de polifenóis, quando utilizado em alimentos, pois seu potencial de extração é apenas levemente inferior ao metanol e pode-se evitar a toxicidade de soluções metanólicas (METIVIER et al., 1980).

Nawaz et al. (2006) mostraram ser um método eficiente para extração de polifenóis de sementes de uva a utilização de etanol à proporção de 0,1 a 0,25 g/ml na relação soluto/solvente, temperatura de 23°C e extrações triplas. Nessas condições foi possível a extração de 60% dos polifenóis existentes em sementes de uva.

Chiehming *et al.* (2001) utilizaram com eficiência etanol em um processo de extração de óleo bruto de matriz vegetal. Da mesma forma Chiehming *et al.* (2000) utilizaram etanol como co-solvente em um processo de extração e separação dos polifenóis catequinas a partir do chá verde. Os pesquisadores obtiveram maiores rendimentos nas extrações com a diminuição do tamanho das partículas do soluto e redução no fluxo de solvente através do leito. Os melhores índices foram obtidos com partículas de 140 mesh e fluxo de 2,5 ml/min, a pressão de 242 bar e temperatura de 35°C. O aumento no rendimento também foi observado pela maior concentração do etanol utilizado como co-solvente. A Figura 3.8 apresenta os resultados obtidos por esses pesquisadores com relação às concentrações de cafeína, catequinas e ácido graxo extraídos do chá a pressão de 310 bar, temperatura de 35°C e com uso de etanol como co-solvente.

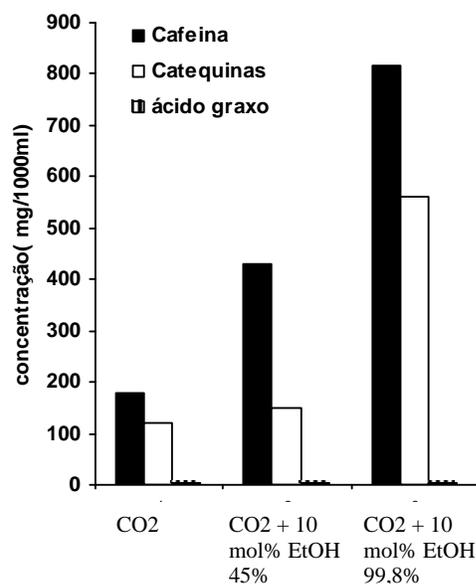


Figura 3.8. Comparação das quantidades de cafeína, catequinas e ácido graxo extraídos do chá verde sem e com a adição de co-solvente a 310 bar e 35°C (CHIEHMING et al. 2000).

Devido à necessidade de separação do co-solvente utilizado no processo de extração, alguns mecanismos devem ser utilizados para purificar e/ou concentrar o extrato obtido.

O processo de separação com membranas é um método que pode ser utilizado com sucesso para purificar e concentrar o produto final.

3.7. Processos de separação com membranas

Uma membrana pode ser definida como uma barreira capaz de separar duas fases restringindo total ou parcialmente o transporte de uma ou mais espécies químicas presentes nessa fase (MATSUURA, 1994). A Figura 3.9 mostra um esquema do processo de separação por membrana onde esta é exposta a uma diferença de potencial cujas forças motrizes mais comuns são os diferenciais de pressão e de concentração. A fase I é conhecida como retentado, enquanto que a fase II é conhecida como permeado. O fluxo ocorre provocado pelos diferenciais de concentração ou de pressão da fase I para a fase II.

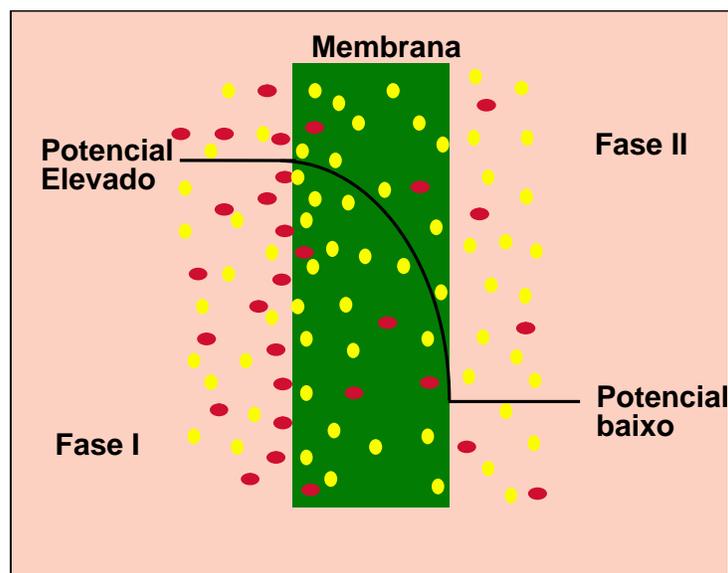


Figura 3.9. Representação esquemática do transporte de massa através de uma membrana (fonte: COPPE/UFRJ).

No campo das tecnologias de separação, os processos com membranas são com frequência, economicamente preferíveis aos processos clássicos de separação. Grande parte desses processos podem ser desenvolvidos sob condições moderadas, a ampliação de escala é fácil e o consumo de energia é geralmente baixo. Na produção de compostos com elevado

grau de pureza, a tecnologia de membranas se apresenta como uma alternativa promissora viável.

Muitos processos de separação com membranas podem ser classificados baseando-se na força motriz aplicada para realizar a separação. Uma avaliação das forças motrizes e os processos de separação correspondente são mostrados na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. força motriz e o processo de separação correlato.

Força motriz	Processo
Pressão	Microfiltração, Ultrafiltração, Nanofiltração, Osmose Inversa
Química	Pervaporação, Diálise
Elétrico	Eletrodiálise, Eletroforese
Temperatura	Destilação

A literatura sobre os diversos mecanismos utilizando membranas como meio filtrante é bastante ampla. Todos os processos que utilizam pressão como força motriz como eletrodiálise e separação de gases já são amplamente empregados industrialmente. A maioria dos outros processos, porém, ainda está em fase de desenvolvimento. Como esta tese será focada em processos de separação tendo a pressão como força motriz, nenhum comentário adicional será dado às outras técnicas.

Alguns processos de filtração utilizam membranas como os principais mecanismos de separação, dos quais destacamos a microfiltração (MF), a ultrafiltração (UF), a nanofiltração (NF) e a osmose inversa (OI).

Microfiltração é caracterizada por um tamanho de poro da membrana entre 0,05 e 2 μ m e opera a pressões menores do que 2 bar. MF é usada para separar partículas e bactérias de solutos com partículas de tamanho menor.

Ultrafiltração é caracterizada por um tamanho de poro da membrana entre 2 nm e 0,05 μ m e pressões operacionais entre 1 e 10 bar. UF é usada para separar colóides como proteínas de moléculas pequenas como açúcares e sais.

Nanofiltração (NF) utiliza membranas e constitui uma classe relativamente nova. Localizam-se entre ultrafiltração (UF) e osmose inversa (OI), e suas aplicações estão rapidamente crescendo em tratamento de água para remoção de compostos orgânicos naturais, sais, tinturas e outras moléculas de compostos orgânicos. O processo tem a vantagem de baixa pressão operacional comparadas a OI e uma alta retenção de moléculas orgânicas.

O princípio de remoção de moléculas orgânicas e íons multivalentes de solução aquosa por NF é a combinação de interação de carga de partículas e exclusão de tamanho. Em geral, a retenção de espécies orgânicas em solução aquosa pode ser predita de acordo com o ponto de corte das membranas de NF e o tamanho molecular das espécies orgânicas. Membranas de NF são semipermeáveis, com uma média de diâmetro de poro de 1 a 2 nm. Tipicamente, o ponto de corte de membranas de NF é de 100 a 1000 Daltons.

Nos últimos anos tem sido proposto o uso de membranas de NF para separação de soluções orgânicas, porém ainda são poucos os dados disponíveis na literatura sobre este assunto.

É considerado que membranas de OI não têm poros. O transporte do solvente é realizado pelo espaço livre entre os segmentos do polímero do qual a membrana é constituída. As pressões operacionais na OI são geralmente entre 10 e 100 bar e esta técnica é usada principalmente para purificar e dessalinizar água.

Desde o desenvolvimento de osmose inversa, ultrafiltração e nanofiltração, como operações de unidade práticas entre as décadas de 50 e 60, a extensão para suas aplicações tem se expandido continuamente. Inicialmente, osmose inversa foi aplicada na dessalinização de água do mar e de outras fontes. Imediatamente, novas aplicações como tratamento de águas residuárias e controle de poluição tornaram suas aplicações economicamente atraentes. Além disso, observa-se um avanço nos campos de biotecnologia e farmacologia. Juntamente com avanços no desenvolvimento de membranas, está se tornando o processo de separação cada vez mais importante quando comparado a outros processos que reduz o consumo de energia e não provoca degradação térmica dos produtos.

Com tantos processos de filtração e separação conhecidos e existentes no mercado, fica muitas vezes difícil determinar qual o tipo de tecnologia se adapta melhor a uma necessidade específica. Para saber como otimizar as formas de separação, é necessário se conhecer, por exemplo, as características das partículas a serem separadas. Uma vez tendo este conhecimento, torna-se mais fácil a determinação de qual sistema de filtração poderá apresentar os melhores resultados. O espectro de filtração (Figura 3.10) é um caminho prático para orientar qual o tipo de filtração é mais adequado. O espectro é um gráfico que mostra uma série de tamanhos de partículas e qual o tipo de filtração é usado para cada série. Este espectro é dividido basicamente em 5 grandes séries: macro-partículas, micro-partículas, macromolecular, molecular e partículas iônicas.

Macro-partículas são visíveis a olho nu cujos tamanhos encontram-se na faixa de 50 a 1000 μm . Exemplos de partículas nesta faixa de tamanho incluem-se areia, cabelo e pólen de

plantas. Micro-partículas não são visíveis a olho nu e para sua visualização é necessário o emprego de microscópio. Nesta faixa de partículas encontram-se os tamanhos de 0,05 a 2 µm.

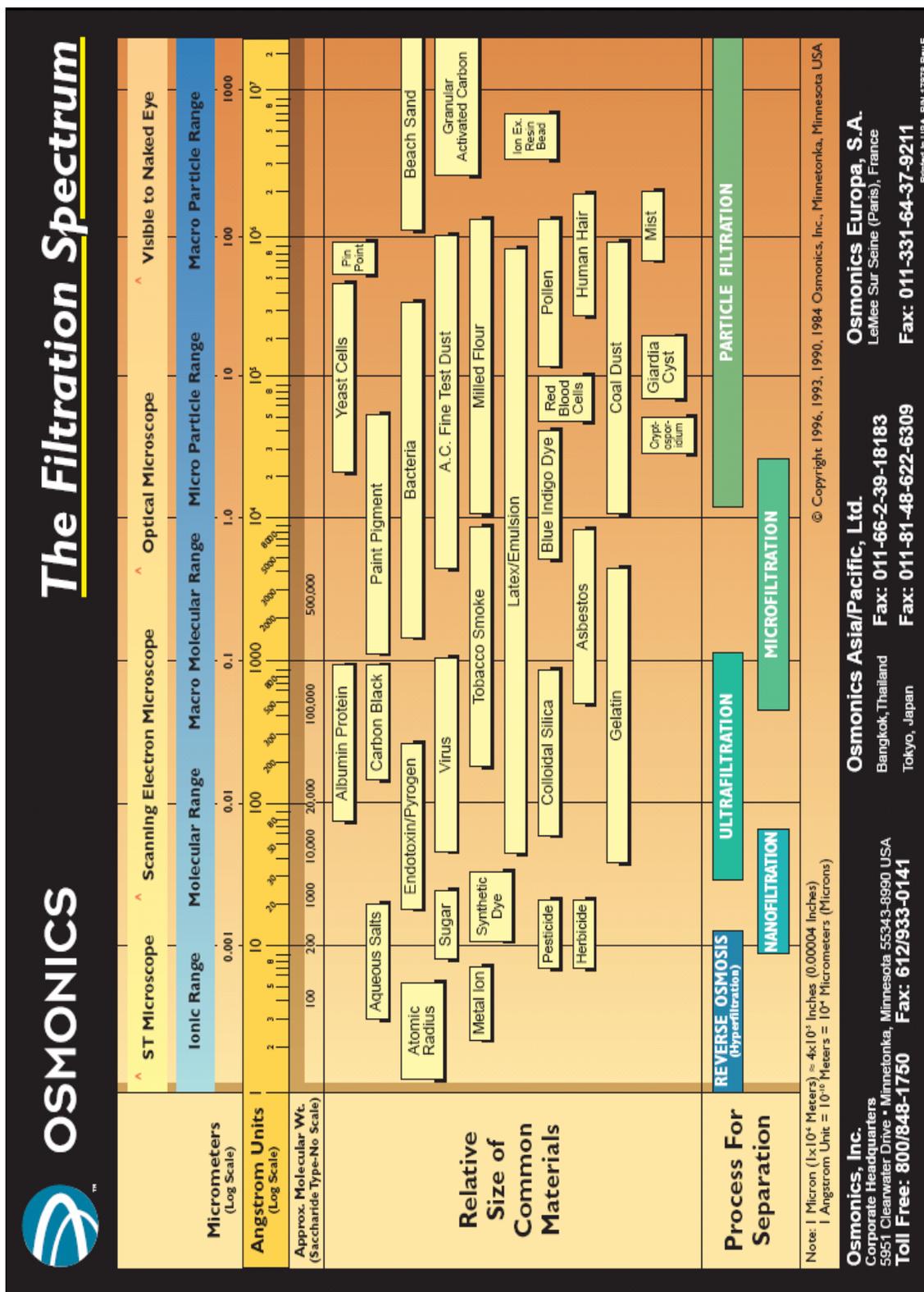


Figura 3.10. Espectro de filtração (Fonte: Osmonics, www.gewater.com/library/index, 2006)

Alguns exemplos são bactérias e glóbulos vermelhos. Para retenção deste tipo de partículas pode ser usada a microfiltração.

Partículas cujos tamanhos variam de 0,00005 a 0,05 μ m encontram-se em nível molecular e partículas iônicas e só podem ser visíveis com o auxílio de microscópio eletrônico de varredura e para separação de partículas com estas características podem ser usadas OI, NF ou UF.

A seleção de membranas oferecidas pelos vários fabricantes nem sempre é tarefa fácil, uma vez que nem todos fornecem especificações precisas sobre o material com os quais as membranas são preparadas. Na realidade, relativamente poucos materiais são realmente usados em larga escala.

Acetato de celulose (AC) foi o primeiro material a ser empregado e é usado para OI, NF, e UF. O material apresenta várias limitações, principalmente com respeito a pH, temperatura e pode ser degradado por microorganismos. As vantagens principais de AC é seu baixo custo e o fato de ser hidrofílico.

Polissulfona (PSO) tem sido usado principalmente na confecção de membranas de MF e UF. A vantagem principal da PSO é sua excepcional resistência a altas temperaturas e ampla faixa de pH. PSO é um dos polímeros mais utilizados na preparação de membranas empregada em processos de indústrias de alimentos, principalmente laticínios. Como regra geral, membranas de PSO não toleram óleo, graxa, gordura e solventes polares. Porém, há um tipo de membrana de PSO hidrófila que pode atuar bem com emulsões de óleo.

Polifluoreto de vinilideno (PVDF) é um material de membrana tradicional, mas não é muito usado porque é difícil de produzir membranas com características de separação consistentes. Sua vantagem principal é sua alta resistência a hidrocarbonetos.

Para um bom processo de separação, as membranas devem prover diferenças de interação e afinidade entre vários componentes de uma mistura. Um método para separação de componentes biologicamente ativos é introduzir grupos funcionais específicos para cada constituinte na membrana. PVDF é um polímero de importância tecnológica e industrial por causa de sua resistência química, durabilidade e biocompatibilidade. Este polímero é extensamente usado na confecção de membranas de ultrafiltração geralmente empregadas em indústrias de alimentos e medicamentos. Por serem originalmente hidrofóbicas, estas membranas apresentam problemas quando utilizadas na separação de proteínas principalmente em soluções aquosas. Portanto, é vantajoso minimizar estes efeitos modificando as propriedades de superfície de PVDF hidrofóbico tornando-o hidrofílico.

Thin-film também chamadas membranas compostas, aparecem sob várias siglas como TFC e TFM. Foram criadas basicamente para substituir acetato de celulose em membranas de OI. A vantagem principal é a combinação de alto fluxo e altos índices de retenção de sais. Também apresentam boa resistência a temperaturas e pH. Atualmente, membranas *thin-film* de NF e OI têm sido empregadas com sucesso em processos de separação de compostos orgânicos em soluções não aquosas.

A retenção de sal é uma medida de como uma membrana rejeita a passagem de íons dissolvidos. Embora uma membrana possa ser adequada para reter muitos íons diferentes, cloreto de sódio (NaCl) é geralmente usado como um padrão de medida. Com poucas exceções, membranas de NF são capazes de reter íons divalentes com maior eficiência que íons monovalentes. Então, se uma membrana exibir excelente retenção de NaCl, pode-se esperar que a membrana execute até melhor retenção de tais íons divalentes como ferro, cálcio, magnésio, e sulfato. Assim, retenção de NaCl foi adotada universalmente como o padrão para medir o desempenho de retenção de uma membrana.

É importante lembrar que, enquanto o foco for as características em termos de retenção de contaminantes iônicos, membranas também podem ser usadas para remover, ou pelo menos tolerar, outras impurezas, inclusive orgânicas e gases. Sua avaliação também deveria incluir análise de capacidade de remover ou tolerar estes contaminantes não-iônicos.

Também é importante ter em mente que a avaliação de desempenho de uma membrana a longo prazo, envolve consideração além da retenção de sal. Fluxo de permeado, exigências de pressão e temperatura do sistema, resistência ao ataque químico, durabilidade e outras. Cada um destes fatores pode afetar a produtividade global do sistema e os custos operacionais associados a isto.

Osmose inversa (OI), como o nome indica, é a resultante de uma osmose natural contraposta e invertida por meio de uma pressão mecânica superior a pressão osmótica da solução. Pressão osmótica é uma propriedade termodinâmica de soluções que se manifesta na presença de uma membrana semipermeável. Em soluções diluídas, a pressão osmótica pode ser determinada pelo modelo de Van't Hoff, enquanto que o modelo de Gibbs pode ser usado para altas concentrações. Estes modelos podem ser descritos pelas Equações (3.1) e (3.2).

A pressão osmótica varia com a concentração e a massa molar do soluto de forma aproximadamente linear em taxas de baixa concentração que é de interesse em muitas aplicações práticas.

$$\Pi = CRT \quad (\text{Van't Hoff}) \quad (3.1)$$

$$\Pi = -\frac{RT}{V} \ln x \quad (\text{Gibbs}) \quad (3.2)$$

Onde:

Π = pressão osmótica;

C = concentração do soluto;

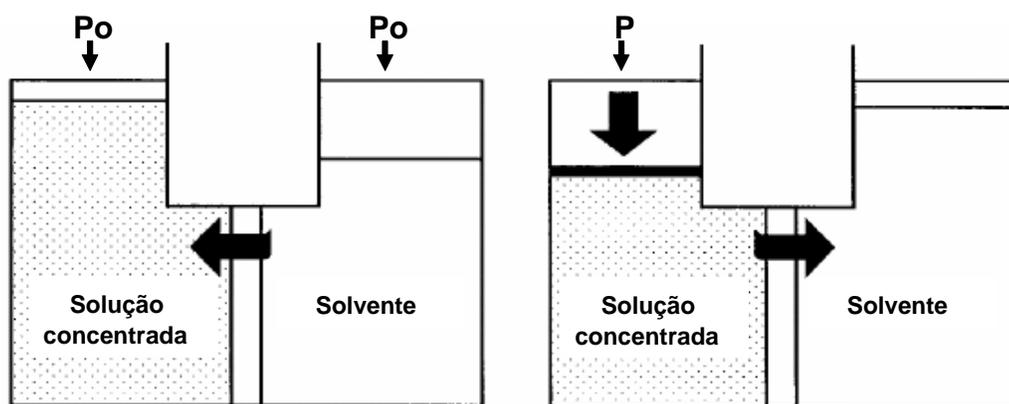
R = constante dos gases ideais;

T = temperatura absoluta;

V = volume parcial do solvente;

x = fração molar do solvente.

Na Figura 3.11 encontra-se demonstrado o fenômeno de osmose direta e inversa.



(a) Osmose direta

(b) Osmose inversa

Figura 3.11. Representação esquemática da osmose direta e inversa.

Na Figura 3.11 (a) cada compartimento está submetido à pressão atmosférica P_o . Existe uma pressão osmótica Π que faz com que o solvente se desloque em direção à solução mais concentrada no sentido do equilíbrio das pressões osmóticas entre os compartimentos. Podemos inverter o sentido da migração aplicando à solução uma pressão $P > P_o + \Pi$ de modo que se inverta o sentido da osmose natural criando o efeito de osmose inversa conforme apresentado na Figura 3.11 (b).

Do ponto de vista hidráulico, um fluido pode ser considerado como uma resistência que provoca perda de carga entre as faces do meio filtrante. Para escoamento em que o

número de Reynolds (Re) é muito pequeno em leito fixo, a taxa de escoamento é diretamente proporcional ao diferencial de pressão aplicado e inversamente proporcional a viscosidade do fluido e ao comprimento do leito. Isto é a base para a equação da Lei de Darcy, dada pela equação (3.3).

$$v' = \frac{q'}{A} = \frac{K \cdot \Delta P}{\mu \cdot \Delta L} \quad (3.3)$$

Onde:

v' = velocidade superficial baseada na seção transversal do escoamento;

q' = taxa de fluxo;

A = área da seção transversal;

K = permeabilidade do meio;

ΔP = diferencial de pressão

μ = viscosidade do fluido;

ΔL = comprimento do meio.

De acordo com a Lei de Darcy a inclinação da reta apresentada na Figura 3.12 fornece o a permeabilidade de uma membrana.

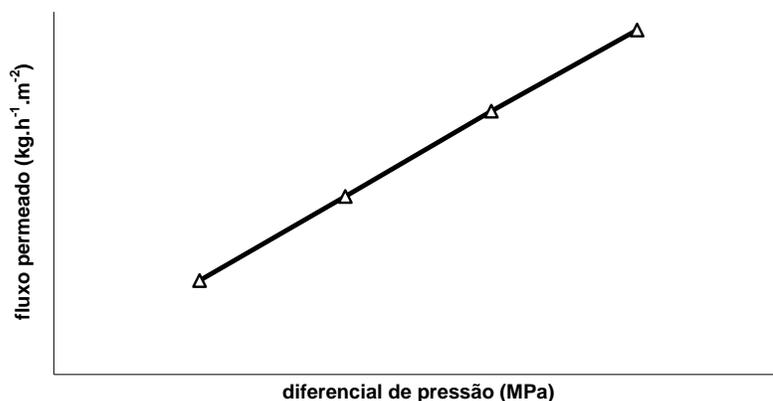


Figura 3.12. Representação esquemática de uma curva obtida pelas medidas de fluxo permeado estacionário através de uma membrana em função do diferencial de pressão aplicado.

Os processos de OI utilizam membranas semipermeáveis enquanto que as microporosas são utilizadas em processos de NF e UF em diversas configurações como

tubular, fibra oca, “*plate and frame*” e em espiral. A configuração em espiral é uma das mais comuns para filtração em fluxo tangencial (“*cross flow*”). O fluxo tangencial possibilita uma ação turbulenta de limpeza da face da membrana exposta ao retentado reduzindo a polarização por concentração.

A OI, NF e UF são consideradas as formas mais finas de filtração atualmente conhecidas. A osmose inversa permite somente a passagem da água pura ou de partículas muito pequenas cujo tamanho se equivale ao das moléculas de água.

A maior parte dos processos que utilizam separação por osmose inversa usam o sistema de fluxo tangencial (“*cross flow*”) para fazer com que a membrana sofra menos a influência da formação da película de líquido sobre a face do lado do retentado. A filtração com membranas de OI é capaz de reter substâncias de massa molar menor do que 200 Daltons e necessita da aplicação de uma força motriz cuja forma mais comum é a pressão para fazer com que o solvente escoe através da membrana. Como a concentração do fluido retido aumenta com o tempo, é necessária a aplicação de pressões maiores para manter o fluxo.

Os processos de filtração utilizando membranas têm aplicações importantes onde se destacam a clarificação de sucos e bebidas, dessalinização da água do mar, tratamento de água para abastecimento de comunidades e de resíduos líquidos industriais.

Dentre os processos de separação por membranas, podemos destacar o sistema combinado de extração com fluidos supercríticos e separação.

Processos envolvendo fluidos nas condições supercríticas, são normalmente caracterizados como grandes consumidores de energia quando se pretende recuperar as condições de operação, caracterizada principalmente pela repressurização do solvente. As diversas etapas da operação de extração utilizando como solvente um fluido supercrítico podem ser chamadas de ciclo do fluido supercrítico (CFSc). O consumo de energia no CFSc é minimizado sensivelmente pelo uso combinado de processos de extração com separação com membranas.

Diversas membranas foram testadas para separação de CO₂SC e etanol (SEMENOVA et al., 1992), CO₂SC e petróleo (HIGASHIJIMA et al., 1995) alcançando diferentes graus de separação e verificando-se uma dependência linear entre o fluxo permeado e o diferencial de pressão aplicado.

Álvarez et al., (2001) utilizaram membrana comercial de osmose inversa modelo MSCB 2521, R99, (SEPAREM, SPA, Biella, Itália) em testes de retenção de aromas em processo de concentração de suco de maçã, onde as condições de trabalho foram 15 a 35 bar

de pressão e temperatura de 15 a 30 °C, obtendo-se uma retenção média de 90% dos aromas cujas massas molares variam entre 74 a 130 Daltons.

Mais recentemente, diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos no sentido de caracterizar membranas poliméricas com objetivo de separação de compostos específicos ou de possíveis alterações de produtos quando submetidos a processos de filtração para purificação ou clarificação. Alguns desses estudos consistem em remoção de contaminantes orgânicos através de membranas de OI e NF (YEOMIN & RICHARD , 2005), estudo comparativo entre membranas de OI e NF no tratamento de efluentes de indústria láctea (BALANNEC et. al., 2005) e os efeitos da filtração sobre alguns compostos fenólicos em vinho tinto (ARRIAGADA-GARRAZANA et al., 2005).

Uma peculiaridade está sempre presente nos processos de separação com membranas. Trata-se da afinidade existente entre os componentes da alimentação e a membrana que pode influenciar na separação. Esta afinidade entre os componentes e o polímero com o qual é confeccionada a membrana pode causar a dilatação das cadeias do polímero afetando, assim, sua seletividade. Este fenômeno de dilatação (aumento de volume) em processo de separação de gás como CO₂, é conhecido como plasticização do polímero pelo gás e tem recebido atenção de pesquisadores (SPRICIGO et al., 2001, VILAPLANA et. al., 2003, GUO & CHUNG, 2005). Alguns casos de dilatação provocam mudanças irreversíveis através de rearranjo da cadeia do polímero, alterando o espaço intersticial e densidade da cadeia. Conseqüentemente, a dilatação da membrana em operações prévias pode afetar o volume livre e inevitavelmente sua distribuição da camada denso-seletiva alterando a resistência ao transporte e desempenho da separação para as operações subseqüentes. O desempenho de uma membrana é determinado, então, não só pelo material da membrana e sua estrutura morfológica mas também é dependente das condições de operação e possibilidade de interações entre os componentes da mistura e o material da membrana.

É sabido que membranas poliméricas em contato com solventes orgânicos tendem a “inchar” e reduzir a capacidade de separação. Por exemplo, Niwa et al. (1988) testaram diversas membranas de OI frente a concentrados aquosos de metil etil cetona, tetrahydrofurano e acetato de etila, observaram que em concentrações orgânicas acima de 8% ocorreu dilatação dos polímeros fazendo com que as membranas perdessem suas capacidades de separação. Fenômeno semelhante foi observado por Oikawa et al. (1991) com soluções alcoólicas de etanol, iso-propanol e iso-butanol em concentrações superiores a 20%.

Atualmente o desenvolvimento de membranas resistentes a solventes orgânicos é a direção que tem sido tomada pelas pesquisas. Dentro desta perspectiva já foi demonstrado que

alguns micropoluentes como pesticidas (por exemplo, atrazina) podem ser removidos efetivamente pelo uso de membranas de OI e com menor eficiência pelo uso de membranas de NF. A retenção de pesticidas por membranas de OI e NF leva em conta as propriedades físico-químicas da solução (por exemplo, massa molar das partículas, solubilidade, difusividade, polaridade e hidrofobicidade), propriedades das membranas (por exemplo, permeabilidade, tamanho dos poros, hidrofobicidade e carga) e condições operacionais (por exemplo, fluxo, pressão transmembrana e índices de recuperação ou de retenção). Kimura et al., (2003) testaram o comportamento de duas membranas de NF e OI de poliamida com característica polar frente à soluções contendo compostos orgânicos como ácido dicloroacético, tricloroacético, salicílico, bisfenol, diclofenac e outros. Levando-se em conta a polaridade das moléculas do soluto, os resultados indicaram que os índices de retenção de moléculas polares variaram de 91 a 94% para membrana de NF e de 92 a 96% para membrana de OI. Para moléculas apolares os índices de retenção foram de 12 a 87% para membrana de NF e de 43 a 99% para membrana de OI.

Em processos combinados de extração com CO_2SC e separação com membranas, a permeabilidade seletiva do CO_2SC produz um excesso de extrato no retentado, provocando, deste modo, uma concentração de soluto superior à concentração média do produto. O acúmulo de soluto sobre a membrana provoca um aumento da viscosidade do fluido e, conseqüentemente, uma redução do fluxo permeado através da membrana. Este fenômeno é conhecido como concentração de polarização e está representado esquematicamente na Figura 3.13.

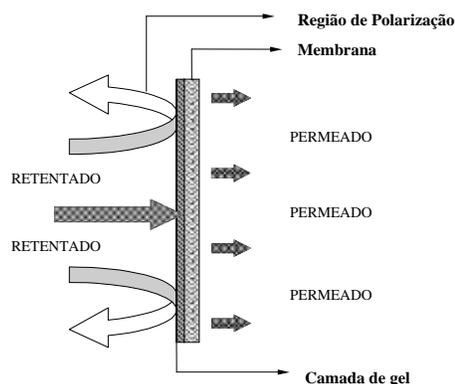


Figura 3.13. Representação esquemática da teoria do filme, que representa o fenômeno de concentração de polarização e colmatagem da membrana.

Quando a concentração for capaz de provocar a precipitação de substâncias formando uma camada de gel, esta se comporta como um aumento da espessura da membrana no fenômeno conhecido como colmatagem. Nestas condições o CO₂ encontra uma resistência adicional para permear a membrana (SARTORELLI & BRUNNER, 2001).

O fluxo através de uma membrana pode sofrer uma redução de até 80% com o tempo de operação. Definido como um decréscimo que pode levar minutos ou até meses, é resultado da interação da membrana com componentes da alimentação num processo de separação (PERRY & GREEN, 1997). Pode-se considerar compactação ou o “fouling” a causa da queda do fluxo através de uma membrana? Por alguns anos a compactação foi considerada a principal razão para este fenômeno. Recentemente algumas conclusões obtidas de testes realizados usando filtração de água pura, indicam que a compactação é menos importante do que “fouling” (RUDIE et al., 1985). “Fouling” é um termo amplo e genérico usado para identificar vários fenômenos que sozinhos ou combinados alteram o desempenho de uma membrana pelo bloqueio dos poros e resulta em forte adsorção de partículas nas paredes desses poros (VADI & RIZVI, 2001).

O efeito da polaridade dos solventes altera as características de hidrofiliicidade ou hidrofobicidade das membranas. Interações membrana-solvente e suas conseqüências sobre a permeabilidade de solventes têm sido investigadas em membranas poliméricas e cerâmicas por diversos autores. Muitas membranas comerciais, após serem produzidas, são preservadas com glicerol (SHUKLA & CHERYAN, 2002). Antes de serem usadas, estas membranas devem ser condicionadas através de lavagem e expostas por um período de pelo menos 5 horas a um solvente para a remoção do glicerol. Este procedimento também altera a polaridade da membrana e, conseqüentemetnte, as características de hidrofiliicidade ou hidrofobicidade.

3.8. Processo combinado de extração supercrítica e separação com membranas

A associação dos processos de separação por membrana e de extração supercrítica de compostos de matrizes vegetais com CO₂SC, pode ser uma alternativa para redução dos custos de recompressão derivados da expansão do solvente para separação do extrato. Isto porque a membrana possibilita a separação do CO₂SC dos demais compostos aplicando-se um pequeno diferencial de pressão transmembrana sem a necessidade de expansão do solvente, facilitando a repressurização e reutilização do CO₂ ainda nas condições supercríticas.

Uma membrana de osmose inversa de acetato de celulose foi testada em um processo combinado por Spricigo et al., (2001) para a separação de óleo essencial de noz moscada e CO_2SC nas condições de extração, obtendo-se uma retenção média do óleo de 96,4% sendo que a membrana apresentou boa resistência mecânica às condições severas de pressão (até 40 bar de pressão transmembrana) apresentando, também, boa permeabilidade do CO_2SC .

4.MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos apresentados neste trabalho foram realizados em duas etapas em planta piloto do Laboratório de Controle de Processos (LCP) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCP/ENQ/UFSC).

Na primeira etapa foram identificadas as melhores condições de obtenção do extrato pelo processo de extração com etanol, com solvente supercrítico puro e com a mistura do CO₂SC com o etanol. Para reduzir o número de experimentos definidos pelo planejamento experimental, foram realizados alguns ensaios preliminares de extração utilizando-se apenas etanol 50GL e anidro a pressão atmosférica, CO₂SC e etanol 50GL e anidro a 80 e 150 bar.

Na segunda etapa, procedeu-se à caracterização das membranas efetuando-se medidas dos fluxos de CO₂SC e de extrato, além da medida dos índices de retenção dos compostos desejados, resultando na definição das membranas com melhores características para a separação do extrato e solvente, ou dos polifenóis.

4.1.Solvente

O solvente utilizado foi o dióxido de carbono (CO₂) com 99,95% de pureza (White Martins- Brasil) nas condições supercríticas (CO₂ SC). A Tabela 4.1 apresenta os valores da densidade do CO₂SC a 40°C.

As densidades mostradas na Tabela 4.1 foram calculadas utilizando-se o programa Equation of State for Windows 95 Versão 1.0.14 programmed by David Bush.

Tabela 4.1. Valores da densidade do CO₂SC a 40°C

Pressão (Bar)	Densidade (g/cm ³)
80	0,278
90	0,484
100	0,628
110	0,684
120	0,719
130	0,744
140	0,764
150	0,781

4.2. Co-solvente

De acordo com experimentos realizados por diversos pesquisadores (TEBERIKLER et al., 2001, DAUKSAS et al., 2002, VASAPOLLO et al., 2004, GRIGONIS et al., 2005, SALGIM, 2006 e NAWAZ et al., 2006) a adição de um co-solvente pode melhorar o rendimento das extrações. Neste trabalho foi proposto o uso do etanol 92,8° GL (d = 0,80 a 40°C) e 85° GL (d = 0,82 a 40°C). Nos ensaios preliminares o etanol utilizado foi 50° GL (d = 0,92 a 40°C) e etanol anidro (d = 0,78 a 40°C).

4.3. Membranas

As membranas utilizadas foram de osmose inversa (OI), modelo SG, Osmonics (EUA) e modelo BW-30 FilmTec (EUA), nanofiltração (NF), modelos DL e HL, Osmonics (EUA) e NF e NF-90 FilmTec (EUA).

As especificações fornecidas pelos fabricantes dessas membranas são as seguintes:

Modelo SG:

- **Osmose inversa**
- **Membrana:** Thin-film membrane (TFM)
- **Condições típicas de operação <122°F (50°C):** 200 psig (1,379 kPa) (13,79Bar)
- **Pressão máxima:** 600 psig (4,137 kPa) (41,37Bar).
- **Temperatura máxima:** 158°F (70°C).

Modelo DL:

- **Nanofiltração**
- **Membrana:** Thin-film membrane (TFM).
- **Condições típicas de operação:** 70-400 psig (483-2,758 kPa) (4,83 – 27,58Bar).
- **Pressão máxima:** 137 kPa) (41,37Bar).
- **Temperatura máxima:** 122°F (50°C).

Modelo HL:

- **Nanofiltração**
- **Membrana:** Thin-film membrane (TFM)
- **Condições típicas de operação:** 70-300 psig (483-2,069 kPa) (4,83 – 20,69Bar)
- **Pressão máxima:** 137 kPa) (41,37Bar).
- **Temperatura máxima:** 122°F (50°C).

Modelo NF:

- **Nanofiltração**
- **Membrana:** Polipiperazina amida -Thin-film membrane (TFM)
- **Pressão máxima:** 600 psig (41Bar).
- **Temperatura máxima:** 113°F (45°C).

Modelo NF-90:

- **Nanofiltração**
- **Membrana:** poliamida -Thin-film membrane (TFM)
- **Pressão máxima:** 600 psig (41Bar).
- **Temperatura máxima:** 113°F (45°C).

Modelo BW-30:

- **Osmose inversa**
- **Membrana:** poliamida - Thin-film membrane (TFM)
- **Pressão máxima:** 600 psig (41Bar).
- **Temperatura máxima:** 113°F (45°C).

Outras especificações das membranas fornecidas pelos fabricantes são mostradas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Características das membranas utilizadas fornecidas pelos fabricantes.

Modelo	Tipo	Fabricante	Retenção(%)*	Sal	Pressão(bar)
SG	OR	Osmonics	98,5	NaCl	15,5
DL	NF	Osmonics	96,0	MgSO₄	6,9
HL	NF	Osmonics	98,0	MgSO₄	6,9
NF	NF	Filmtec/Dow	99,0	MgSO₄	8,9
NF-90	NF	Filmtec/Dow	97,7	MgSO₄	4,8
BW-30	OR	Filmtec/Dow	99,5	NaCl	15,3

*Índices de retenção medidos para concentrações de 2000 ppm das soluções salinas na alimentação.

4.4. Amostras de Cacau

As amêndoas de cacau, da variedade Pará, foram fornecidas pela empresa Joanes Industrial S/A – Produtos Químicos e Vegetais – ADM Cocoa, (Ilhéus, Bahia, Brasil). Estas sementes são identificadas nesse trabalho como “com gordura” (C/G).

As sementes de cacau desengordurado foram fornecidas pela empresa Duas Rodas (Jaraguá do Sul, Santa Catarina, Brasil) que as adquiriu da Fazenda Boa Esperança (Ilhéus, Bahia, Brasil) e são identificadas nesse trabalho como “sem gordura” (S/G). A extração da gordura das sementes de cacau foi realizada pela prensagem, utilizando-se uma prensa *Expeller* Piratininga modelo R-158 com cozedor vertical de dois estágios operando a 70°C. Os dois tipos de sementes foram triturados em um moedor a facas modelo MA – 580 (Marconi, Piracicaba – SP) acoplado a uma peneira de 30 mesh.

4.5. Análises Cromatográficas

Para a determinação de polifenóis, pesaram-se 8 gramas de amostra que foram submetidas à tripla extração com 45 ml de hexano para remover lipídios. Após isso, secaram-se as amostras através de fluxo de ar aquecido em uma capela de laboratório para remover o hexano residual. Aproximadamente 1 grama do material foi extraído com 5 ml de acetona, água e ácido acético com uma proporção em volume entre os solventes de 70:29,5:0,5, respectivamente. Os sólidos foram centrifugados durante 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi filtrado utilizando-se um filtro de politetrafluoretileno e coletado em um vial para posterior análise em HPLC. Todas as amostras foram pesadas, extraídas e injetadas no cromatógrafo em duplicata.

Foi utilizado um equipamento Agilent Série 1100 HPLC, equipado com uma bomba quaternária, injetor automático e forno para colunas com detector de UV-VIS variável e com detector de fluorescência. Para a separação da fase normal de oligômeros de procianidinas foi utilizada uma Coluna Phenomenex 5µm Luna Silica (250x4,60 mm). A fase ternária móvel consistiu em (A) diclorometano, (B) metanol e (C) ácido acético em água (1:1 v/v). As separações foram conduzidas por uma série de gradientes lineares de B para A com a constante de 4% C com uma taxa de fluxo de 1 mL/min como segue: eluição inicial com 14% B em A; 14-28,4% B em A, 0-30 min, 28,4-39,2% B em A, 30-45 min; 39,2-86% B em A, 45-50 min.

4.6. Equipamentos para extração a alta pressão e separação com membranas

Os equipamentos para extração a alta pressão e separação com membranas, estão esquematizados nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3 e se encontram instalados no Laboratório de Controle de Processos (LCP) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. Os equipamentos foram montados, automatizados pela instalação de diversos equipamentos eletrônicos que permitem a operação e monitoramento das operações, pelo uso de software específico.

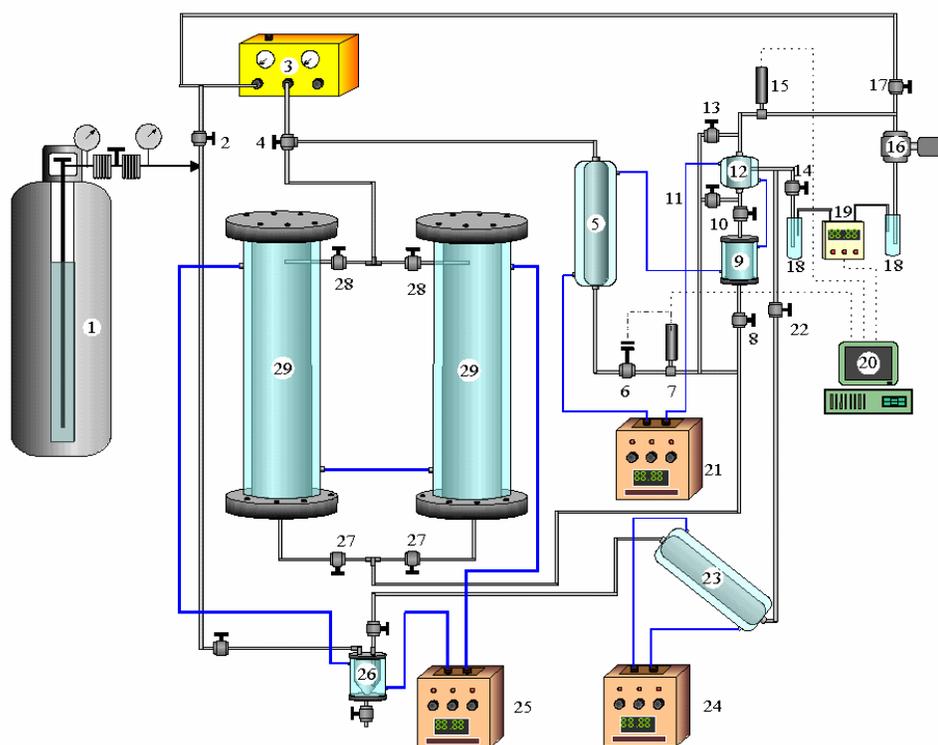


Figura 4.1. Equipamento de extração a alta pressão e separação com membranas.

(1) cilindro de CO₂, (3) booster, (5) tanque pulmão, (6) válvula pneumática, (7) e (15) transdutores de pressão, (9) célula de óleo essencial, (12) célula de membranas, (16) válvula back pressure, (18) coletores, (19) medidor de vazão, (20) computador PC, (21), (24) e (25) banhos termostáticos, (23) separador de ceras, (26) separador de óleo essencial, (2), (4), (8), (10), (11), (13) (17) (22) e (27) válvulas controladoras de fluxo, (29) extratores.

A Figura 4.2 mostra uma fotografia da planta piloto destinada aos processos de extração e separação com membranas mostrados esquematicamente na Figura 4.1.



Figura 4.2. planta piloto de extração e separação com membranas. (fonte LCP/ENQ/UFSC) (01) booster, (02) e (03) extratores, (04), (05), (06) e (07) banhos termostáticos, (08) e (09) células de membranas, (10) separador de ceras, (11) separador de extrato, (12) válvula back pressure.

Para os experimentos de identificação das condições de obtenção do extrato pelo processo de extração supercrítica, utilizando-se CO_2SC como solvente puro, ou pela adição do etanol como co-solvente (primeira etapa dos experimentos), foram separados do sistema, os equipamentos identificados de acordo com a Figura 4.3.

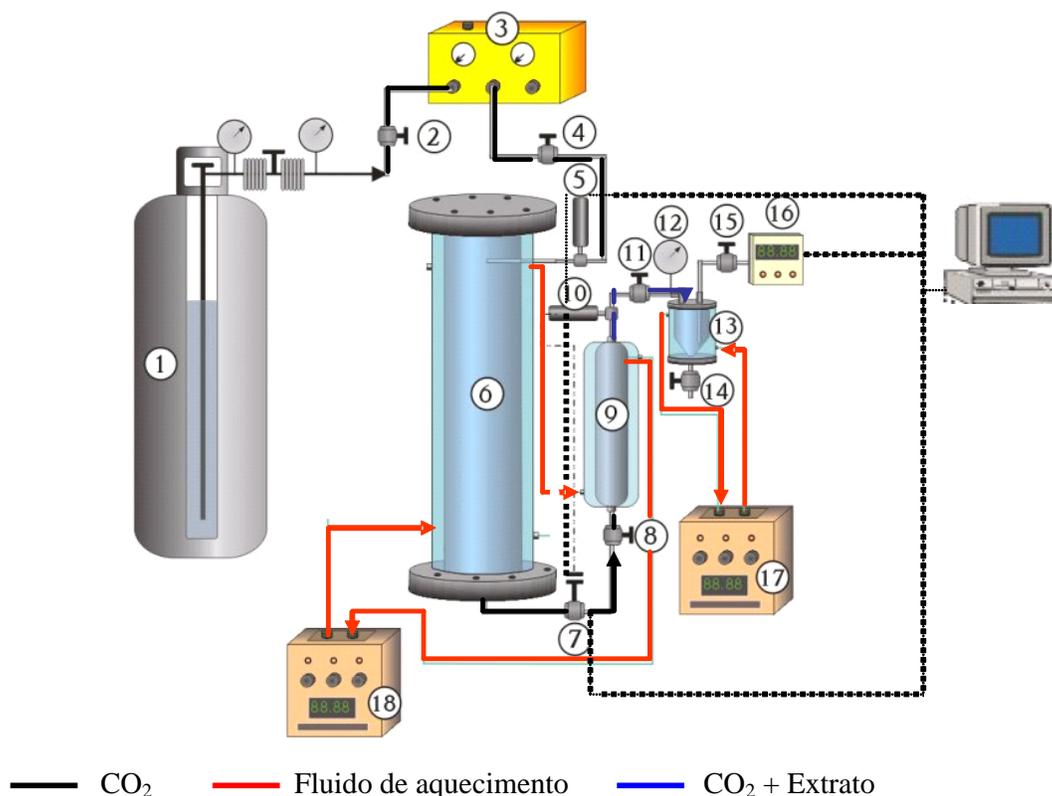


Figura 4.3. Equipamento de extração a alta pressão.

(1) cilindro CO₂, (2-4-8-11-14-15) válvulas de controle de vazão, (3) booster, (5-10) transdutores de pressão, (6) tanque pulmão, (7) válvula pneumática, (9) extrator, (12) manômetro, (13) coletor do extrato, (16) medidor de vazão, (17-18) banhos termostáticos.

Na Figura 4.3 o cilindro (1) fornece CO₂ líquido ao tanque pulmão encamisado (6). A pressão no tanque pulmão foi mantida nas condições de trabalho por um booster (3) Modelo DLE 15-1 (MAXPRO Technologies, Alemanha). O CO₂SC foi enviado ao extrator (9) e posto em contato com as amostras de cacau moído. A pressão de trabalho no tanque pulmão e no extrator foi monitorada pelos transdutores de pressão (5 e 10) Modelo RTP12/BE53R, AEP, Precisão de $\pm 0,05$ bar (Modena, Itália) e controlada pela válvula pneumática (7) Modelo 807 (Badger Meter, EUA). O extrato foi coletado no separador-coletor (13). A vazão do CO₂SC foi indicada pelo medidor de vazão (16) Modelo PV005LPMOCC (Key Instruments, EUA). A temperatura no tanque pulmão, no extrator e no separador-coletor foi mantida pelos banhos termostáticos (17 e 18).

Todos os experimentos foram realizados à temperatura de 40°C devido a afinidade do etanol com o gás carbônico supercrítico nesta temperatura, em diferentes pressões.

Os experimentos preliminares foram realizados às pressões de 1, 80 e 150 bar e 40°C, de acordo com a Tabela 4.3.

Nas extrações realizadas a pressão de 1 bar, utilizando-se apenas o etanol como solvente. Nesses casos, o solvente foi adicionado diretamente à amostra de cacau em um becker de 100ml. Após agitação com bastão de vidro, o becker for recoberto com papel alumínio e deixado por 1 hora em repouso com agitações a cada 15 minutos. Após, o extrato foi filtrado em papel filtro.

Para os demais experimentos, o etanol foi utilizado com co-solvente. As porcentagens de etanol utilizadas foram de 10 a aproximadamente 200% em relação às massas das amostras de cacau.

Tabela 4.3. Condições de trabalho dos experimentos preliminares realizados durante as extrações à temperatura de 40°C.

Experimento	Tipo da amostra	Pressão (Bar)	Graduação do etanol (GL)	massa da amostra (g)	volume de etanol (ml)	Volume de etanol (%)
1	C/G	80		69,1	0	0
2	C/G	150		68,8	0	0
3	C/G	150	92,8	74,5	8	10
4	C/G	80	92,8	70,3	70	100
5	C/G	150	92,8	73,6	73	100
6	C/G	150	92,8	63,2	120	200
7	C/G	150	85	71,4	72	100
8	S/G	80	92,8	72,1	72	100
9	S/G	1	85	25,8	62	200
10	S/G	1	92,8	24,7	61	200
11	S/G	1	anidro	24,8	64	200
12	S/G	80	50	50,6	110	200
13	S/G	80	anidro	49,2	125	200

C/G amostra com gordura

S/G amostra sem gordura

Os experimentos preliminares orientaram a elaboração de um planejamento experimental 2^3 levando-se em conta os níveis e fatores estabelecidos na Tabela 4.4 que definiram os experimentos definitivos para a obtenção do extrato rico em polifenóis. Este planejamento experimental foi elaborado e seus resultados avaliados utilizando-se o *software* STATISTICA 6.0.

Tabela 4.4. Fatores e níveis estabelecidos para o planejamento experimental 2^3

Fatores	Níveis	
	-1	1
Pressão (bar)	80	150
Graduação do etanol (GL)	85	92,8
Quantidade de etanol (% m/m)	100	200

Na Tabela 4.5 estão descritos os níveis e os fatores do planejamento experimental fracionário de acordo com cada experimento realizado. Os níveis de cada um dos fatores

foram selecionados em função dos experimentos preliminares, levando-se em conta os rendimentos obtidos e redução no número de experimentos.

Tabela 4.5. Planejamento experimental 2^3 .

Experimento	Pressão (bar)	Graduação do etanol (GL)	Massa do etanol (% m/m)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

Os experimentos foram realizados de acordo com os fatores e níveis estabelecidos no planejamento experimental. Todos estes experimentos foram realizados com CO₂SC e o etanol como co-solvente à temperatura de 40°C. A Tabela 4.6 mostra a seqüência destes experimentos

Tabela 4.6. Condições de trabalho dos experimentos realizados durante as extrações à temperatura de 40°C estabelecidos pelo planejamento experimental 2^3

Experimento	Pressão (bar)	Graduação do etanol (GL)	Massa de etanol (%)
1	80	85	100
2	150	85	100
3	80	92,8	100
4	150	92,8	100
5	80	85	200
6	150	85	200
7	80	92,8	200
8	150	92,8	200

Com exceção dos experimentos realizados a pressão de 1 bar, o tempo total das extrações foi mantido para todos os experimentos em 5 horas com um tempo de permanência da amostra sob a ação dos solventes com fluxo nulo (tempo estático) de 1 hora. Após o tempo estático, a vazão do CO₂ denso foi variada de 5,34 ml.min⁻¹, para extrações à pressão de 80 bar, a 1,84 ml.min⁻¹, para extrações à pressão de 150 bar, o que corresponde a uma vazão de 800 ml.min⁻¹ de CO₂ gasoso para as duas condições.

Para os testes de caracterização das membranas (segunda etapa dos experimentos), houve uma modificação no sistema representado pela Figura 4.1, com a utilização de apenas alguns equipamentos. A Figura 4.4 mostra esquematicamente o sistema utilizado nesta

seqüência de experimentos onde duas células (6) e (7) encamisadas e construídas em aço inoxidável, com volume unitário de 30 cm^3 e 2,3 cm de diâmetro interno, estão dispostas em série. Na célula (7) foram colocadas as membranas testadas. A temperatura das células foi mantida pelo banho termostático (11). As membranas foram colocadas sobre um suporte metálico perfurado e vedadas com anéis de politetrafluoretileno. A área de filtração das membranas foi de $3,14 \text{ cm}^2$ e utilizou-se o regime de fluxo perpendicular “*dead-end*” durante os experimentos. A pressão de trabalho nas células foi monitorada pelo transdutor de pressão (5) modelo RTP12/BE53R (AEP, Itália) e controlada por uma válvula pneumática (4) tipo igual porcentagem ar-abre/falha-fecha modelo 807 (Badger Meter, EUA). A pressão de trabalho no tanque pulmão (3) e nas células foi mantida pelo booster (2) Modelo DLE 15-1 (Maxpro, Alemanha). A temperatura no tanque pulmão foi mantida no mesmo valor da temperatura das células pelo banho termostático (11).

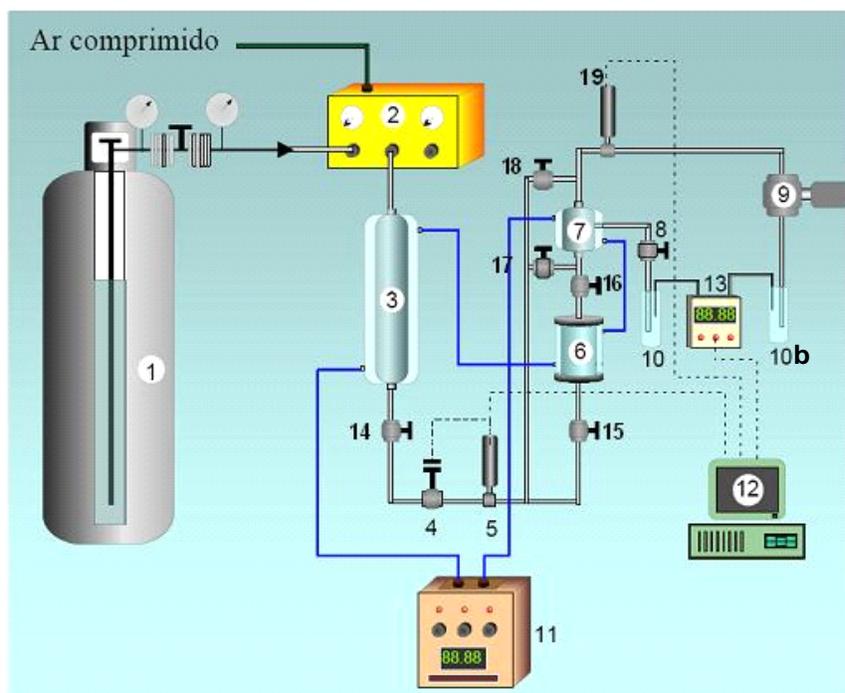


Figura 4.4. Equipamentos de separação com membranas

(1) cilindro de CO₂, (2) *booster*, (3) tanque pulmão TP, (4) válvula pneumática, (5) e (19) transdutor de pressão, (6) e (7) células, (8) válvula micrométrica, (9) válvula *backpressure*, (10) coletores, (11) banho termostático, (12) computador tipo IBM PC, (13) medidor de fluxo (14), (15), (16), (17) e (18) válvulas manuais.

Os testes de caracterização das membranas com relação ao fluxo de CO₂SC puro foram realizados quando as válvulas (15) e (16) foram fechadas enquanto que as válvulas (17) e (18) foram abertas para promover igual pressurização entre as faces das membranas

colocadas na célula (7). Depois de atingido o equilíbrio na pressão desejada, a válvula (18) foi fechada e o diferencial de pressão sobre a membrana foi aplicado pelo ajuste da válvula tipo “*back pressure*” (9). O diferencial de pressão foi monitorado pelo transdutor de pressão (19), e a vazão de CO₂SC foi obtida mediante um medidor de fluxo (13). Os diferenciais de pressão transmembrana (ΔP) aplicados foram de 10, 20, 30 e 40 bar e o fluxo correspondente de CO₂SC, para cada ΔP , foi medido até que se alcançou um valor constante. A pressão de trabalho foi mantida a 150 bar pelo booster (2), monitorada pelo transdutor de pressão (5) e controlada pela válvula pneumática (4).

Nos testes para caracterização foram medidas as permeabilidades das membranas frente ao CO₂SC puro durante elevação da pressão transmembrana de 10 a 40 bar, durante a redução desta pressão de 40 a 10 bar, frente à mistura CO₂SC e extrato e a permeabilidade da membrana frente ao extrato.

O comportamento das membranas puderam ser analisados levando-se em conta a sua permeabilidade frente ao fluido a ser filtrado. Esta característica é observada pela Lei de Darcy.

Ainda como parte dos experimentos destinados à caracterização das membranas, foi observada a redução do fluxo permeado provocado pela compactação, pelo entupimento, resistência ao fluxo de massa devido à concentração de polarização e reversibilidade das condições após a compactação (histerese). Foram, também, medidos os índices de retenção dos polifenóis por cada uma das membranas. Estes experimentos foram realizados quando na célula (7) foram colocadas as quantidades adequadas de extrato de cacau obtido na primeira etapa dos experimentos (obtenção do extrato) nas condições de maior rendimento de polifenóis. As válvulas (15) e (16) foram fechadas e abertas as válvulas (17) e (18). Uma vez estabelecido o equilíbrio da pressão entre as faces das membranas, a válvula (18) foi fechada e, da mesma forma que o procedimento para os testes de fluxo do CO₂SC puro, os diferenciais de pressão foram estabelecidos pela válvula “*back pressure*” (9) e monitorados pelo transdutor (19). As quantidades de extrato permeado foram medidas através da massa coletada no separador (10b), enquanto que as quantidades de CO₂SC proveniente da mistura foram determinadas pela medida do fluxo através do medidor de vazão (13). Estas medidas foram feitas até que se verificou um fluxo constante através das membranas, o que durou aproximadamente 1 hora para cada ΔP aplicado. As medidas, tanto para caracterização da membrana com CO₂SC puro quanto para a mistura do CO₂SC e extrato, foram realizadas a cada 15 minutos. Nesta série de experimentos, foram testados também os comportamentos das

membranas com respeito à resistência mecânica frente aos diversos diferenciais de pressão, resistência ao ataque químico pelo CO₂SC e pelo extrato de cacau a ser separado, histerese pela pressurização e despressurização do sistema e índices de retenção dos polifenóis. Os índices de retenção de polifenóis pelas membranas foram determinados quando os diferenciais de pressão ΔP foram de 10 bar. Estes experimentos foram realizados durante um período de 5 horas para se verificar também a estabilização do fluxo de CO₂SC e do extrato permeado.

Os índices de retenção foram determinados pela equação 4.1.

$$IR = \left(1 - \frac{C_p}{C_r}\right) \times 100 \quad (4.1)$$

Onde: IR = índice de retenção (%)

C_p = concentração de polifenóis no permeado

C_r = concentração de polifenóis no retentado

Todos os experimentos foram realizados a uma pressão de alimentação de 150 bar e 40°C. Nestas condições, mesmo estabelecendo-se um diferencial de pressão de 40 bar para experimentos destinados a determinação de permeabilidade e resistência ao fluxo de massa, o solvente encontra-se em condições de pressão e temperatura superiores ao seu estado crítico (pressão crítica 73,8 bar e temperatura crítica 31,06°C) nas duas faces da membrana.

4.7. "Software" para monitoramento e controle dos processos de extração e separação.

Diversos equipamentos presentes no sistema de extração e separação não apresentam mostradores analógicos ou digitais, apenas enviam e recebem sinais elétricos. Para monitorar e controlar esses sinais foi utilizado um "software" cuja tela principal está representada na Figura 4.6 desenvolvido no próprio laboratório para o sistema operacional "MS-Windows" 95/98. A linguagem de programação utilizada foi "OBJECT PASCAL". Este "software"

realiza a comunicação com a placa de aquisição de dados analógica-digital-analógica (AD/DA) (Data Translation DT 2812) instalada em um microcomputador (22) (IBM- PC) compatível que, por sua vez, faz o interfaceamento com os equipamentos.

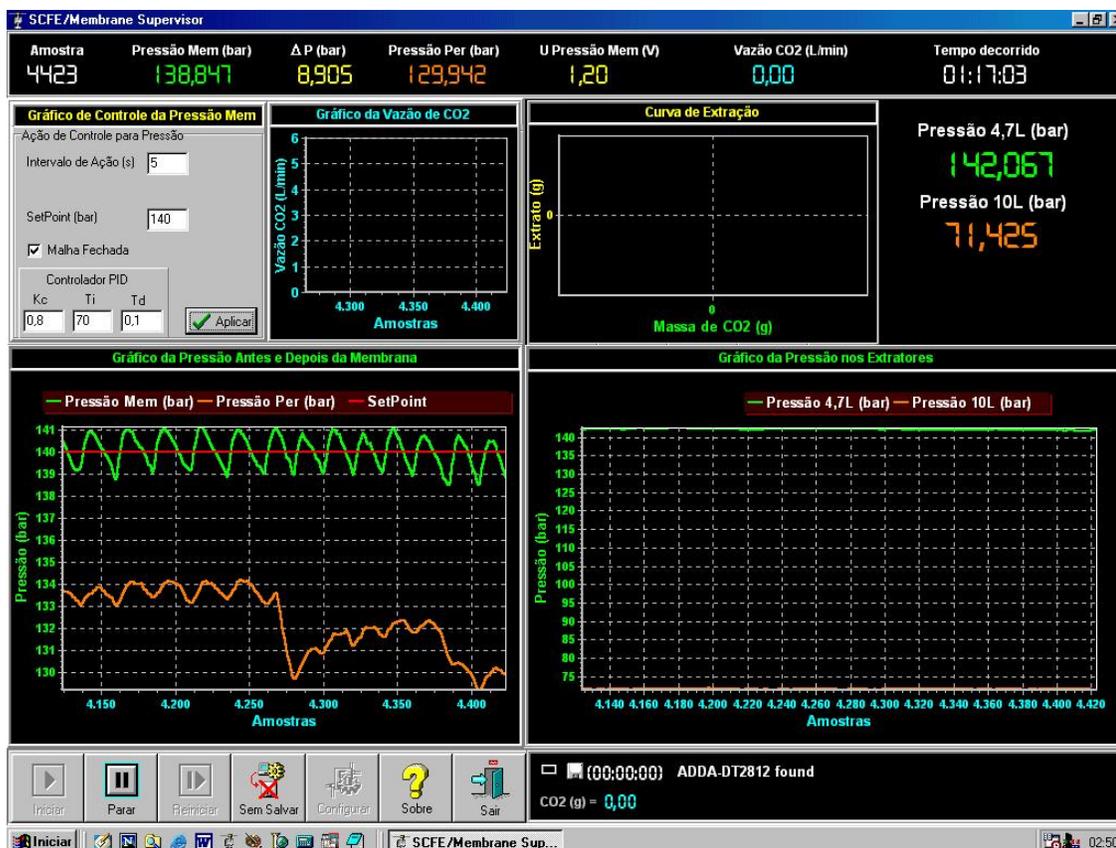


Figura 4.6 Tela principal do “software” de monitoramento e controle dos processos de extração e separação.

Na Figura 4.6 está apresentada a tela principal do “software” de monitoramento e controle do processo de extração a altas pressões e separação com membranas. Na parte superior desta tela estão os valores das variáveis do processo onde, da esquerda para a direita, tem-se: número da amostra, pressão na face do retentado da membrana, valor em volts da abertura da válvula pneumática de controle de pressão na célula de separação (1 volt = fechada, 5 volt = aberta), pressão na face do permeado da membrana, vazão do permeado na saída da célula e tempo decorrido de extração. Logo abaixo, à direita, estão os valores das pressões nos extratores de 4,7 e 10 litros, respectivamente. À esquerda encontra-se o quadro de configurações do controle de pressão nas células de separação, um duplo clique sobre este quadro altera para o gráfico do valor da abertura da válvula. Logo ao lado se localiza o gráfico do controle de vazão do permeado e ao lado deste, uma pequena tela escura onde pode-se obter o gráfico da curva de extração. Mais abaixo, à esquerda, o gráfico dos diferenciais de

pressão transmembrana e a direita deste, os gráficos das pressões nos extratores. Na base da tela, à esquerda, estão os botões de controle do “*software*”, à direita a massa de CO₂ utilizada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos durante os experimentos, no que diz respeito às características das curvas de extração com relação às suas formas e rendimentos, cujas condições estão apresentadas na Tabela 3.2. São apresentados também os resultados relacionados às caracterizações das membranas com relação aos fluxos de massa e índices de retenção de polifenóis.

5.1. Identificação das condições de extração

As extrações referentes aos experimentos preliminares, realizados para orientar a definição dos fatores e níveis de um planejamento experimental fracionado 2³, apresentaram os resultados indicados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Rendimentos das extrações para obtenção do extrato de cacau referentes aos experimentos preliminares

Experimento	Tipo da amostra	Pressão (Bar)	Graduação do etanol (GL)	massa da amostra (g)	volume de etanol (%)	massa de polifenól na amostra (g)	massa de polifenól extraído (g)	rendimento (%)
1	C/G	80		69,14	0	2,63	0,06	2,35
2	C/G	150		68,81	0	2,42	0,07	2,94
3	C/G	150	92,8	74,54	10	2,38	0,19	8,11
4	C/G	80	92,8	70,33	100	2,68	0,35	13,06
5	C/G	150	92,8	73,62	100	2,81	0,35	12,45
6	C/G	150	92,8	63,25	200	2,40	0,89	37,08
7	C/G	150	85	71,47	100	2,72	0,77	28,30
8	S/G	80	92,8	72,19	100	7,21	1,43	19,83
9	S/G	1	85	25,87	200	3,23	0,51	15,66
10	S/G	1	92,8	24,71	200	3,09	0,20	6,47
11	S/G	1	anidro	24,83	200	3,10	0,12	3,84
12	S/G	80	50	50,62	200	6,33	0,96	15,22
13	S/G	80	anidro	49,29	200	6,15	0,70	11,37

Nawaz et al. (2006) mostraram que a utilização de etanol 99% à proporção de 0,1 a 0,25 g do soluto/ml do solvente em relação, temperatura de 23°C, pressão atmosférica e extrações triplas, é um método eficiente para extrações de polifenóis de semente de uva. Nessas condições foi possível a extração de 60% dos polifenóis existentes nestas sementes.

No experimento 11, cuja proporção soluto solvente foi de 0,5g/g, utilizando-se etanol anidro à pressão atmosférica, o rendimento foi inferior a 4%. Nos experimentos 9 e 10, também à pressão atmosférica os rendimentos foram de 15,66 e 6,47% utilizando-se etanol 85GL e 92,8GL respectivamente, o que indica que a presença de água em pequenas proporções facilita a extração dos polifenóis de sementes de cacau.

Nas Figuras 5.1 a 5.8 estão representadas as curvas de extração obtidas para os experimentos 1 a 8. Estes experimentos foram realizados à temperatura de 40°C e em duas

condições de pressão de 80 e 150 bar, inicialmente utilizando CO₂SC puro como solvente, em seguida com a adição de etanol como co-solvente em proporções de 10 a 200% (V/m) em relação à massa de cacau. Todas as curvas apresentam um comportamento típico de curva de extração com fluido supercrítico.

As Figuras 5.1 e 5.2 mostram que mesmo com o aumento da densidade do CO₂ obtido pela elevação da pressão, não houve aumento no rendimento final da extração. Verifica-se, também, que a massa e a variação da quantidade de polifenóis extraído foi muito pequena, variando de 2,35% para extração a 80 bar até 2,94% para pressão de 150 bar.

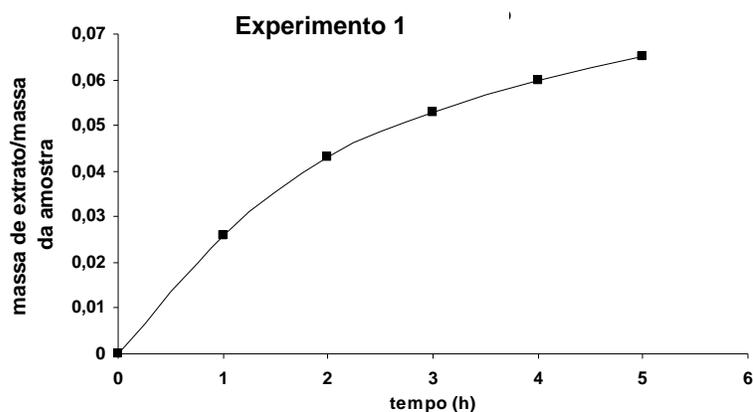


Figura 5.1. Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando CO₂SC puro e pressão de 80 bar. (massa de cacau utilizada = 69,1g, amostra com gordura).

Os resultados obtidos pelos experimentos 1 e 2 indicam que o CO₂SC puro, por ser um composto apolar, não é indicado para extração de polifenóis que, devido às suas estruturas moleculares, são compostos que apresentam polaridade baixa a média.

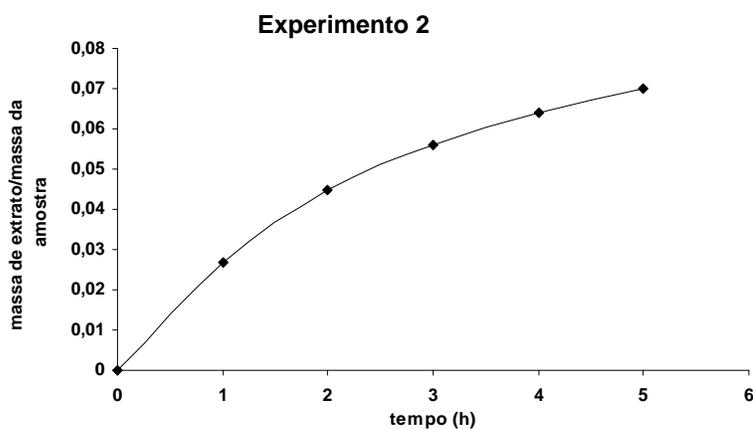


Figura 5.2. Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando CO₂SC puro e pressão de 150 bar. (massa de cacau utilizada = 68,8g, amostra com gordura).

Os resultados obtidos pelos experimentos 1 e 2 indicam que o CO₂SC puro, por ser um composto apolar, não é indicado para extração de polifenóis que, devido às suas estruturas moleculares, são compostos que apresentam polaridade baixa a média.

Para melhorar o processo de extração de compostos polares, além do uso do CO₂SC, diversos estudos têm sido desenvolvidos utilizando outros compostos como co-solvente. Pereira et al. (2004) utilizaram CO₂SC e etanol 99% como co-solvente em um processo de extração de alcalóides de jasmim, *Tabernaemontana catharinensis*. A extração de óleo de semente de jojoba, usando CO₂SC e misturas de CO₂SC+etanol, foi estudada por Salgin (2006) e Chiehming *et al.* (2000), utilizando-se etanol como co-solvente em um processo de extração e separação dos polifenóis catequinas a partir do chá verde.

Com objetivo de se alcançar um melhor rendimento nas extrações, quanto à quantidade de extrato e polifenóis a serem obtidos, utilizou-se o etanol como co-solvente. A Figura 5.3 mostra a curva de extração obtida a partir da amostra de cacau com gordura, pela adição de 10% (V/m) de etanol 92,8 GL.

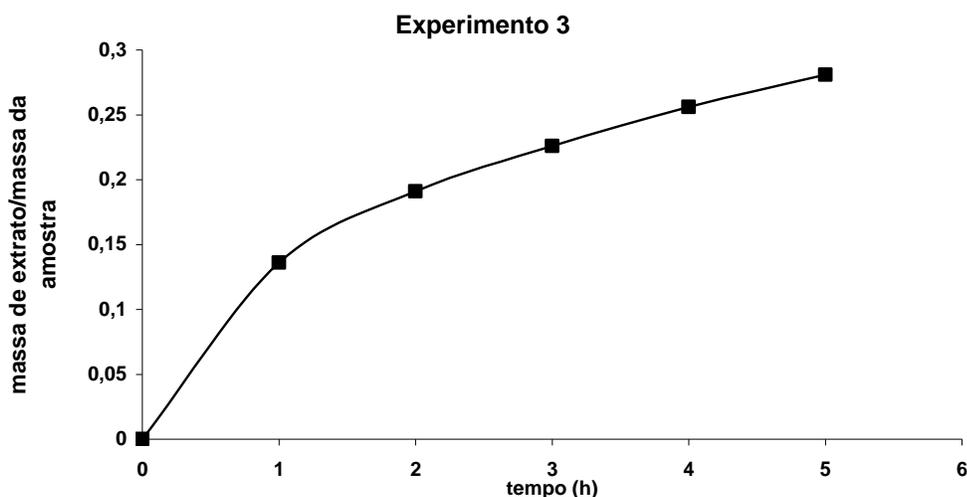


Figura 5.3. Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando CO₂SC + 10% (V/m) de etanol 92,8GL pressão de 150 bar. (massa de cacau utilizada = 74,5g, amostra com gordura).

Devido à presença do co-solvente, podemos observar pela Figura 5.3 um aumento na quantidade de extrato obtido. Também houve aumento na quantidade de polifenóis nessas condições, cujo valor foi de 8,11% em relação à amostra, enquanto que nas extrações realizadas com CO₂SC puro, nas mesmas condições de pressão e temperatura, a quantidade de polifenóis obtida foi inferior a 3%.

Nas Figuras 5.4 e 5.5 estão representadas as curvas de extração obtidas quando os experimentos foram realizados às pressões de 80 e 150 bar e adição de volumes correspondentes a 100% (V/m) de etanol 92,8 GL. Estas Figuras também mostram que apenas o aumento da densidade do solvente obtido pela elevação da pressão, não foi suficiente para provocar aumento no rendimento final da extração. Entretanto, observa-se que o acréscimo do co-solvente provocou aumento da quantidade de polifenóis extraído (13,06% e 12,45% respectivamente), enquanto que a quantidade obtida com uso de 10% de co-solvente foi de 8,11%. Os resultados comprovam também que o CO₂SC puro, nas condições estabelecidas, não é um solvente apropriado para extrair substâncias polares.

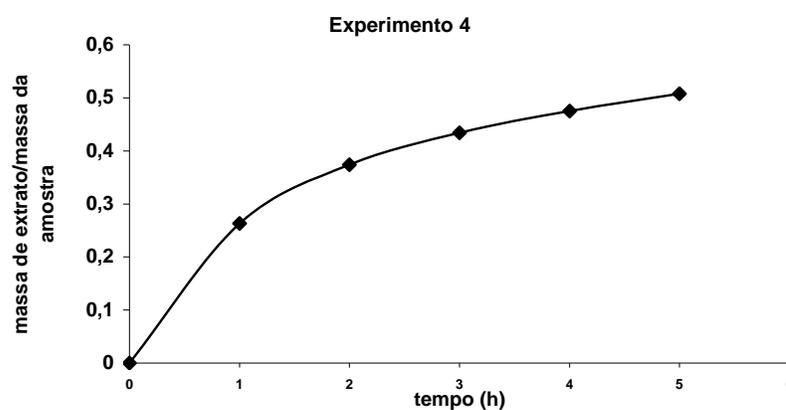


Figura 5.4. Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando CO₂SC + 100% (V/m) de etanol 92,8GL pressão de 80 bar. (massa de cacau utilizada = 70,3g, amostra com gordura).

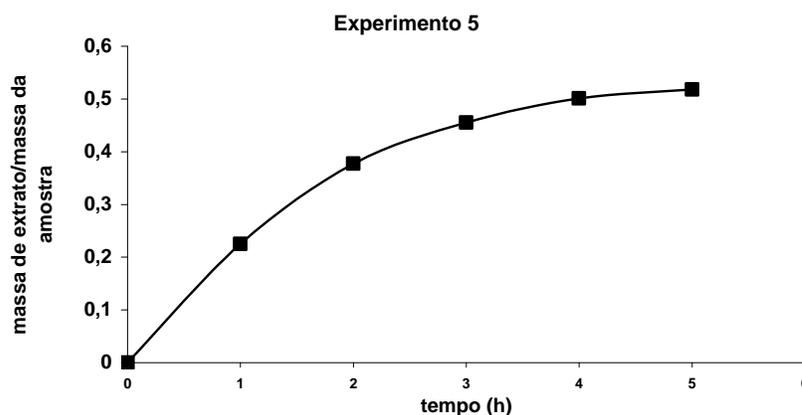


Figura 5.5. Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando CO₂SC + 100% (V/m) de etanol 92,8GL pressão de 150 bar. (massa de cacau utilizada = 73,6g, amostra com gordura).

Na Figura 5.6 tem-se a curva de extração para obtenção do extrato de cacau contendo polifenóis de uma amostra com gordura, quando submetida à pressão de 150 bar e adição de um volume correspondente a aproximadamente 200% (V/m) de co-solvente.

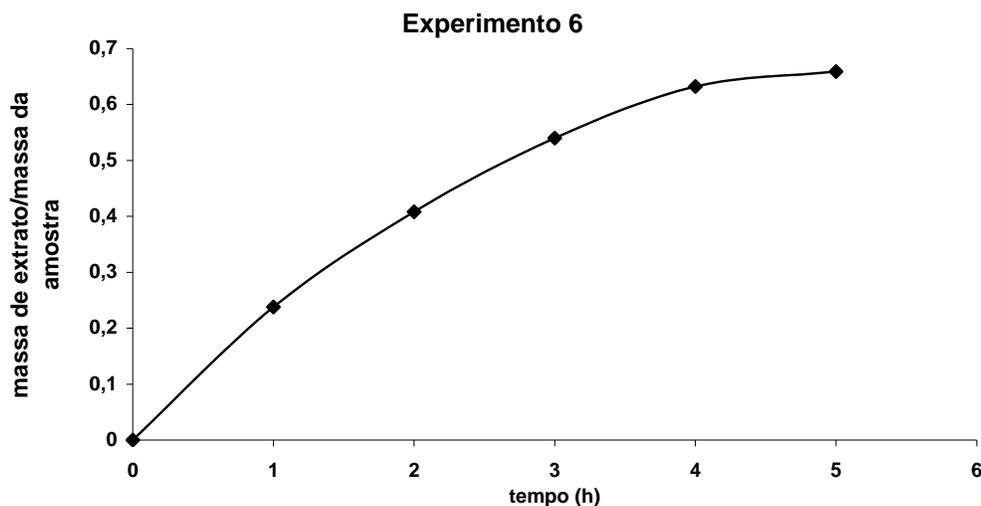


Figura 5.6. Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando CO₂SC + 200% (V/m) de etanol 92,8GL pressão de 150 bar. (massa de cacau utilizada = 63,2g, amostra com gordura).

A quantidade de polifenóis extraída nestas condições, corresponde a 37,08% da massa destes compostos existentes na massa de cacau. Comparando-se os resultados do experimento mostrado na curva da Figura 5.6, com os resultados mostrados nas curvas das Figuras 5.4 e 5.5, juntamente com as quantidades de polifenóis extraído, observa-se novamente que o aumento da quantidade de co-solvente aumenta a quantidade de polifenóis extraído.

Com objetivo de avaliar o efeito da concentração do co-solvente na extração dos polifenóis, foi realizado um experimento utilizando etanol 85GL à pressão de 80 bar e um volume aproximado de 100% (V/m) em uma amostra de cacau com gordura. A Figura 5.7 mostra a curva de extração obtida nestas condições.

A quantidade de polifenóis obtida corresponde a 28,34% da massa de polifenóis contida na massa de cacau. Este valor é bem superior aos 13,06% observados quando se utilizou álcool 92,8GL nas mesmas condições de extração. A presença da água permite uma maior penetração dos solventes aumentando o rendimento da extração de polifenóis, conforme demonstrado por PEKIC et al. (1998) em um estudo realizado para extração de polifenóis de sementes de uva.

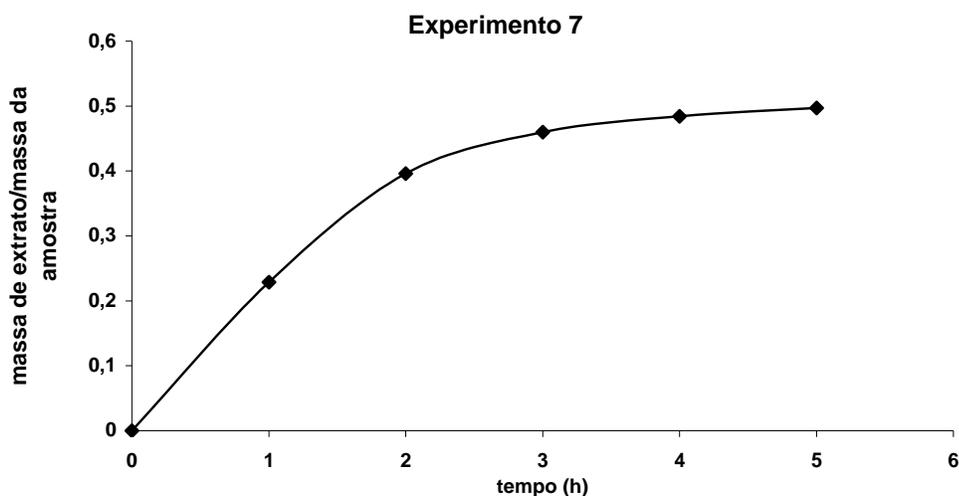


Figura 5.7. Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando $\text{CO}_2\text{SC} + 100\%$ (V/m) de etanol 85GL pressão de 80 bar. (massa de cacau utilizada = 71,4g, amostra com gordura).

Deve-se também considerar que, ao contrário da água, a gordura pode dificultar a penetração dos solventes e reduzir a transferência de massa.

Na Figura 5.8 tem-se a curva de extração obtida observando-se os dados dos experimentos com amostras de cacau desengordurado (S/G), nas condições de 80 bar de pressão e com 100% (V/m) de co-solvente.

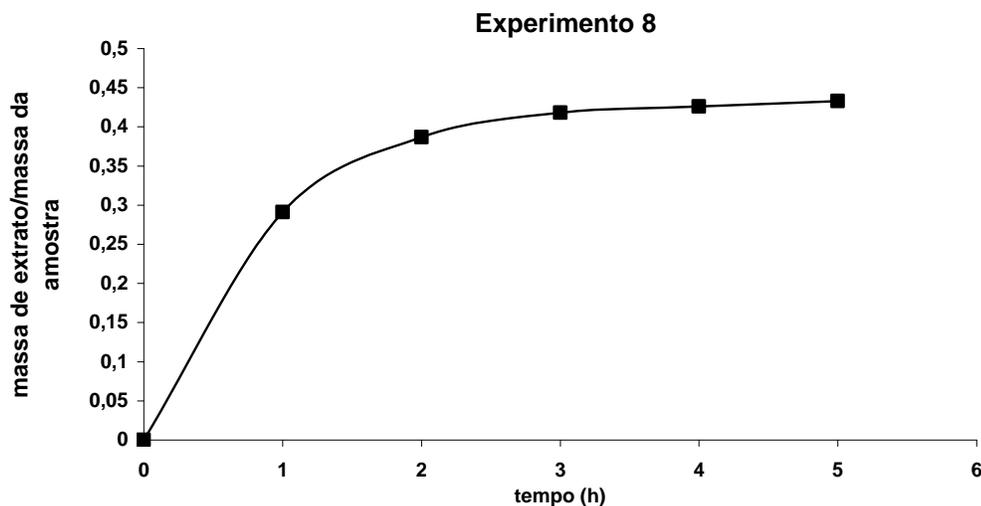


Figura 5.8. Curva de extração para obtenção do extrato de cacau utilizando $\text{CO}_2\text{SC} + 100\%$ (V/m) de etanol 92,8GL pressão de 80 bar. (massa de cacau utilizada = 72,1g, amostra sem gordura).

A quantidade de polifenóis extraída no experimento 8, utilizando amostra sem gordura, foi de 19,83%. Este valor, quando comparado com o obtido com experimento 4, realizados nas mesmas condições de pressão, quantidade e graduação do etanol, com valor de 13,06%, demonstra um aumento no rendimento na obtenção de polifenóis, o que comprova que a redução da quantidade de gordura facilita a extração desses compostos.

Por último, ainda como parte dos experimentos preliminares, foram realizados dois testes utilizando-se amostra de cacau desengordurado em extrações a 80 bar e com uma proporção aproximada de 200% (m/m) de co-solvente, utilizando-se etanol 50GL e etanol anidro. As massas de polifenóis extraídas corresponderam a 15,22 e 11,37% respectivamente. Estes resultados, mais uma vez, comprovam que a presença da gordura na amostra dificulta a extração dos polifenóis e que a presença de água facilita a extração. Entretanto, utilizando-se etanol mais anidro, conseguiu-se menor rendimento na extração dos polifenóis, uma vez que em experimento nas mesmas condições (experimento 8), mas utilizando-se 100% de etanol (g/g) 92,8GL, o rendimento foi de 19,83%.

Pode-se observar, também, verificando as curvas de extração, que o rendimento na obtenção do extrato de cacau foi maior nas primeiras horas de extração, nos ensaios realizados a pressão de 80 bar, quando comparados com os realizados a 150 bar.

Também se observa que com pressões menores a solubilidade dos polifenóis aumenta quando se aumenta a quantidade do co-solvente. À pressões maiores com as mesmas quantidades de co-solvente a solubilidade dos polifenóis é menor. Maiores pressões facilitam a extração de gordura presente nas amostras que compete com a quantidade de solvente disponível para a extração dos polifenóis.

Os experimentos preliminares não permitiram definir quais as condições apresentam parâmetros mais significativos para se obter melhores resultados no que diz respeito ao rendimento das extrações de polifenóis obtidos nestes experimentos.

Para se avaliar os fatores de maior influência nas condições das extrações, foram realizados mais 8 experimentos com amostras de cacau desengordurado, todos conduzidos à 40°C, de acordo com o planejamento experimental 2³, conforme estabelecido nas Tabelas 4.4 e 4.5, tendo como variável resposta o rendimento das extrações.

A Tabela 5.2 apresenta os resultados dos rendimentos das extrações de polifenóis desses experimentos.

Tabela 5.2 Polifenóis extraídos nos experimentos estabelecidos pelo planejamento experimental com amostras de cacau desengordurado a 40°C.

Experimento	Pressão (Bar)	Graduação do etanol (GL)	massa da amostra (g)	massa de etanol (g)	massa de polifenól na amostra (g)	massa de polifenól extraído (g)	rendimento (%)
1	80	85	58,9	58,8	7,35	2,18	29,66
2	150	85	62	62	7,76	2,16	27,83
3	80	92,8	72	72	9,01	1,79	19,83
4	150	92,8	72	72	9,01	1,54	17,06
5	80	85	51	101,8	6,38	2,46	38,61
6	150	85	59	100,1	7,38	2,29	31,07
7	80	92,8	50,4	101,9	6,31	2,69	42,76
8	150	92,8	53	101,6	6,34	2,64	41,64

Os resultados da Tabela 5.2 foram submetidos à análise de variância e estimativa dos efeitos, utilizando-se o *software* STATISTICA 6.0. Na Tabela 5.3 estão apresentados os fatores que influenciaram na variável resposta rendimento, assim como os efeitos significativos. Os fatores foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de “p” foi menor que 0,10, ou seja, com nível de significância de 10%.

Tabela 5.3. Estimativa dos efeitos significativos que influenciaram na variável resposta rendimento das extrações realizadas de acordo com o planejamento experimental.

Variável Resposta - Rendimento		
Fatores	Efeito	Valor -p
Média	31,05750	0,018853
(1) Pressão (bar)	-3,31500	0,322584
(2) Graduação do etanol (GL)	-1,47000	0,570869
(3) Quantidade de etanol (%)	14,92500	0,078090
(1) por (2)	1,37000	0,592555
(1) por (3)	-1,01500	0,679084
(2) por (3)	8,83000	0,130788

Levando-se em conta que foram considerados estatisticamente significativos os efeitos, cujo valor de $p < 0,1$, pela Tabela 5.3 pode-se observar que apenas a porcentagem de etanol foi significativa, apresentando um efeito positivo, ou seja, o aumento da quantidade de etanol pode contribuir com o aumento do rendimento das extrações o que é desejável para esta variável.

Na Tabela 5.4 pode-se observar a ANOVA para a resposta rendimento somente para o fator significativo.

Na Tabela 5.4 a ANOVA apresenta uma variação explicada de 98,94% e F calculado é altamente significativo ($p < 0,1$).

Tabela 5.4. ANOVA para a resposta rendimento.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcalc.	p - valor
Regressão	445,5	1	445,5		
Resíduos	194,8	6	32,5	65,8	< 0,01
Total	640,3	7			

$R^2 = 0,9894$; F 1; 6; 0,1 = 3,78

A variável resposta foi avaliada em relação aos fatores propostos observando-se as curvas de nível. Na Figura 5.9 apresenta-se a variável resposta “rendimento” avaliada observando as curvas de nível para pressão/graduação de etanol (1) e pressão/quantidade de etanol (2).

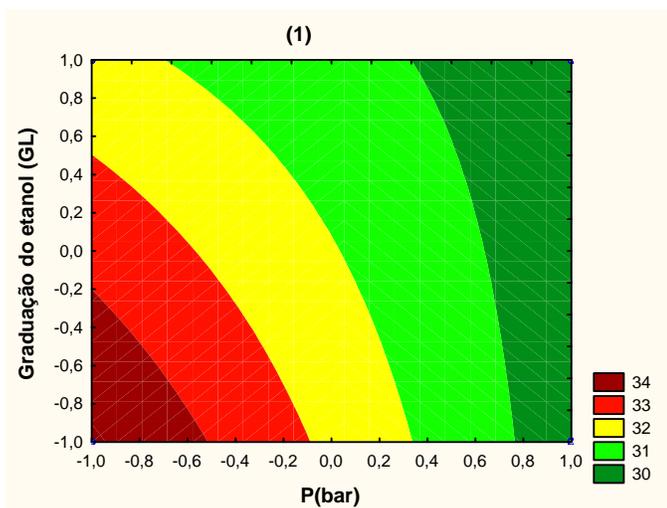


Figura 5.9. Curva de nível para a variável resposta rendimento para os fatores pressão/graduação de etanol.

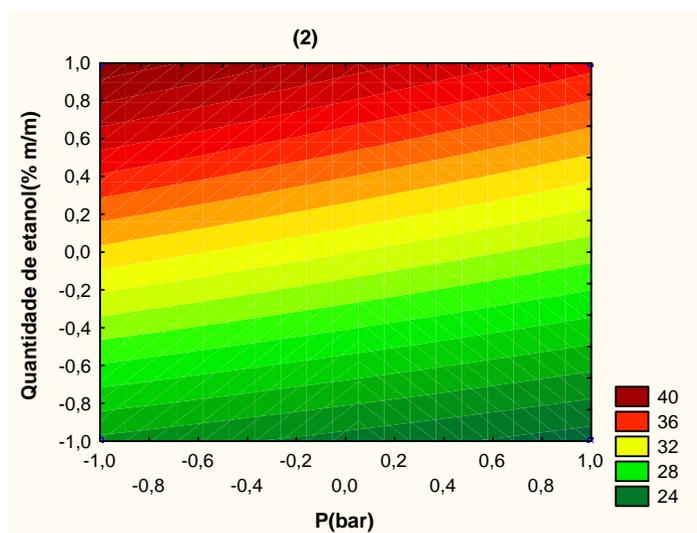


Figura 5.10. Curva de nível para a variável resposta rendimento para os fatores pressão/quantidade de etanol.

Vê-se na Figura 5.9 que a passagem do nível inferior para o nível superior de pressão, provoca uma redução no rendimento, embora esta redução não seja estatisticamente significativa. Da mesma forma, a passagem no nível inferior para o superior da graduação do etanol também provoca redução no rendimento, não significativa estatisticamente. Avaliando-se a combinação dos dois fatores (pressão/graduação do etanol) ambos no nível inferior (80bar/85GL), o rendimento observado foi de aproximadamente 34%.

Na Figura 5.10 observa-se que a influência da pressão, nas condições avaliadas, é muito pequena sobre a variável resposta rendimento, enquanto que a passagem do nível inferior para o nível superior na quantidade de etanol, provoca um aumento no rendimento de 24 para 40% aproximadamente. Avaliando-se a combinação dos dois fatores, observa-se que quando a pressão encontra-se no nível inferior e a graduação de etanol no nível superior, obtém-se o maior rendimento.

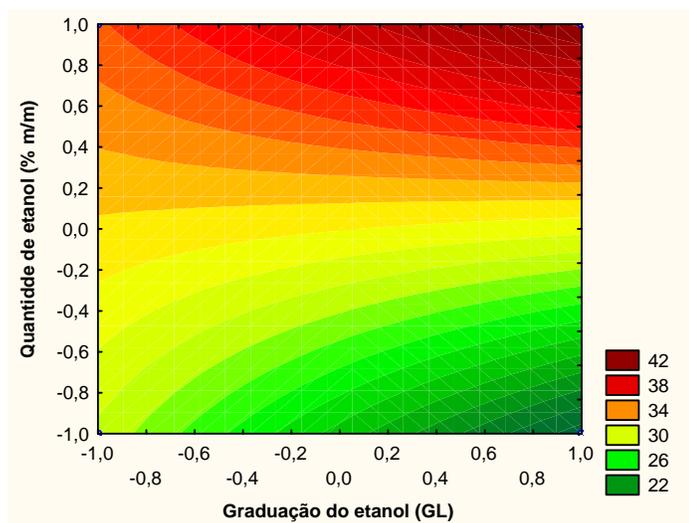


Figura 5.11. Curva de nível para a variável resposta rendimento para os fatores graduação do etanol/quantidade de etanol.

A Figura 5.11 mostra que nos níveis superiores da graduação do etanol (92,8 GL) e no nível superior da quantidade de etanol (200%), a variável rendimento apresenta um valor de 42%. Chiehming et al. (2000) também obtiveram melhores rendimentos em extrações de polifenóis de chá verde, utilizando etanol como co-solvente em maiores proporções e graduações alcoólicas mais elevadas.

5.2. Permeabilidade das membranas ao CO₂SC puro

Algumas características devem ser observadas em processos de separação com membranas. A afinidade existente entre os componentes da alimentação e a membrana pode

influenciar na separação exercendo uma determinada seleção dos compostos, a afinidade entre os componentes e o polímero pode causar alterações nas cadeias do polímero, assim afetando o desempenho da separação. O fenômeno de dilatação de volume em processo de separação de gás como CO₂ é conhecido como plasticização do polímero pelo gás e tem recebido extensa atenção (SPRICIGO et al., 2001, VILAPLANA et. al., 2003, GUO & CHUNG, 2005). Membranas poliméricas também em contato com solventes orgânicos, tendem a “inchar” com alteração importante em suas propriedades seletivas. Este fenômeno foi observado por Oikawa et al. (1991) com soluções de etanol, iso-propanol e iso-butanol em concentrações superiores a 20%.

Em processos combinados de extração com CO₂SC e separação com membranas, a permeabilidade seletiva do CO₂SC produz um excesso de extrato no retentado, provocando, deste modo, uma concentração de soluto superior à concentração média do produto. O acúmulo de soluto sobre a membrana provoca um aumento da viscosidade do fluido e, conseqüentemente, uma redução do fluxo através da membrana. Este fenômeno é conhecido como polarização de concentração.

De acordo com a seqüência de experimentos citados no capítulo 3, foram realizados ensaios com o objetivo de caracterizar as membranas com relação às suas permeabilidades frente ao CO₂SC puro, frente à mistura CO₂SC e etanol, frente ao extrato, redução do fluxo provocado pela compactação, pelo entupimento, resistência ao fluxo de massa devido à polarização de concentração e reversibilidade das condições após a compactação (histerese)

Os testes destinados a observar a permeabilidade das membranas frente ao CO₂SC puro, tanto para a pressurização, quanto para a despressurização, foram feitos à pressão de alimentação de 150 bar e 40°C. O diferencial de pressão transmembrana, ΔP , foi ajustado de 10 a 40 bar (pressurização) em intervalos de 10 bar, e, em seguida, reduzido novamente até 10 bar (despressurização). O fluxo do CO₂SC foi medido por aproximadamente 60 minutos para cada ΔP até que se atingisse um valor estacionário, sem a substituição das membranas.

As Figuras 5.12 a 5.16 apresentam os resultados da variação do fluxo de CO₂SC puro através das membranas SG, DL, NF, NF-90 e BW-30, respectivamente, com o tempo de aplicação de cada ΔP , tanto para o aumento progressivo da pressão (pressurização), quanto para a redução (despressurização). A pressurização seguida da despressurização, permite avaliar o fenômeno de histerese que pode alterar o comportamento de uma membrana quanto ao fluxo de massa e seletividade. Estes resultados indicaram que todas as membranas sofreram pouca redução de fluxo, principalmente em menores ΔP , mostrando, dessa forma,

que sofrem pouca influência dos fatores: compactação; entupimento e polarização de concentração.

Resultados semelhantes foram encontrados por SEMENOVA et al. (1992) em processo de separação de CO_2/SC e etanol, por HIGASHIJIMA et al. (1995) em processo de separação de CO_2/SC e petróleo. Estes resultados mostram também, que em todas as membranas o fenômeno de histerese do fluxo de CO_2/SC é pouco observado, indicando boa reversibilidade da compactação.

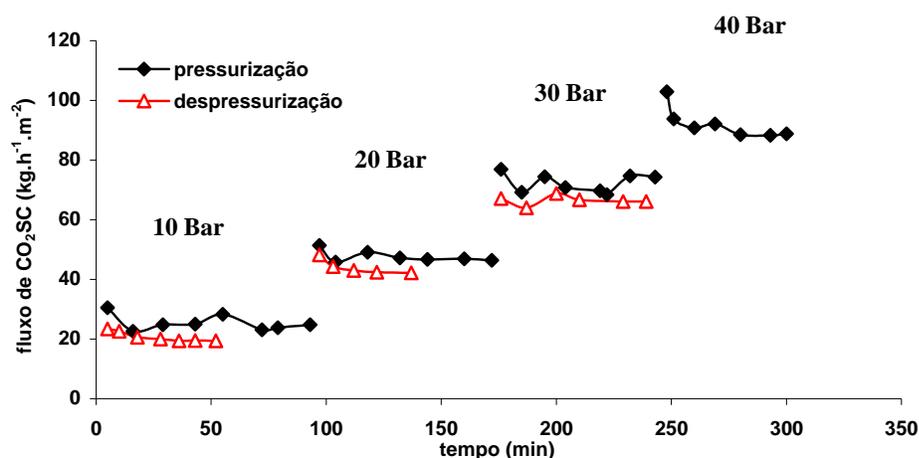


Figura 5.12. Comportamento do fluxo permeado de CO_2/SC puro em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo quando da pressurização e despressurização da membrana SG.

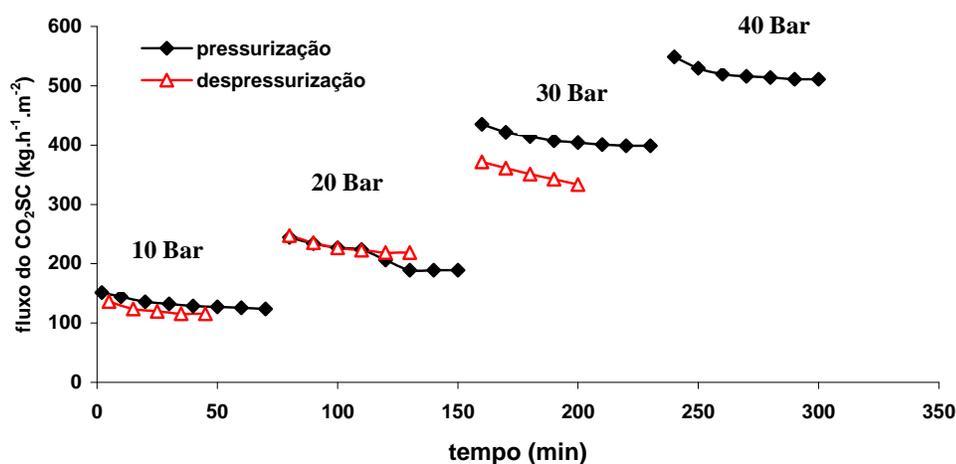


Figura 5.13. Comportamento do fluxo permeado de CO_2/SC puro em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo quando da pressurização e despressurização da membrana DL

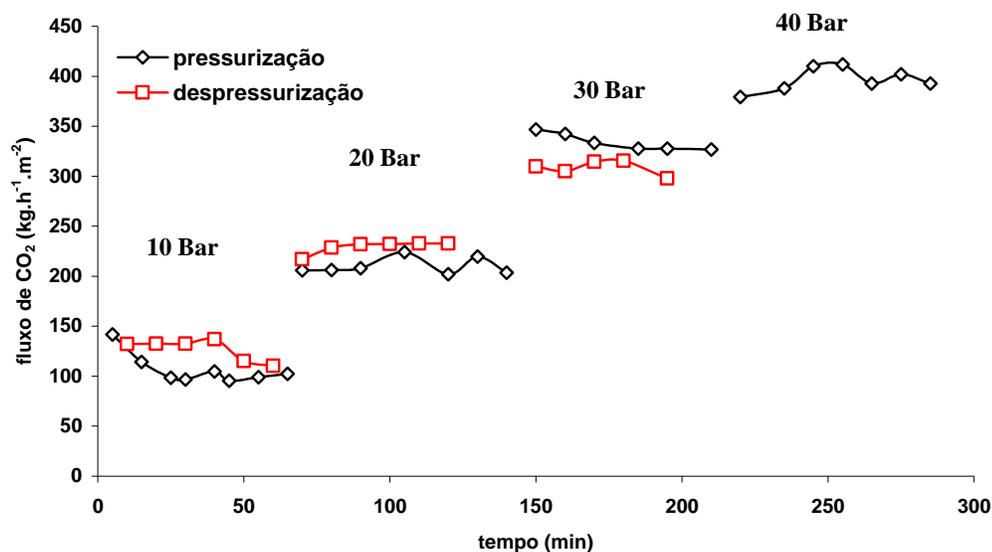


Figura 5.14. Comportamento do fluxo permeado de CO_2SC puro em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo quando da pressurização e despressurização da membrana NF.

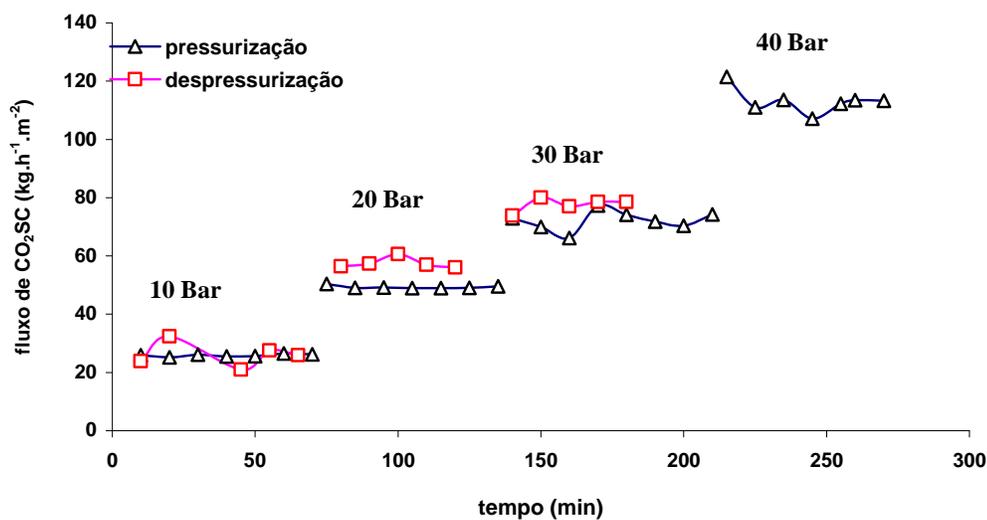


Figura 5.15. Comportamento do fluxo permeado de CO_2SC puro em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo quando da pressurização e despressurização da membrana NF-90

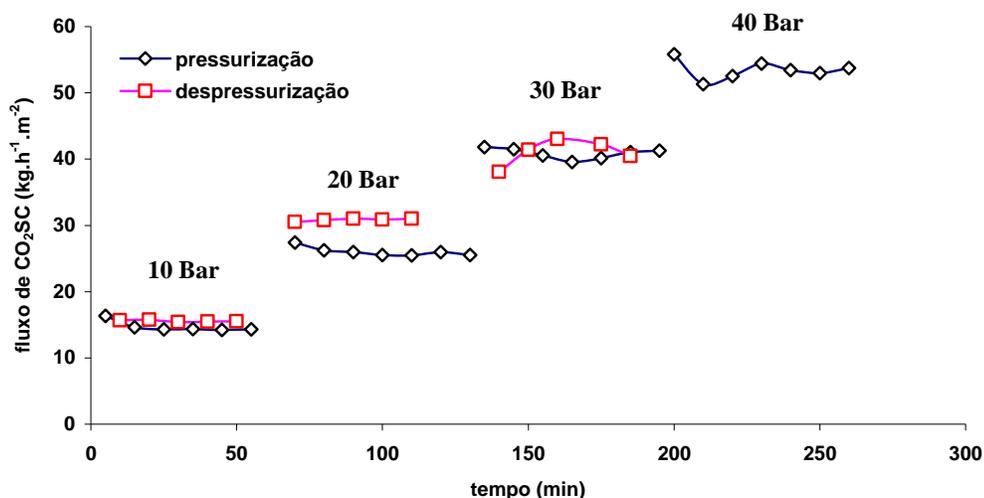


Figura 5.16. Comportamento do fluxo permeado de CO_2SC puro em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo quando da pressurização e despressurização da membrana BW-30

As Figuras 5.17 a 5.21 apresentam os resultados da variação do fluxo estacionário de CO_2SC de acordo com a variação do diferencial de pressão (pressurização e despressurização) aplicado sobre as membranas. Verifica-se, inicialmente, a variação linear do fluxo com o ΔP , conforme estabelecido pela Lei de Darcy para escoamento em um meio poroso de filtração e permitem avaliar a permeabilidade das membranas frente ao CO_2SC puro pela inclinação das retas obtidas. Os resultados mostram, também, a boa reversibilidade quanto às condições iniciais das membranas.

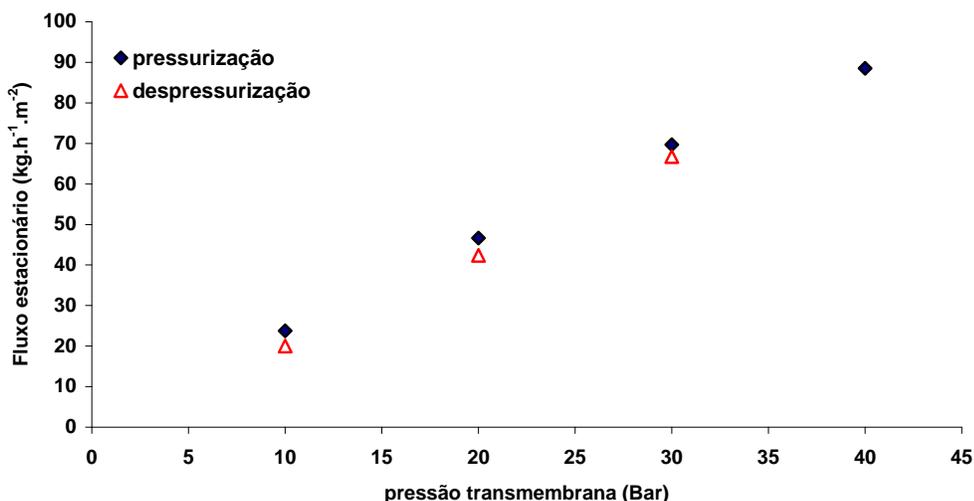


Figura 5.17. Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO_2SC puro em função do diferencial de pressão aplicado durante a pressurização e despressurização da membrana SG.

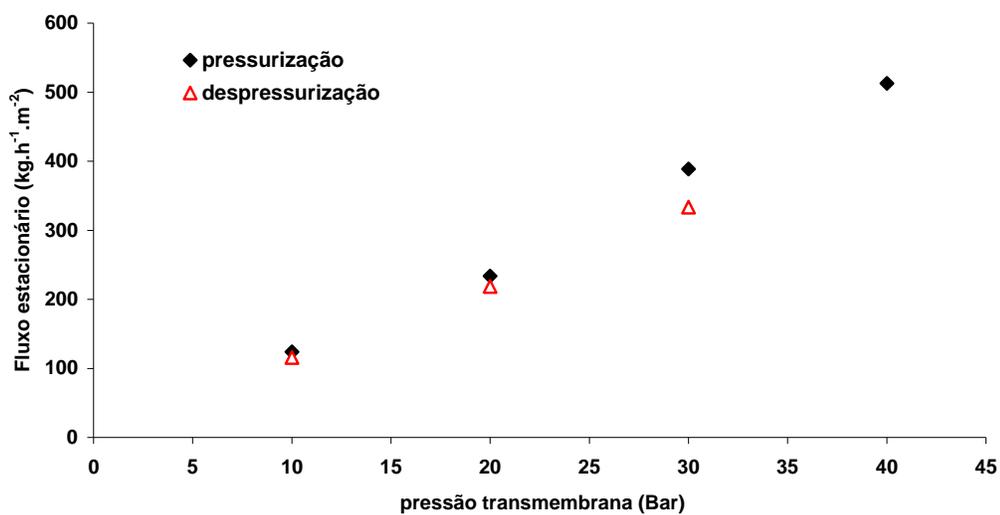


Figura 5.18. Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO₂SC puro em função do diferencial de pressão aplicado durante a pressurização e despressurização da membrana DL.

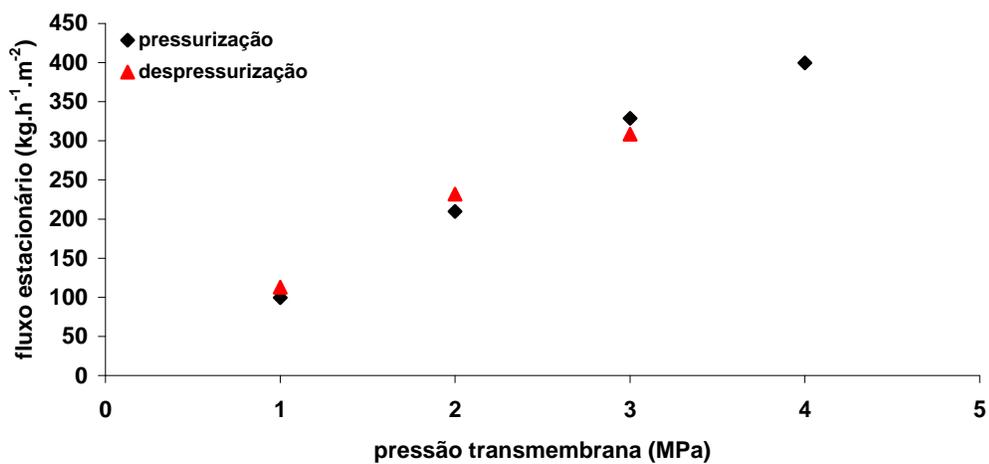


Figura 5.19. Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO₂SC puro em função do diferencial de pressão aplicado durante a pressurização e despressurização da membrana NF

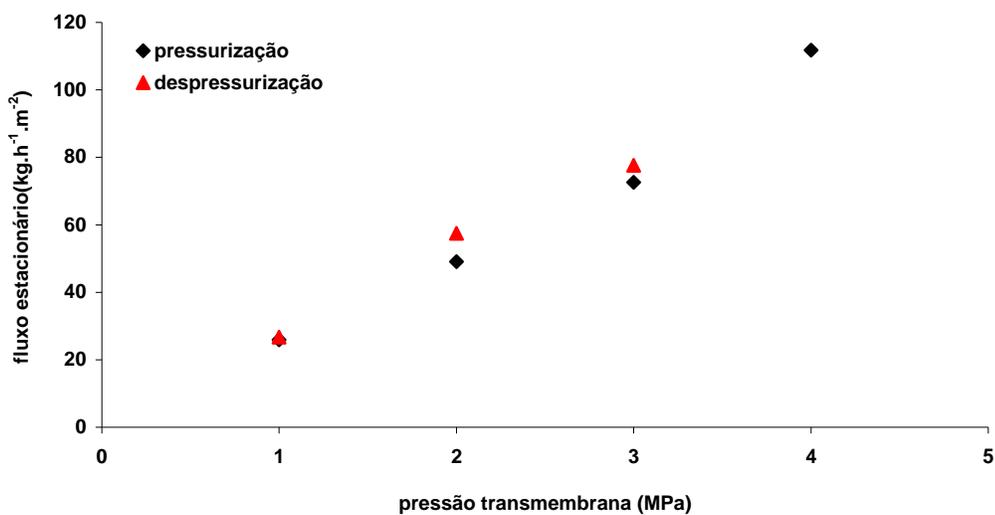


Figura 5.20. Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO₂SC puro em função do diferencial de pressão aplicado durante a pressurização e despressurização da membrana NF-90

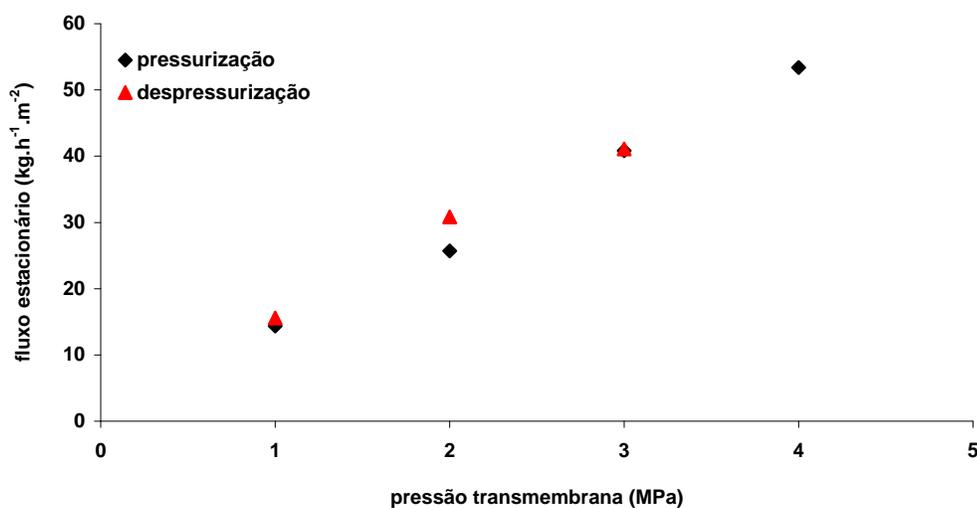


Figura 5.21. Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO₂SC puro em função do diferencial de pressão aplicado durante a pressurização e despressurização da memb. BW-30

5.3. Permeabilidade das membranas a mistura CO₂SC e extrato de cacau.

Da mesma forma que na etapa anterior, as membranas foram testadas com o objetivo de caracterizá-las com relação aos mesmos fatores, porém frente a uma mistura de CO₂SC e extrato de cacau, obtido durante os experimentos de extração a 150 bar e 40°C. Para se verificar as influências exercidas pelo extrato de cacau presente na mistura sobre as membranas, foram tomadas medidas de fluxo do CO₂SC proveniente da mistura e do fluxo de extrato separadamente. As Figuras 5.22 a 5.27 apresentam os resultados dos fluxos de CO₂SC e do extrato de cacau provenientes da mistura obtida nas extrações, em função do tempo de separação. Neste caso, os fluxos foram medidos durante aproximadamente 60 minutos para cada ΔP até que se atingisse um valor estacionário. Os resultados mostram que a redução do fluxo de CO₂SC é grande quando os valores são comparados com os observados nos experimentos destinado a medir a permeabilidade ao CO₂SC puro, indicando que a presença do extrato de cacau na mistura favorece a ocorrência de entupimento e da formação da película sobre a superfície das membranas, aumentando a possibilidade dos fenômenos de polarização de concentração e colmatagem.

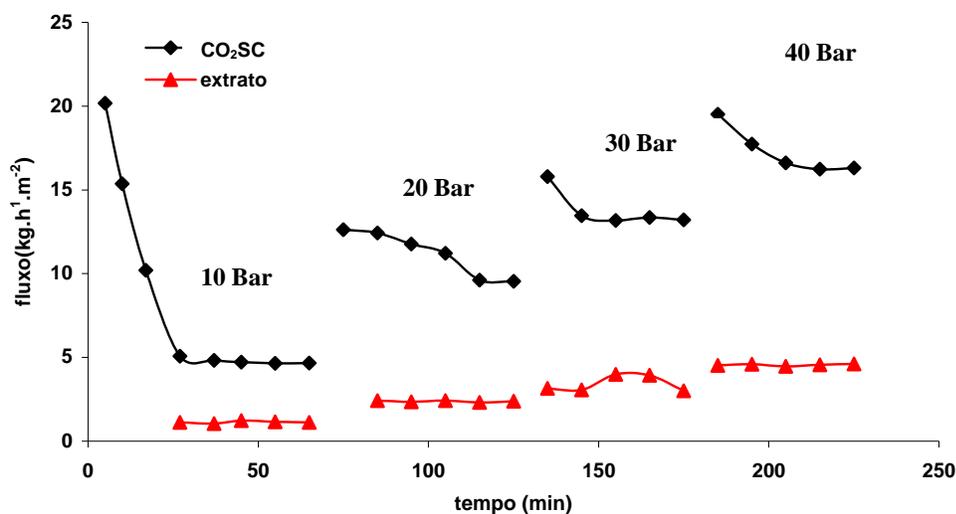


Figura 5.22. Comportamento do fluxo permeado de CO₂SC e de extrato de cacau provenientes da mistura em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo, para a membrana SG.

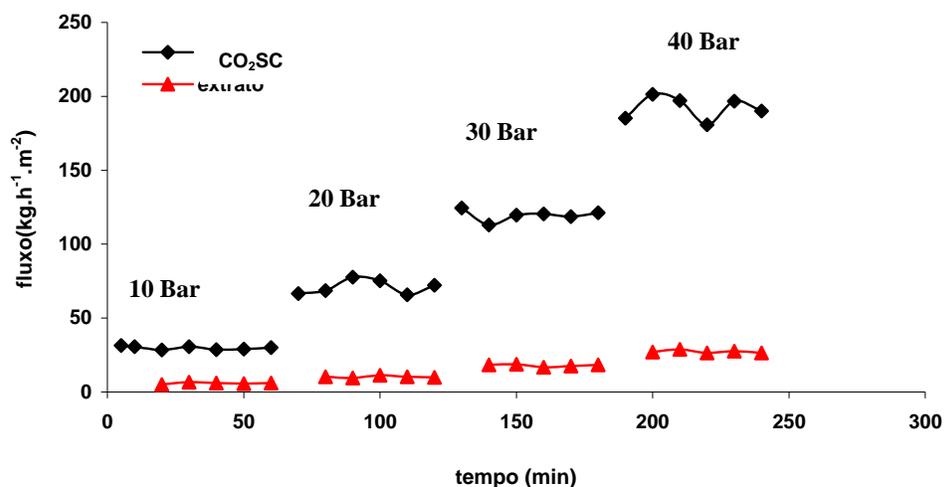


Figura 5.23. Comportamento do fluxo permeado de CO₂SC e de extrato de cacau provenientes da mistura em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo, para a membrana DL.

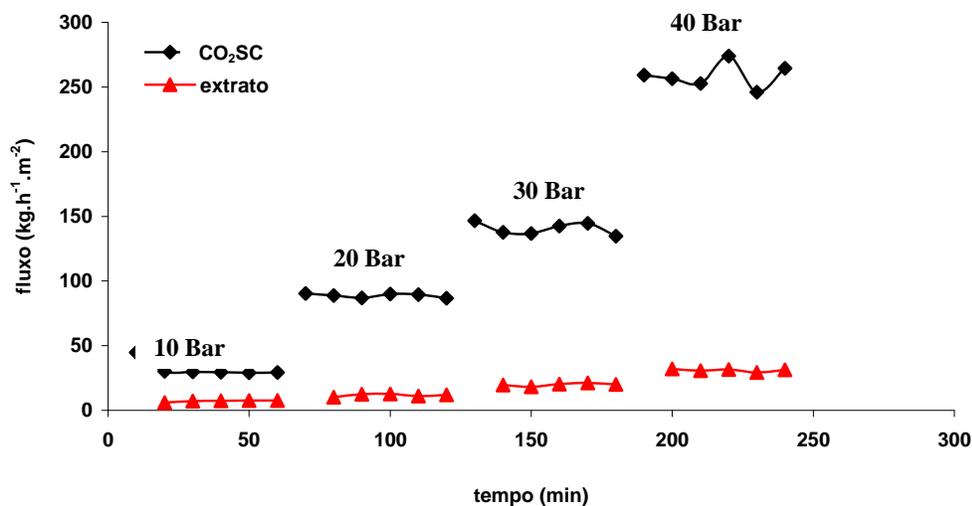


Figura 5.24. Comportamento do fluxo permeado de CO₂SC e de extrato de cacau provenientes da mistura em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo, para a membrana HL.

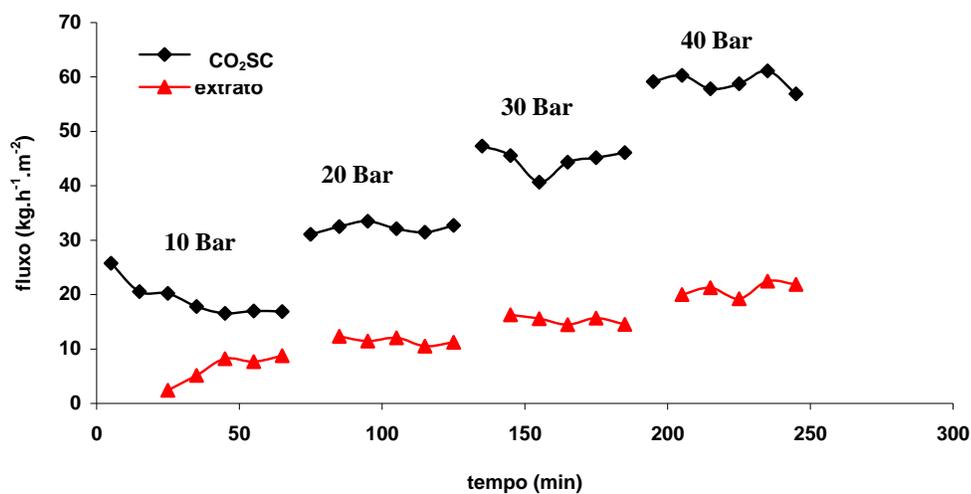


Figura 5.25. Comportamento do fluxo permeado de CO₂SC e de extrato de cacau provenientes da mistura em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo, para a membrana NF.

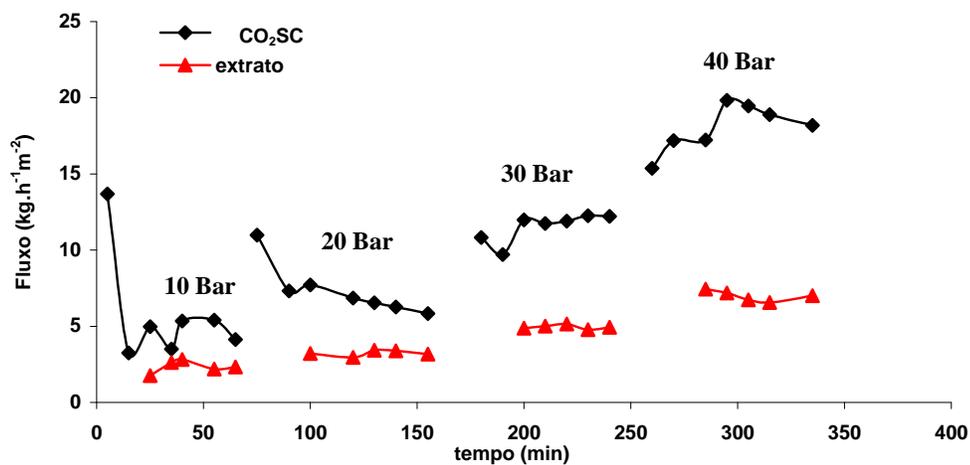


Figura 5.26. Comportamento do fluxo permeado de CO₂SC e de extrato de cacau provenientes da mistura em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo, para a membrana NF-90.

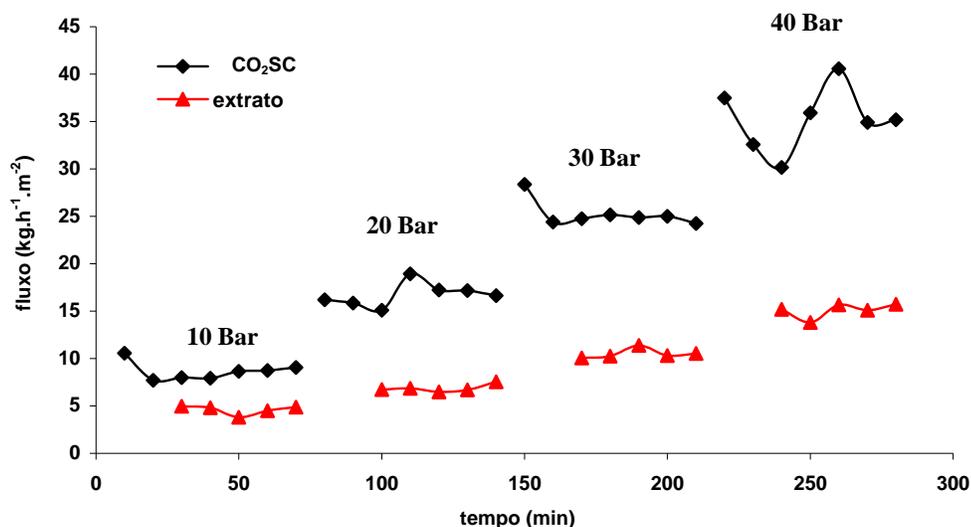


Figura 5.27. Comportamento do fluxo permeado de CO₂SC e de extrato de cacau provenientes da mistura em função do diferencial de pressão aplicado ao longo do tempo, para a membrana BW-30.

As Figuras 5.28 a 5.33 apresentam os resultados do comportamento do fluxo estacionário de CO₂SC e de extrato de cacau, em função da variação do diferencial de pressão, utilizando-se as mesmas condições dos testes realizados com solvente puro. Os resultados, a exemplo dos experimentos realizados com CO₂SC puro, mostram que a variação do fluxo ocorre de forma linear e permitem avaliar, observando-se a inclinação das retas obtidas, a permeabilidade das membranas frente aos meios analisados.

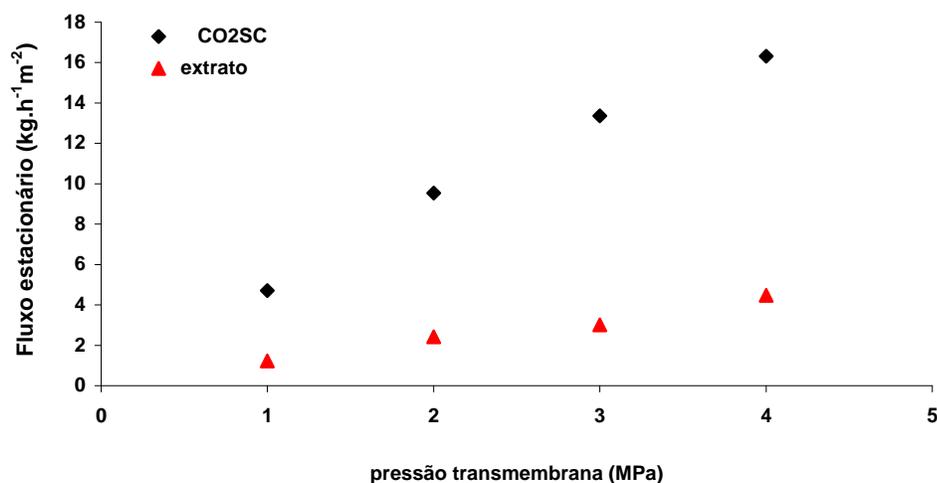


Figura 5.28. Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO₂SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado à membrana SG.

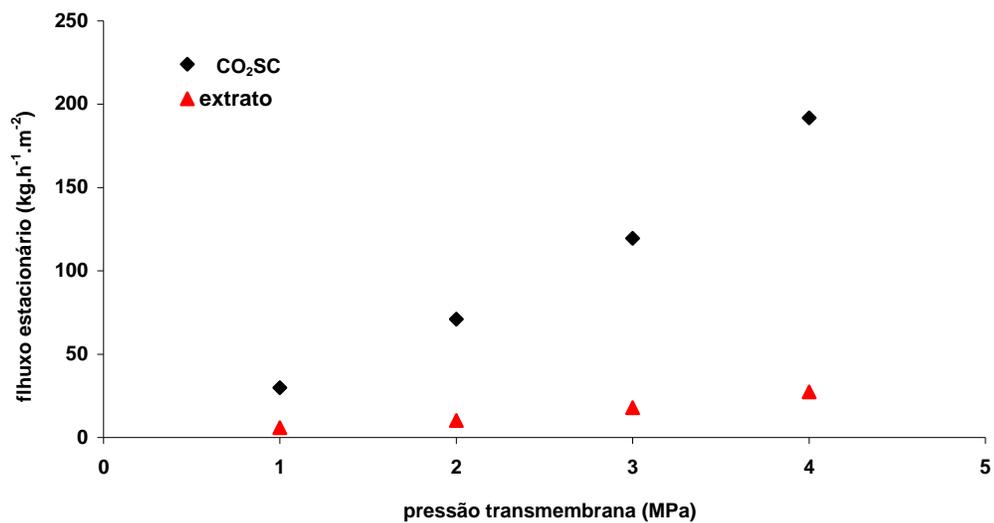


Figura 5.29. Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO₂SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado à membrana DL.

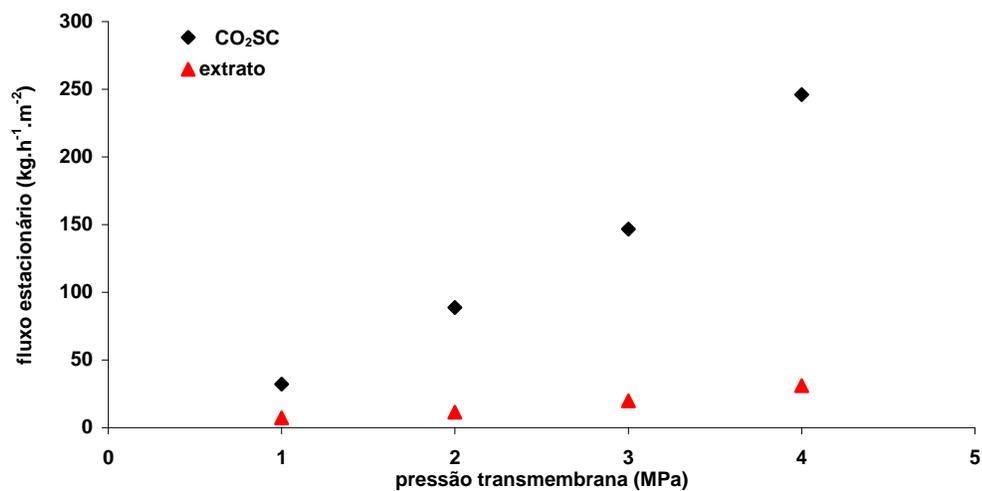


Figura 5.30. Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO₂SC e de extrao de cacau em função do diferencial de pressão aplicado à membrana HL

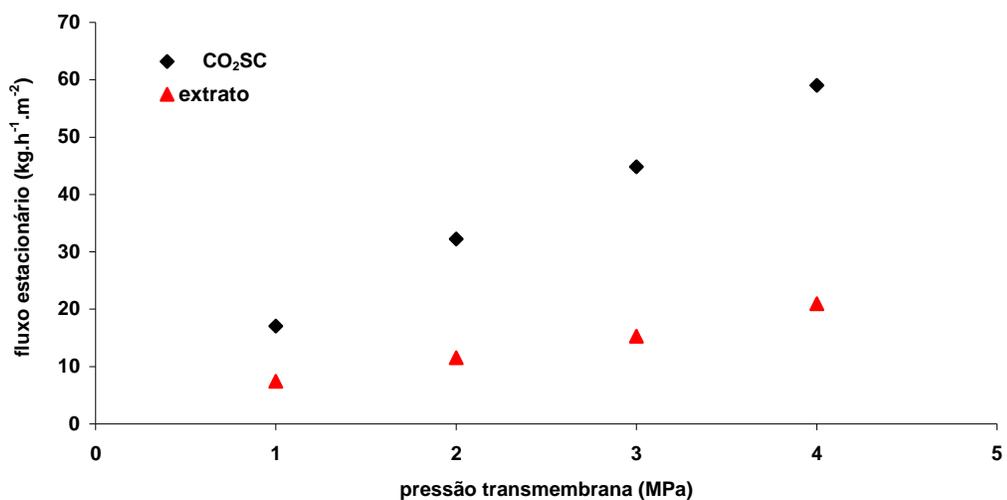


Figura 5.31. Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO₂SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado à membrana NF.

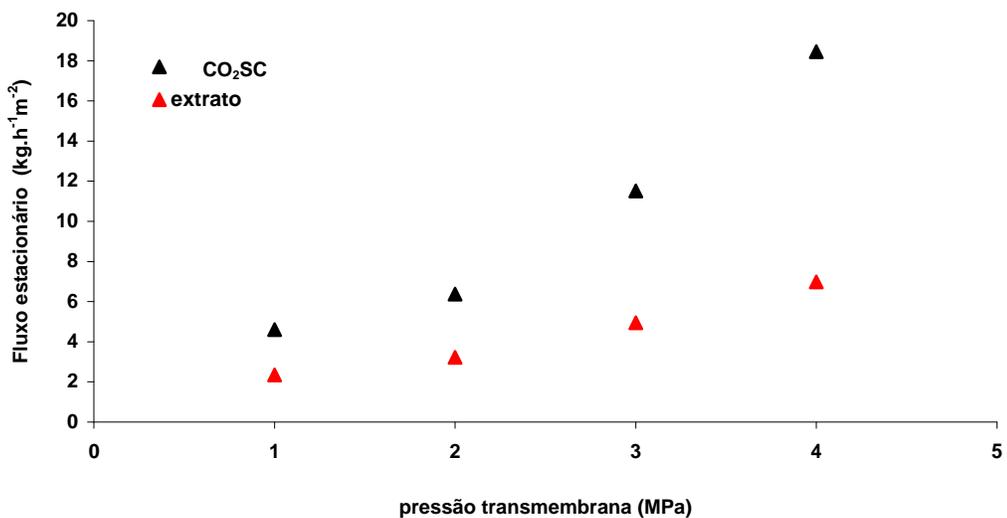


Figura 5.32. Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO₂SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado à membrana NF-90.

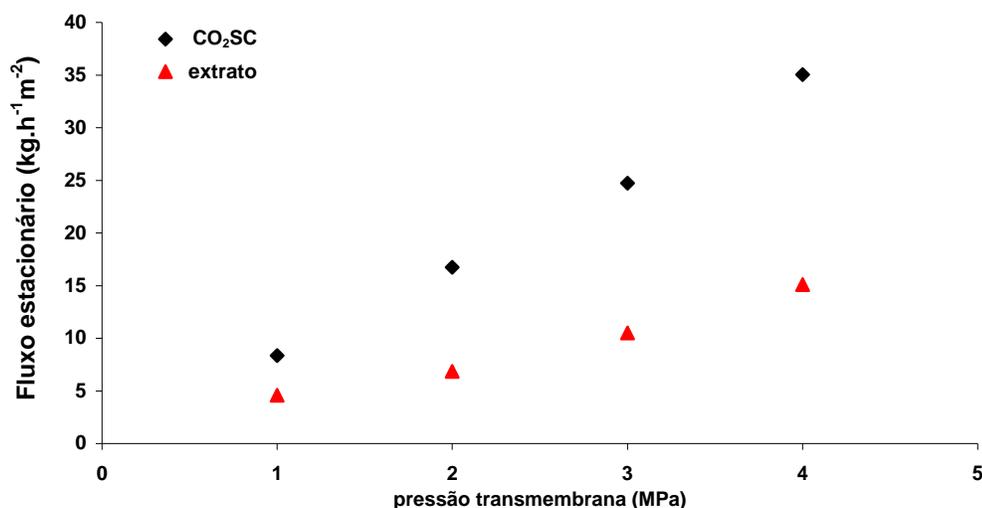


Figura 5.33. Comportamento do fluxo permeado estacionário de CO₂SC e de extrato de cacau em função do diferencial de pressão aplicado à membrana BW-30.

Como os diferenciais de pressão foram os mesmos, não houve necessidade de ensaios com despressurização, uma vez que a compactação das membranas deve-se apenas a pressão exercida e não à mistura de CO₂SC e extrato.

A Tabela 5.5 apresenta a comparação dos valores da permeabilidade das membranas durante a pressurização e despressurização frente ao CO₂SC puro, frente ao CO₂SC proveniente da mistura com extrato de cacau e frente ao próprio extrato. Mostra também a redução das permeabilidades comparadas com os valores observados com CO₂SC puro durante a pressurização, além da variação entre a permeabilidade do extrato e CO₂SC da mistura. As permeabilidades foram calculadas usando as inclinações das melhores retas obtidas dos pelos pontos dos gráficos das Figuras 5.17 a 5.21 e 5.28 a 5.33, de acordo com a Lei de Darcy.

Tabela 5.5. Permeabilidade das membranas frente ao CO₂SC e ao extrato de cacau

Membrana	Permeabilidade das membranas (kg.h ⁻¹ .m ⁻² .Mpa ⁻¹)						
	CO ₂ SC puro pressurização	CO ₂ SC puro Despres.	Redução (%)*	CO ₂ SC Da mistura	Redução (%)*	extrato	Varição (%)**
SG	21,72	23,33	-6,9	3,69	83	1,07	71,0
DL	132,24	109,03	17,6	53,46	59,6	7,19	86,6
HL	189,14	144,77	23,5	69,95	63,0	8,02	88,5
NF	101,89	97,89	3,9	13,85	86,4	4,43	68,0
NF-90	28,12	25,46	9,5	4,67	83,4	1,56	66,6
BW-30	13,22	12,76	3,5	8,81	33,4	3,51	60,2

* Redução em relação à permeabilidade frente ao CO₂SC puro durante a pressurização

**Variação da permeabilidade frente ao extrato com relação à permeabilidade frente ao CO₂SC da mistura

Os resultados apresentados na tabela 5.5 mostram que as membranas DL, HL e NF apresentaram as maiores permeabilidades frente ao CO₂SC puro, frente ao CO₂SC proveniente da mistura com o extrato de cacau e frente ao próprio extrato de cacau. Mesmo sofrendo elevada redução de permeabilidade, estas membranas seriam as melhores indicadas para um processo de separação ou concentração do extrato de cacau, pois apresentam os maiores fluxos permeados. Para melhor análise e comparação entre as membranas, determinaram-se seus índices de retenção de polifenóis.

5.4. Índices de retenção de polifenóis

Para a determinação dos índices de retenção de polifenóis de cada membrana, os experimentos foram realizados a temperatura de 40°C, pressão de alimentação de 150 bar e ΔP de 10 bar para todas as membranas, durante um período de 5 horas. As concentrações de polifenóis no permeado e no retentado podem ser observadas nos perfis cromatográficos das Figuras 5.34 a 5.45. As Tabelas 5.6 a 5.12, mostram as concentrações de cada polifenol de acordo com os picos das Figuras 5.34 a 5.45 e os índices de retenção de cada componente para cada uma das membranas testadas. Os índices de retenção foram determinados de acordo com a equação 4.1.

5.4.1 Membrana SG

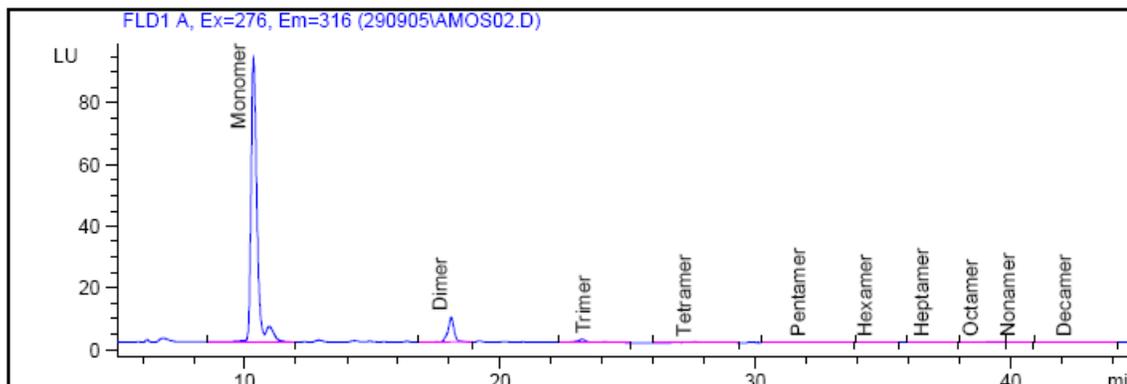


Figura 5.34. Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau permeado pela membrana SG

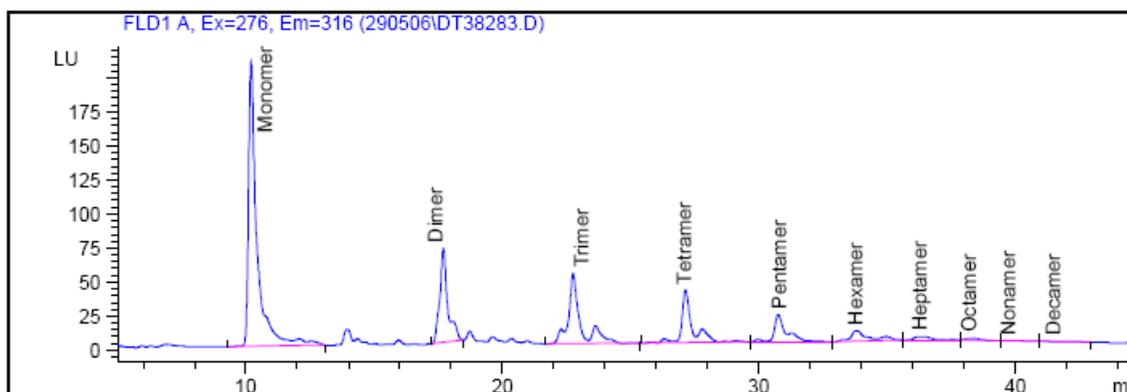


Figura 5.35. Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau retentado pela retentado membrana SG

Tabela 5.6. Polifenóis encontrados no permeado no retentado índices de retenção da membrana SG

pico	componente	concentração permeado(mg/g)	concentração retentado(mg/g)	índice de retenção (%)
1	Monômero	0,582	1,282	54,6
2	Dímero	0,103	0,661	84,4
3	Trímero	0,025	0,705	96,5
4	Tetrâmero	0,011	0,641	98,3
5	Pentâmero	0,023	0,506	95,5
6	Hexâmero	0,022	0,469	95,3
7	Heptâmero	0,019	0,178	89,3
8	Octâmero	0,017	0,161	89,4
9	Nonâmero	0,008	0,222	96,4
10	Decâmero	0,004	0,109	96,3
total		0,885	4,935	82,1

5.4.2 Membrana DL

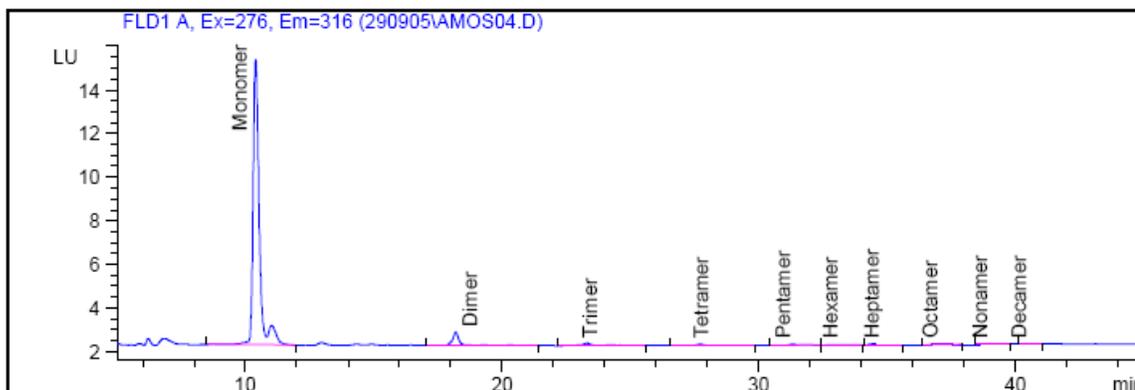


Figura 5.36 Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau permeado pela membrana DL

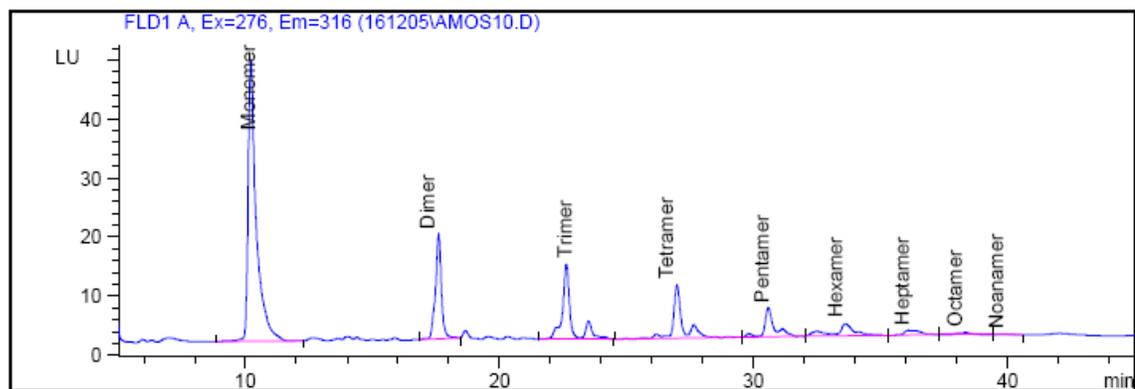


Figura 5.37. Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau retentado pela membrana DL

Tabela 5.7. Polifenóis encontrados no permeado, no retentado e índices de retenção da membrana DL.

pico	componente	concentração permeado(mg/g)	concentração retentado(mg/g)	índice de retenção (%)
1	Monômero	0,056	0,255	78,0
2	Dímero	0,006	0,122	95,1
3	Trímero	0,002	0,122	98,4
4	Tetrâmero	0,002	0,123	98,4
5	Pentâmero	0,001	0,090	98,9
6	Hexâmero	0,001	0,130	99,2
7	Heptâmero	0,001	0,052	98,1
8	Octâmero	0,003	0,048	93,8
9	Nonâmero	0,004	0,054	92,6
10	Decâmero	0,005	0,000	
total		0,083	1,004	91,7

5.4.3 Membrana HL

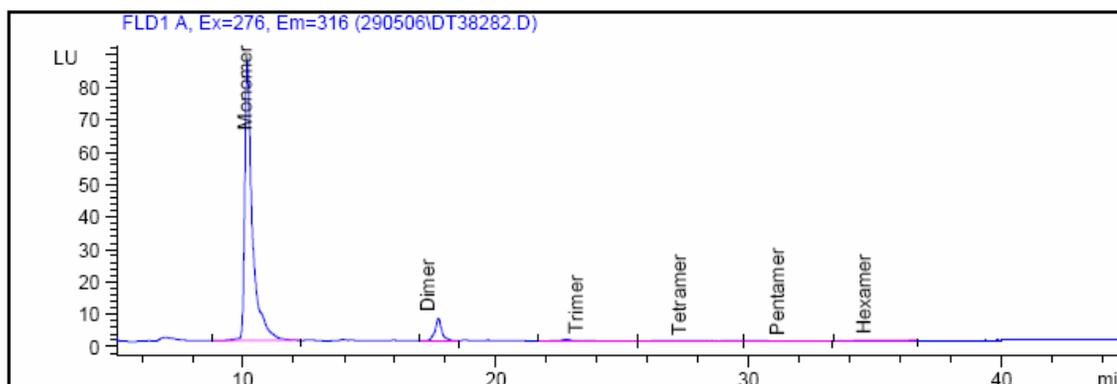


Figura 5.38. Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau permeado pela membrana HL

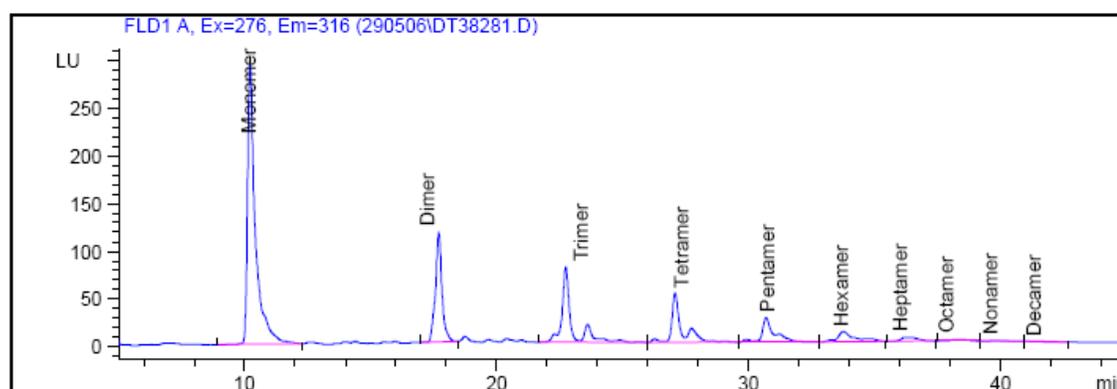


Figura 5.39. Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau retentado pela membrana HL

Tabela 5.8. Polifenóis encontrados no permeado, no retentado e índices de retenção da membrana HL.

pico	componente	concentração permeado(mg/g)	concentração retentado(mg/g)	índice de retenção (%)
1	Monômero	0,503	1,705	70,5
2	Dímero	0,068	0,911	92,5
3	Trímero	0,018	0,873	97,9
4	Tetrâmero	0,012	0,803	98,5
5	Pentâmero	0,010	0,654	98,5
6	Hexâmero	0,018	0,610	97,1
7	Heptâmero	0,000	0,277	100,0
8	Octâmero	0,000	0,245	100,0
9	Nonâmero	0,000	0,276	100,0
10	Decâmero	0,000	0,155	100,0
total		0,629	6,508	90,3

5.4.4 Membrana NF

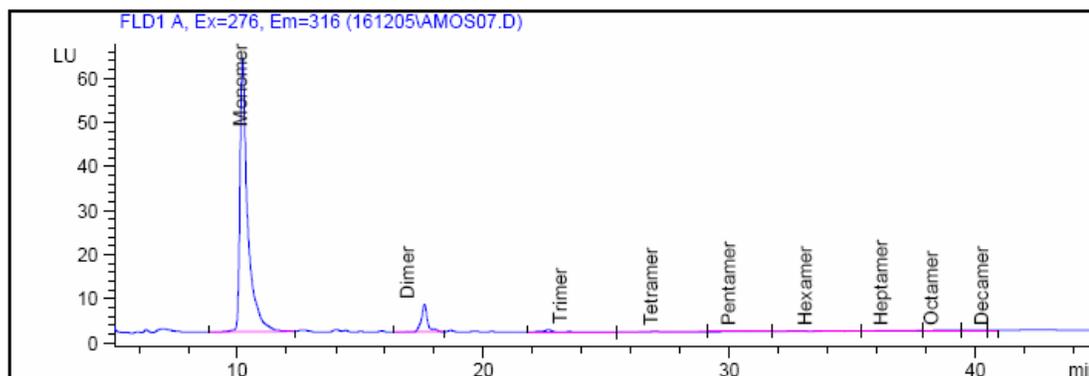


Figura 5.40. Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau permeado pela membrana NF.

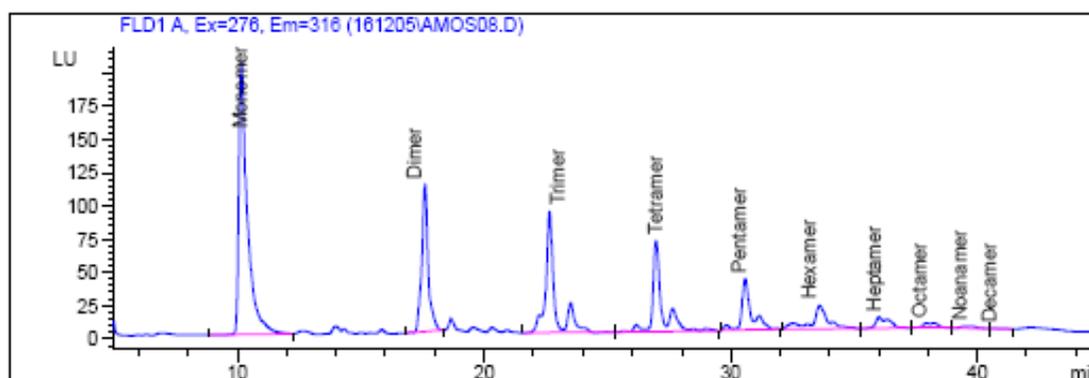


Figura 5.41. Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau retentado pela membrana NF

Tabela 5.9. Polifenóis encontrados no permeado, no retentado e índices de retenção da membrana NF.

pico	componente	concentração permeado(mg/g)	concentração retentado(mg/g)	índice de retenção (%)
1	Monômero	0,302	1,206	75,0
2	Dímero	0,044	0,837	95,0
3	Trímero	0,007	0,919	99,3
4	Tetrâmero	0,002	0,908	99,8
5	Pentâmero	0,003	0,725	99,6
6	Hexâmero	0,013	0,868	98,5
7	Heptâmero	0,005	0,399	98,7
8	Octâmero	0,005	0,348	98,6
9	Nonâmero	0,004	0,429	99,1
10	Decâmero	0,003	0,116	97,4
total		0,387	6,755	94,3

5.4.5 Membrana NF-90

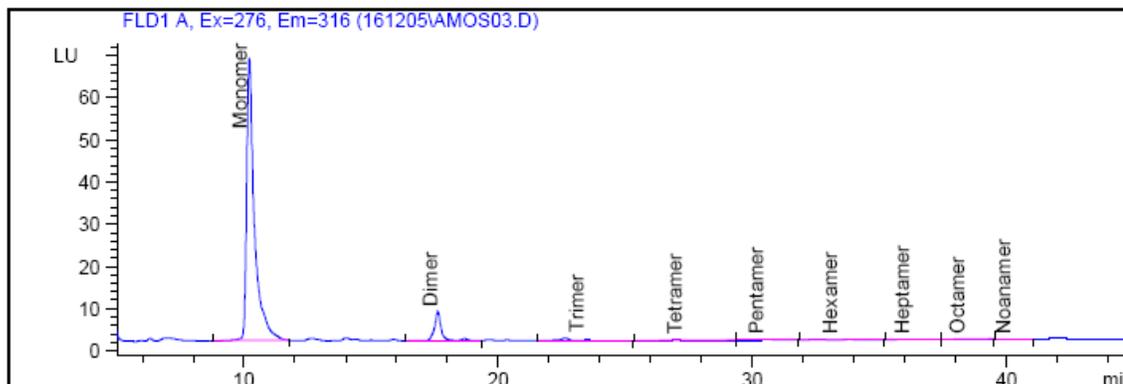


Figura 5.42. Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau permeado pela membrana NF-90.

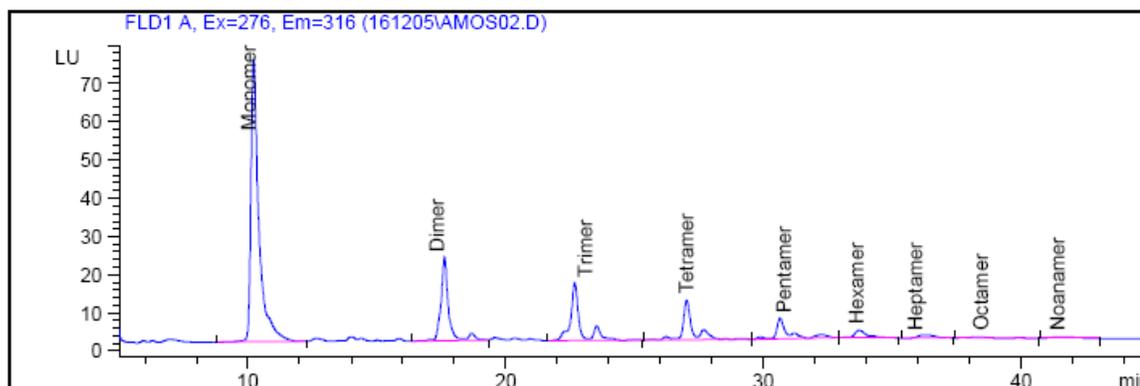


Figura 5.43. Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau retentado pela membrana NF-90.

Tabela 5.10. Polifenóis encontrados no permeado, no retentado e índices de retenção da membrana NF-90.

pico	componente	concentração permeado(mg/g)	concentração retentado(mg/g)	índice de retenção (%)
1	Monômero	0,362	0,410	11,7
2	Dímero	0,059	0,203	70,9
3	Trímero	0,009	0,165	94,5
4	Tetrâmero	0,003	0,156	98,1
5	Pentâmero	0,002	0,135	98,5
6	Hexâmero	0,015	0,093	83,9
7	Heptâmero	0,005	0,053	90,6
8	Octâmero	0,005	0,056	91,1
9	Nonâmero	0,005	0,232	97,8
10	Decâmero	0,000	0,000	
total		0,464	1,503	69,1

5.4.6 Membrana BW-30

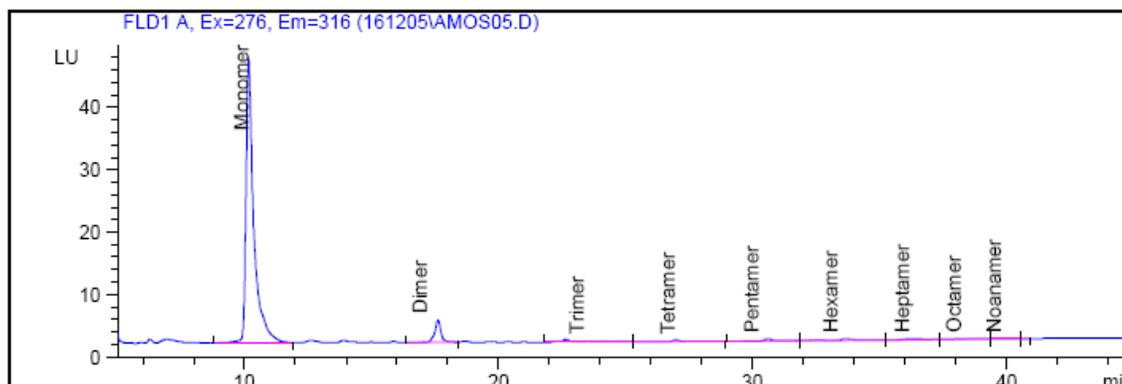


Figura 5.44. Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau permeado pela membrana BW-30.

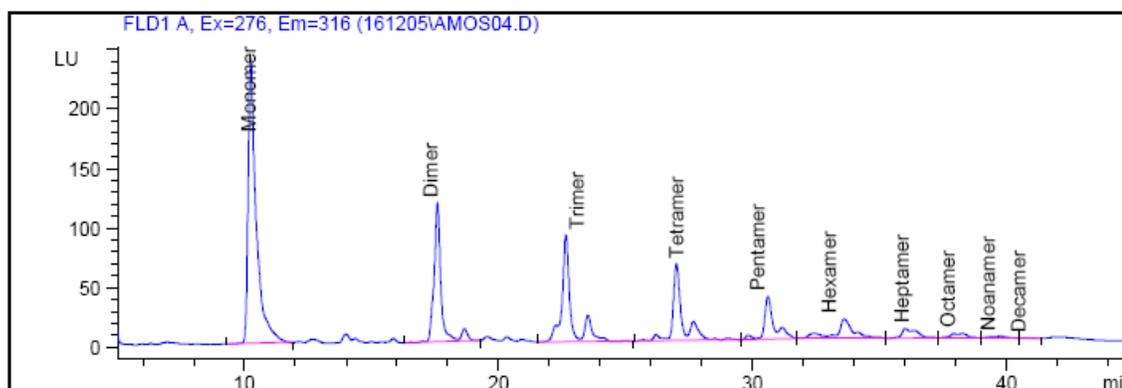


Figura 5.45. Perfil cromatográfico dos polifenóis encontrados no extrato de cacau retentado pela membrana BW-30.

Tabela 5.11. Polifenóis encontrados no permeado, no retentado e índices de retenção da membrana BW-30.

pico	componente	concentração permeado(mg/g)	concentração retentado(mg/g)	índice de retenção (%)
1	Monômero	0,251	1,384	81,9
2	Dímero	0,028	1,007	97,2
3	Trímero	0,007	0,950	99,3
4	Tetrâmero	0,005	0,926	99,5
5	Pentâmero	0,008	0,707	98,9
6	Hexâmero	0,021	0,866	97,6
7	Heptâmero	0,013	0,402	96,7
8	Octâmero	0,016	0,359	95,5
9	Nonâmero	0,017	0,446	96,2
10	Decâmero	0,002	0,089	97,8
total		0,368	7,136	94,8

Tabela 5.12. Quantidade de polifenóis encontrados no permeado das membranas testadas

		quantidades de polifenóis no permeado (mg/g)					
Pico	Componente	SG	DL	HL	NF	NF-90	BW-30
1	Monômero	0,582	0,056	0,503	0,302	0,363	0,251
2	Dímero	0,103	0,006	0,068	0,044	0,059	0,028
3	Trímero	0,025	0,002	0,018	0,007	0,009	0,007
4	Tetrâmero	0,011	0,002	0,012	0,002	0,003	0,005
5	Pentâmero	0,023	0,001	0,01	0,003	0,002	0,008
6	Hexâmero	0,022	0,001	0,018	0,013	0,015	0,021
7	Heptâmero	0,019	0,001	0	0,005	0,005	0,013
8	Octâmero	0,017	0,003	0	0,005	0,005	0,016
9	Nonâmero	0,008	0,004	0	0,004	0,005	0,017
10	Decâmero	0,004	0,005	0	0,003	0	0,002
Total		0,885	0,083	0,629	0,387	0,464	0,368

Tabela 5.13. Quantidade de polifenóis encontrados no retentado das membranas testadas

		quantidades de polifenóis no retentado (mg/g)					
Pico	Componente	SG	DL	HL	NF	NF-90	BW-30
1	Monômero	1,282	0,255	1,705	1,206	0,41	1,384
2	Dímero	0,661	0,122	0,911	0,837	0,203	1,007
3	Trímero	0,705	0,122	0,873	0,919	0,165	0,95
4	Tetrâmero	0,641	0,123	0,803	0,908	0,156	0,926
5	Pentâmero	0,506	0,09	0,654	0,725	0,135	0,707
6	Hexâmero	0,469	0,13	0,61	0,868	0,093	0,866
7	Heptâmero	0,178	0,052	0,277	0,399	0,053	0,402
8	Octâmero	0,161	0,048	0,245	0,348	0,056	0,359
9	Nonâmero	0,222	0,054	0,276	0,429	0,232	0,446
10	Decâmero	0,109	0	0,155	0,116	0	0,089
Total		4,935	1,004	6,508	6,755	1,503	7,136

A Tabela 5.14 apresenta um resumo dos índices de retenção de cada um dos componentes do extrato de cacau para cada uma das membranas utilizadas. A Tabela 5.14 mostra que os índices de retenção dos polifenóis apresentados pelas membranas de nanofiltração DL, HL e NF e pela membrana de osmose inversa BW-30 foram superiores a 90%, o que indica que sob este aspecto, estas membranas seriam as mais indicadas para um processo de separação ou concentração do extrato de cacau.

Tabela 5.14. resumo dos índices de retenção de cada um dos componentes do extrato de cacau para cada uma das membranas utilizadas

Componente	Índices de retenção (%)/membrana					
	SG	DL	HL	NF	NF-90	BW-30
Monômero	54,6	78,0	70,5	75,0	11,7	81,9
Dímero	84,4	95,1	92,5	95,0	70,9	97,2
Trímero	96,5	98,4	97,9	99,3	94,5	99,3
Tetrâmero	98,3	98,4	98,5	99,8	98,1	99,5
Pentâmero	95,5	98,9	98,5	99,6	98,5	98,9
Hexâmero	95,3	99,2	97,1	98,5	83,9	97,6
Heptâmero	89,3	98,1	100	98,7	90,6	96,7
Octâmero	89,4	93,8	100	98,6	91,1	95,5
Nonâmero	96,4	92,6	100	99,1	97,8	96,2
Decâmero	96,3		100	97,4		97,8
Total	82,1	91,7	90,3	94,3	69,1	94,8

6. CONCLUSÕES

Dentro do que foi proposto para este trabalho podemos concluir que os resultados alcançados durante os experimentos mostraram que o CO₂SC puro não se apresenta como um solvente adequado para extração de polifenóis de sementes de cacau, devido à polaridade destes compostos. Os resultados mostraram, também, que o etanol puro à pressão atmosférica também não se apresenta como solvente adequado para extração de polifenóis. O rendimento máximo final foi de 38,6% nas extrações quando o processo foi conduzido a 40°C, 80 bar, volume de álcool 85° GL correspondente a 200% da massa de cacau. Entretanto, o rendimento foi de 42,8%, nas mesmas condições de pressão e temperatura, quando se utilizou o etanol 92,8 GL e um rendimento de 41,6% com etanol 92,8 GL, porém a 150 bar. Os rendimentos com quantidades menores de etanol foram baixos. A análise estatística dos resultados obtidos pela análise do planejamento experimental, mostrou que o fator quantidade de etanol é o único fator estatisticamente significativo sobre a variável resposta rendimento. Por uma questão econômica pode-se utilizar etanol 85GL, mais barato e utilizar-se pressão de 80 bar com menor consumo de energia e se obter um rendimento ainda próximo de 40% na extração dos polifenóis. Pressões mais elevadas do que 150 bar estão condicionadas às limitações do equipamento que foi projetado para pressão máxima de 200 bar.

Todas as membranas utilizadas apresentaram bom comportamento quanto à resistência mecânica provocada pelos diferenciais de pressão transmembrana. Também foram pouco sensíveis à histerese, o que ficou demonstrado pela boa reversibilidade das condições iniciais de fluxo, quando se aplicaram a pressurização seguida de despressurização. Isto foi verificado pela observação de pequena diferença entre os fluxos de CO₂SC puro durante os dois procedimentos citados. Como não houve aumento no fluxo estacionário de CO₂SC ou de extrato de cacau durante o tempo em que as membranas estiveram em contato com estas substâncias, quando submetidas a um mesmo diferencial de pressão transmembrana. Concluiu-se, portanto, que todas apresentaram resistência química frente aos componentes do extrato de cacau ou pelo CO₂SC. Por outro lado o grau de entupimento de todas as membranas mostrou-se bastante elevado, demonstrado pela redução dos fluxos de CO₂SC, quando da caracterização frente à mistura do solvente com extrato de cacau.

As membranas utilizadas foram selecionadas levando em conta sua comprovada aplicabilidade em processos de separação de compostos orgânicos com alguma polaridade. Com as membranas de nanofiltração DL, HL e NF foram obtidos as maiores permeabilidades

frente ao CO₂SC puro, ao CO₂SC proveniente da mistura com extrato de cacau e ao próprio extrato de cacau. Os índices de retenção de polifenóis obtidos pelas membranas DL, HL, NF e BW-30, foram todos superiores a 90% quando submetidas a um diferencial de pressão de 10 bar. Uma vez que sob os demais aspectos analisados, todas as membranas apresentaram bom comportamento pode-se definir que as membranas que apresentaram melhores permeabilidades combinadas com melhores índices de retenção de polifenóis foram as membranas DL, HL e NF. Nestas condições, é mostrado a possibilidade de utilização do processo de separação com membranas na obtenção de polifenóis extraídos de sementes de cacau, permitindo um menor consumo de energia para repressurização do CO₂ e do co-solvente utilizado. Desta forma, pode-se propor um processo de extração supercrítica utilizando-se CO₂ como solvente, etanol 85 GL como co-solvente, pressão de 80 bar, temperatura de 40°C para extração de polifenóis de semente de cacau moído a um diâmetro de partícula médio de 48 mesh. Na seqüência, propõe-se, também, a utilização do processo de concentração ou separação dos polifenóis através de membranas poliméricas comerciais de nanofiltração modelos DL e HL (Osmonics) e modelo NF (Filmtec-Dow).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Àlvarez , S., Riera, F. A., Àlvarez, R. Coca, J. Prediction of flux and aroma compounds rejection in a reverse osmosis concentration of apple juice model solutions. **Ind. Eng. Chem. Res.** Vol. 40, p.4925-4934, 2001.
- Araujo, J. M. A. Química de Alimentos: Teoria e prática. Viçosa: Editora UFV, 2ª edição, 416p, 1999.
- Arriagada-Carrazana, J.P.; Sáez-Navarrete, C.; Bordeu, E. Membrane filtration effects on aromatic and phenolic quality of Cabernet Sauvignon wines. **Journal of Food Engineering.** V. 68, p. 363-368, 2005.
- Arts, I. C. W., Hollman, P. C. H., Kromhout, D. Chocolate as a source of tea flavanoids. **The Lancet.** V. 354, p. 488, 1999
- Balanec, B.; Vouch, M.; Rabiller-Baudry, M.; Chaufer, B. Comparative study of different nanofiltration and reverse osmosis membranes for dairy effluent treatment by dead-end filtration. **Separation Purification technology.** V. 42, p. 195-200, 2005.
- Bloch, A.; Thomsom, C. A. Position of The American Dietetic Association: Phytochemicals and Functional Foods. **J. Am. Diet. Assoc.** V. 95, p. 493, 1995.
- Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, an nutritional significance. **Nutrition Reviews.** V. 56 (11), 317 – 333. 1998.
- Bruni, R., Medici, A., Guerrini, A., Scalia, S., Poli, F., Romagnoli, C., Muzzoli, M., Sacchetti, G. Tocopherol, Fatty Acids and Sterol Distributions in Wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* (Sterculiaceae) Seeds. **Food Chemistry.** V. 77. p 337-341. 2002.
- Brunner, G. Gás Extraction: An Introduction to the Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes. Darmstadt. Alemanha: Steinkopff, vol. 4, 385p, 1994.
- Cakirer, M. S. COLOR AS AN INDICATOR OF FLAVANOL CONTENT IN THE FRESH SEEDS OF *THEOBROMA CACAO L.* Thesis in Food Science for the Degree of Master of Science. The Pennsylvania State University, College of Agricultural Sciences. 2003
- Calame, J. P.; Steiner, R. CO₂ Extraction in the Flavour and Perfumery industries. **Chemistry and Industry**, vol. 19, p. 399-402, 1992.
- Carlson, L.H.C., Machado, R. A. F., Spricigo, C. B., Pereira, L. K. and Bolzan, A. Extraction of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 21, p.33-39, 2001
- Chiehming, J. C., Hyi-ming W., Po-wen, Y. High-pressure carbon dioxide and co-solvent extractions of crude oils from plant materials. **Innovative Food Science & Emerging Technologies.** v. 1, p. 187-191, 2001.
- Chiehming, J. C., Kou-Lung, C., Ying-Ling, C., Ching-Yuan, C. Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction. **Food Chemistry.** v. 68, p. 109-113, 2000.

- Coe, S. D. & Coe, M.D. The True History of Chocolate. Ney York: **Thames and Hudson**. 1996.
- Costa, C. T.; HORTON, D.; MARGOLIS, S. A. Review. Analysis of anthocyanins in food by liquid chromatography, ligiquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p.403-410, 2000.
- Counet,C. and Collin S. Effect of the Flavonol Units on the Antiooxidant Activity of Procyanidin Fractions Isolated from Chocolate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 51, p. 6816-6822, 2003.
- Cros, E. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. I Evolution des tanis et des phenols totaux de la feve. **Café cacao the** 26 (2), 109-114. 1982
- Cros, E. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. II Estimation de la matiere colorant rouge des feves de cacao. **Café cacao the** 26 (2), 115-122. 1982.
- Cros, E. Recherche d'un indice de fermentation du cacao. III Evolution des flavan-3-ols de la feve. **Café cacao the** 33(3), 165-170. 1989.
- Dauksas, E., Venskutonis, P. R., Sivik, B., Nillson, T. Effect of fast CO₂ pressure changes on the yield of lovage (*Levisticum officinale* Koch.) and celery (*Apium graveolens* L.) extracts, **J. Supercrit. Fluids**, V. 22, p. 201- 210, 2002.
- Della Porta, G., Porcedda, Marongiu, S. B., Reverchon, E. Isolation of eucalyptus oil by supercritical fluid extraction, **Flavour Fragr. J.** V. 14, p. 214-218, 1999.
- Gaulejac, N. S., Provost, C. and Vivas, N. Comparative Study of Polyphenol Scavenging Activities Assessed by Different Methods. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. V. 47, p. 425-431, 1999.
- Gaspar, F., Lu, T., Santos, R., Al-Duri, B. Modelling the extraction of essential oils with compressed carbon dioxide, **J. Supercrit. Fluids**, V. 25, p. 247-260, 2003.
- Guo, W. F. & Chung, T. S. Study and characterization of the hysteresis behavior of polyimide membranes in the thermal cycle process of pervaporation separation. **J. of Membrane Science** V.253 p. 13-22, 2005.
- Grigonis, D., Venskutonis, P. R., Sivik, B., Sandahl, M., Eskilsson, C. M. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloe odorata*), **J. Supercrit. Fluids** V. 33, p. 223-233, 2005.
- Hammerstone, J. F., Lazarus, S. A., Rucker, R., Schmitz, H. H. Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. **Journal of Nutrition**, 130 (8), 2086-2092, 2000.
- Higashijima, T., Ohya, H., Tsuchiya, Y., Tokunaga, H., Aibara, M., Negishi, Y. Separation of supercritical mixtures of CO₂ and petroleum components with an asymmetric polyimide membrane. **Journal of Membrane Science**. V. 93, p.165-172, 1995.

Ibanez, E., Oca, A., De Murga, G., Lopez-Sebastian, S., Tabera, J., Reglero, G. Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants, **J. Agric. Food Chem.** V. 47, p. 1400-1404, 1999.

Kallithraka, S., Garcia-Viguera, C., Bridle, P., Bakker, J. Survey of solvents for the extraction of grape seed polyphenol. **Phytochem. Anl.** V. 6, p 265, 1995.

Kealey, K. S., Snyder, R. M., Romanczyk, L. J., Geyer, H. M., Myers, M. E., Withcare, E. J., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H. Cocoa Components, Edible Products Having Enhanced Polyphenol Content, Methods of Making Same and Medical **Patent Cooperation Treaty (PCT) WO98/09533, Mars Incorporated, USA, 1998.**

Kimura, K., Amy, G., Drewes, J. E., Heberer T., Kimb, T., Watanab, Y., a Rejection of organic micropollutants (disinfection by-products, endocrine disrupting compounds, and pharmaceutically active compounds) by NF/RO membranes. **Journal of Membrane Science** V. 227, p. 113-121, 2003

Kris-Etherton, P. M., & Keen, C. L. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. **Current Opinion in Lipidology** 13 (1), 41-49, 2002.

Lange, H. & Fincke, A. Kakao und schokolade. In L. Acker. **Handbuch der Lebensmittel** VI: pp 210-309, 1970.

Madras, G.; Thiboud, C.; Erkey, C.; Akgerman, A. A Modeling of Supercritical Extraction of Organics from Solid Matrices. **AIChE Journal**, vol. 40, n. 5, p. 777-785, 1994.

Mao, T.K., Powell, J.W., Keen, C.L., Shimitz, H.H, Hammerstone, J.F., Gershwin, M.E. The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 β in peripheral blood mononuclear cells. **Life Sciences, Elmsford**, v. 66; n. 15; p.1377-1386, 2000.

Matsuura, T. Synthetic membranes and membrane separation processes. CRC Press. USA, 387p., 1994.

Mckay, D. L. & Blumberg, J. B. The role of tea in human health: An Update. **Journal of the Americam College of Nutrition**, 21 (1), 1-13, 2002.

Metivier, R. P.; Francis, F. J.; Clydesdale, F. M. Anthocyanins as food colors. **Journal Food Science.** V. 2, p. 41 – 65, 1982.

Mursu, J., Voutilainen, S., Rissanen, T. H., Virtanen, J. K., Nurmi, T., Kaikkonen, J., Nyysynen, K., Salonen, J.T., Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol, concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. **Radical Biology & Medicine**, 2004.

Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G. S.,Kakuda, Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. **Separation Purification Technology.** V. 48, p. 176-181, 2006.

Niwa, M., Ohya, H., Kuwahara, E., Negishi, Y. **J. Chem. Eng. Japan**, V. 21, p. 164, 1988.

- Oikawa, E., Katoh, K., Aoki, T. **Sep. Sci. Tech.** V. 26, p. 569, 1991.
- Osman, H., Nazaruddin, R., Lee, S.L., Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. **Food Chem.** V. 86, p. 41–45, 2004.
- Pekic, B., Kovac, V., Alonso, E. and Revilla, E. Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. **Food Chemistry.** V.61, n.1/2, p.201-206, 1998.
- Pereira, C. G., Marques, M. O. M., Barreto, A. S., Siani, A. S., Fernandes E. C., Meireles, A. A. Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO₂+ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. **J. of Supercritical Fluids**, V.30, p. 51-61, 2004
- Porter, L.J., Ma, Z., Chan, B.G., Cacao procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry**, V. 30 (5), p. 1657–1663, 1991.
- Perry, R. H.; Green, D. W. Perry's Chemical Engineers' Handbook. 7th Edition, London: McGraw Hill, 1997
- Rein, D., Paglieroni, T. G., Wun, T., Pearson, D. A., Schmitz, H. H., Gosselin, R., Keen, C. L. Cocoa Inhibits Platelet Activation and Function. **American Journal of Clinical Nutrition.** 72(1), 30-35, 2000
- Rizvi, S. S. H. Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials. Blackie Academic e Professional. London: Chapman & Hall, 459 p. 1994.
- Romanczyk, L. J., Hammerstone, J. F., Buck, M. M. Procyanidin Composition and Methods for Making the Same. **US patent 6.479.539**, 2002A.
- Sanders, N. Food legislation and the scope for increased use of near – critical fluid extraction operations in the food, flavouring and pharmaceutical industries. In: KING, M. B. e BOTT, T. R. **Extraction of natural products using near – critical solvents.** London: Chapman & Hall, 325p, 1993.
- Sanbongi, C.; Osakabe, N.; Natsume, M.; Takizawa, T.; Gomi, S., & Osawa, T. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 2, p. 454-457, 1998.
- Saito, M. Antiulcer activity of grape seeds and procyanidins. **Journal Agric. Food Chem.** V. 46, p. 1460-1464, 1998.
- Salgin, U. Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO₂+ethanol mixture in green and high-tech separation process. **J. of Supercritical Fluids** (article in press) (2006).
- Sartorelli, L. & Bruner, G. Separation of extracts from supercritical carbon dioxide by means of membranes. In: **proceedings of the 2nd International meeting on high pressure chemical engineering** , Hamburg, Germany, 2001.

Semenova, S. I., Ohya, H., Higashijima, T., Negishi, Y. Separation of supercritical CO₂ and ethanol mixtures with asymmetric polyimide membrane. **Journal of Membrane Science**. V. 74, p. 131-139, 1992.

Shukla, R. & Cheryan, M. Performance of ultrafiltration membranes in ethanol-water solution: effect of membrane conditioning. **Journal of Membrane Science**. V. 198, p. 75-85, 2002.

Smith Jr., R. L., Malaluan, R. M., Setianto, W. B., Inomata, H., Arai, K. Separation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid with supercritical carbon dioxide, **Biores. Technol.** V. 88, p. 1-7, 2003.

Singleton, V. L., Naturally occurring food toxicants: Phenolic substances of plant origin common in foods. *Adv. Food. Res.*, V. 27, p. 149-242, 1981.

Sprícigo, C.B.; Bolzan, A.; Machado, R.A.F.; Carlson, L.H.C.; Petrus, J.C.C., Separation of nutmeg essential oil and dense CO₂ with a cellulose acetate reverse osmosis membrane. **Journal of Membrane Science**, Vol. 188, p. 173, 2001.

Sun, Y., Shekunov, B. Y. Surface tension of ethanol in supercritical CO₂. *J of Supercritical Fluids*, V.27, p.73-83, 2003.

Teberikler, L., Koseoglu, S. S., Akgerman, A. Selective extraction of phosphatylcholine from lecithin by supercritical carbon dioxide/ethanol mixture, **J. Am. Oil Chem. Soc. (JAOCS)** V. 78, p. 115-119, 2001.

Vasapollo, G., Longo, L., Restio, L., Ciurlia, L. Innovative supercritical CO₂ extraction of Lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent, **J. Supercrit. Fluids**, V. 29, p. 87-96, 2004.

Verstraeten, S. V., Hammerstone, J. F., Keen, C. L., Fraga, C. G. And Oteiza, P. I. Antioxidant and Membrane Effects of Procyanidin Dimers and Trimers isolated from Peanut and cocoa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 53, p. 5041-5048, 2005.

Vilaplana, F., Osorio-Galindo, M., Iborra-Clar, A., Alcaina-Miranda, M. I., Ribes-Greus, A. Swelling behavior of PDMS-PMHS pervaporation membranes in ethyl acetate water mixtures, **J. Appl. Polym. Sci.** V.93, p. 1384, 2004.

Wan, Y., Etherton, T. D., Vinson, J., Kris-Etherton, P. M. Effects of cocoa powder and dark chocolate on cardiovascular disease risk factors. **FASEB Journal**, 14 (4), A 563, 2000.

Wang, J.F.; Schran, D.D.; Holt, R.R.; Ensunsa, J.L.; Fraga, C.G.; Schmitz, H.H; Keen, C.L. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. **Journal of Nutrition**, n.130. p.2115S-2119S, 2000.

Williams, D. F. Extraction with supercritical gases. **Chemical Engineering Science**. Vol. 38. n.11 p. 1769-1788,1981

Wollgast, J., Anklam, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, 33, 423-447, 2000.

Yeomin Y. & Richard M. L. Removal of organic contaminants by RO and NF membranes. **Journal of Membrane Science**. Article in press, 2005.

Zhao B. Antioxidant effects of green tea polyphenols. **Chinese Science Bulletin**. V. 48-4, p. 315-319, 2003.

Zhu, Q. Y., Holt, R. R., Lazarus, S. A., Orozco, T. J., Keen, C. L. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. **Experimental Biology and Medicine**, 227 (5), 321-329, 2002.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.