

VALORIZAÇÃO DA CASCA DO GRÃO DE CACAU (*Theobroma cacao* L.): EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS E MODIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COM CO₂ SUPERCRÍTICO

Palavras-Chave: FLUÍDOS SUPERCRÍTICOS, NOVAS TECNOLOGIAS, FUNCIONALIDADE PROTEICA.

Autores (as):

Daniella Pacheco Castro Miguez, FEA – UNICAMP

Isabela Ferreira Moreno, FEA – UNICAMP

Rafael Fernandes Almeida, FEA – UNICAMP

Prof.Dr. Eduardo Augusto Caldas Batista, FEA – UNICAMP

Prof. Dr. Julian Martínez (orientador), FEA – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A produção de grãos de cacau (*Theobroma cacao* L.) atingiu cerca de 4,8 milhões de toneladas na safra mundial de 2021/2022, segundo a *International Cocoa Organization* (ICCO, 2024), sendo os principais países produtores a Costa do Marfim, Gana, Indonésia, Nigéria, Equador, Camarões e Brasil, que contribuem com quase 90% da produção total (Okiyama; Navarro; Rodrigues, 2017).

Os grãos de cacau são compostos por uma casca externa correspondente a, aproximadamente, 12% a 20% do grão, que envolve dois cotilédones e um pequeno germe (Okiyama; Navarro; Rodrigues, 2017; Perez; Lopez-Yerena; Vallverdú-queralt, 2020). Durante o processamento do cacau, a casca do grão (*CBS- Cocoa Bean Shells*) é removida por meio de joeiradora por diferença de densidade, juntamente com o gérmen, antes ou após a torra, resultando nos nibs utilizados na fabricação de chocolate (Mendes & Lima, 2007; Okiyama; Navarro; Rodrigues, 2017).

Considerando a safra mundial do grão de cacau, a quantidade total de CBS gerada é estimada em aproximadamente 770 mil toneladas por ano (ICCO, 2024), uma cifra substancial cujo potencial econômico tem sido negligenciado (Handojo; Triharyogi). Apesar de conter nutrientes benéficos como polifenóis (1–2%), alcalóides como a teobromina, vitamina D, minerais como cálcio e fósforo, aminoácidos essenciais como a lisina (28,4%), tirosina (18,7%), fenilalanina (14,1%) e histidina (7,7%), além de fibras alimentares solúveis e insolúveis (cerca de 25-30%), a CBS ainda é considerada um resíduo em produtos derivados dos grãos de cacau, sendo é utilizada como combustível para caldeiras ou subutilizada na alimentação animal e na preparação de fertilizantes (Handojo; Triharyogi; Indarto, 2019; Okiyama; Navarro; Rodrigues, 2017; ; Younes; Li; Karboune, 2022).

Com o aumento da preocupação global em busca do desenvolvimento sustentável, no qual equilibra-se o crescimento econômico, proteção ambiental e equidade social para garantir um futuro viável para as próximas gerações, destaca-se o conceito de economia circular que visa maximizar o valor dos recursos por meio da redução, reutilização e reciclagem, ao contrário do modelo linear de "produzir, usar e descartar" (Handojo; Triharyogi; Indarto, 2019). Tendo em vista a grande quantidade de CBS gerada, tem crescido o interesse no aproveitamento e recuperação econômica do material, refletido na busca por alternativas sustentáveis que minimizem o desperdício de resíduos diante da escassez de recursos naturais (Handojo; Triharyogi; Indarto, 2019).

A extração por fluídos supercríticos (SFE – *Supercritical Fluid Extraction*) é uma alternativa verde que se caracteriza pelo uso de solventes em temperaturas e pressões superiores aos seus valores críticos, visando à melhora na extração de compostos de interesse como óleos, ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas,

carotenoides, compostos antioxidantes (Dunford et al., 2003; Machado et al., 2013). Termodinamicamente, a densidade do CO₂ supercrítico assemelha à do líquido e a difusividade e viscosidade são próximas às do gás (Zhong; Jin, 2008). A elevada densidade contribui para uma maior solubilização de compostos, enquanto suas baixas viscosidades possibilitam a penetração em sólidos e o escoamento com menor resistência, aumentando a capacidade de penetrar e extrair compostos alvo dos materiais de origem (Dunford et al., 2003).

Além da polaridade do solvente lhe conferir capacidade de solubilizar substâncias lipofílicas, as condições termodinâmicas para o estado supercrítico do CO₂ são facilmente alcançadas (temperatura crítica de 31,1°C e pressão crítica de 7,38 MPa), o que previne a degradação térmica de compostos termolábeis frente à baixa temperatura (Sahena, et al., 2009). Ademais, o CO₂ é considerado um solvente sustentável facilmente reciclado e reutilizado com características favoráveis, como não ser tóxico, não ser inflamável, ser quimicamente inerte e fisiologicamente seguro (Sahena, et al., 2009).

Após a extração lipídica com CO₂ supercrítico (sc-CO₂) o percentual proteico da torta residual desengordurada é, por conseguinte, mais elevado quando comparado à amostra inicial, conferindo ao tratamento supercrítico relevância de estudo como meio de modificação da estrutura e conformação de proteína, o que pode inferir em alterações em sua funcionalidade (Monhemi; Housaindokht, 2019; Sá et al., 2021; Sahena et al., 2009; Xu et al., 2011; Zhong; Jin, 2008).

Dessa forma, frente ao potencial econômico e social do estudo das funcionalidades da CBS e das vantagens do uso do CO₂ supercrítico na SFE como método de tratamento capaz de modificar proteínas, este trabalho visou à extração lipídica e ao tratamento da CBS com sc-CO₂, de forma simultânea, com análise e caracterização do óleo extraído e da torta de CBS pós-tratamento.

METODOLOGIA:

O preparo da amostra utilizada nas análises consistiu na trituração da CBS, proveniente de Tuere – PA que, em seguida, foi passada em peneiras (1,0 mm) e armazenada em frascos herméticos a -18 °C.

Extração de lipídeos com sc-CO₂

A extração de lipídeos da CBS com sc-CO₂ foram realizados em uma unidade multipropósito desenvolvida no LAPEA (Laboratório de Alta Pressão em Engenharia de Alimentos), seguindo a metodologia descrita por Viganó et al. (2016) com modificações. As temperaturas utilizadas foram de 40, 50 e 60 °C e as pressões de 15, 25 e 35 MPa, com a vazão de CO₂ constante em aproximadamente 5 g/min. Foram utilizados cerca de 4 g de amostra, adicionadas à célula de extração. Os experimentos foram feitos com 10 minutos de tempo estático e 45 minutos de tempo dinâmico, sendo executados em duplicata, totalizando 18 extrações.

Rendimento global (X₀)

O X₀ foi determinado para a extração de lipídeos com sc-CO₂ por meio da Equação 1 e expresso em porcentagem (%):

$$X_0 = \frac{M_{\text{extrato}}}{M_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (1)$$

Onde M_{extrato} corresponde à massa do extrato e M_{amostra} à massa da amostra.

Perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos dos extratos de CBS obtidos com sc-CO₂ foi determinado seguindo a metodologia da AOCS (2017), método Ce 1-62 com o uso de um cromatógrafo a gás (Agilent, modelo 7890B, EUA) equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar (Agilent, modelo DB-WAX, EUA) (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm) e hélio como gás de arraste (25 mL/min). A temperatura do injetor e detector foi ajustada em 250 e 300 °C, respectivamente, com volume de ingestão de 1 mL. A temperatura da coluna variou de 50 a 250 °C, seguindo as seguintes condições: aumento de 15 °C/min até atingir 120 °C, seguido de 15 minutos de *hold*; aumento de 4 °C/min até atingir 200 °C seguido de 3 minutos de *hold*; aumento de 4 °C/min até atingir 250 °C. A conversão dos ácidos graxos em ésteres metílicos de ácidos graxos seguiu a metodologia proposta por Hartman e Lago (1973) e os picos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME mix C8 – C24; Sigma Aldrich, EUA).

Perfil de triacilgliceróis

O perfil de triacilgliceróis dos extratos de CBS obtidos com sc-CO₂ foi determinado seguindo a metodologia de Antoniosi Filho et al. (1995). As composições de triacilgliceróis foram obtidas por meio de uma análise combinatória, considerando o modelo de distribuição aleatória de ácidos graxos ligados à porção de glicerol. Os triacilgliceróis foram calculados com o uso do algoritmo implementado no software MATLAB (versão 6.0) com teor de TAG trissaturado de 0%.

Análises de modificação proteica da CBS

A torta residual utilizada nas análises foi a resultante da extração com sc-CO₂ cujas condições de temperatura e pressão geraram o melhor rendimento global. Como os maiores rendimentos foram obtidos nas pressões de 25 MPa e 35 MPa e temperaturas de 40°C, 50°C e 60°C, a condição escolhida foi 25 MPa a 40 °C devido às suas vantagens operacionais, como a possibilidade de operar a uma pressão menor, o que resulta em menores custos de operação e manutenção, além do uso de uma temperatura mais branda, o que ajuda a evitar possíveis degradações térmicas e reduz o consumo de energia.

As análises de solubilidade, capacidade emulsificante, capacidade de formação de espuma e capacidade de formação de gel, que serão utilizadas para avaliar a modificação proteica da CBS com sc-CO₂, correspondem a outra etapa do projeto e ainda serão feitas.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram estatisticamente tratados com o software MINITAB® (Release 16.1.0, Minitab Inc.) por análise de variância (ANOVA), ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Rendimento global (X₀)

Os rendimentos globais da extração de lipídeos com sc-CO₂ da CBS estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimentos globais da extração de lipídeos da CBS com sc-CO₂.

Pressão (MPa)	Temperatura (°C)	Densidade do CO ₂ (kg/m ³)**	X ₀ *
15	40	780,23	8,57 ± 0,67 ^{Ab}
	50	699,75	4,68 ± 0,29 ^{Bb}
	60	604,09	3,62 ± 0,05 ^{Bb}
25	40	878,49	11,87 ± 0,19 ^{Aa}
	50	834,19	12,43 ± 0,19 ^{Aa}
	60	786,55	12,65 ± 0,36 ^{Aa}
35	40	934,71	12,53 ± 0,49 ^{Aa}
	50	899,23	12,44 ± 0,01 ^{Aa}
	60	862,94	12,29 ± 0,35 ^{Aa}

*Letras iguais na mesma coluna determinam que não há diferença significativa a 5% (p < 0,05) de significância pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas correspondem à variação de temperatura a pressão fixa e letras minúsculas à variação de pressão a temperatura fixa.

** Dados obtidos em <https://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/>

Fonte: Autor, 2024.

Em condições supercríticas, a alta densidade do solvente facilita a solubilização de compostos, enquanto sua baixa viscosidade permite a penetração em sólidos e reduz a resistência ao escoamento, melhorando a capacidade de extrair lipídeos dos materiais de origem (Dunford et al., 2003). Tal relação é vista na pressão de 15 MPa, na qual o aumento da temperatura e, por conseguinte, a queda da densidade do solvente, resultou em diminuição do X₀. Ademais, os resultados obtidos mostram que o aumento da densidade proporcionado pelo aumento da pressão de 15 MPa para 25 MPa ou 35 MPa também aumentou o rendimento da extração.

Essa tendência também foi observada por Viganó et al. (2016), que estudou a SFE do bagaço de maracujá a temperaturas de 40, 50 e 60 °C e pressões de 17, 26 e 35 MPa, onde o aumento da temperatura, a pressão constante levou à redução do X₀ e o aumento da pressão, em temperatura constante, resultou em um aumento do rendimento.

Mazzutti et al. (2012) explicam que o aumento da temperatura pode elevar a solubilidade dos compostos frente ao aumento da pressão de vapor do soluto e, simultaneamente, diminuir a solubilidade devido à redução da densidade do solvente. Esses efeitos contrários podem levar ao cruzamento das isotermas, fenômeno conhecido como retrogradação. Mazzutti et al. (2012) indicam que à medida que a pressão aumenta, um fluido supercrítico se torna menos compressível do que próximo ao seu ponto crítico,

sugerindo um efeito reduzido na densidade do solvente acima de 30 MPa assim como pelos estudos de Andrade et al. (2012) no qual em pressões superiores a 20 MPa, o cruzamento das isotermas pode ocorrer. Tal interação entre a densidade do solvente e a pressão de vapor do soluto pode explicar o porquê, nesse trabalho, as extrações a 25 MPa e a 35 MPa, em todas as temperaturas analisadas, obtiveram rendimentos semelhantes.

Perfil de ácidos graxos

Uma vez que os perfis de ácidos graxos e de triacilgliceróis independem da variação de temperatura e pressão durante a extração (Santos et al., 2016); Pinto et al., 2020) foi escolhida a condição de 35 MPa e 60 °C para a realização destas análises devido à maior disponibilidade de óleo extraído.

O perfil de ácidos graxos do óleo de CBS obtido por SFE a 35 MPa a 60 °C está apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos do óleo de CBS obtido por SFE a 35 MPa a 60 °C

Ácidos graxos	Extrato de CBS (% m/m)
Ácido palmítico (C16:0)	24,45
Ácido oleico (C18:1, n-9)	68,56
Outros	6,99

Fonte: Autor, 2024.

O óleo da CBS apresentou predominância de ácido graxo insaturado (AGI), com o 18:1n-9 (ácido oleico) atingindo mais de 68% do perfil de ácidos graxos, seguido pelo ácido graxo saturado (AGS) 16:0 (ácido palmítico). Os efeitos do ácido oleico no organismo incluem sua ação no hipotálamo, região responsável pela regulação da homeostase energética, que integra a ingestão de energia com o gasto energético para evitar a obesidade, por meio de sinais de saciedade (leptina) e (insulina) (Pinto et al, 2020).

O perfil de ácidos graxos dos extratos é semelhante ao da polpa do bacuri, estudada por Da Rocha et al. (2024), no qual maior parte dos ácidos graxos são o ácido palmítico e o ácido oleico, sendo 70% a 80% do total de ácidos graxos. O ácido palmítico, embora associado a riscos para a saúde cardiovascular, é um agente opacificante, emulsificante e emoliente é também utilizado como ingrediente em produtos de limpeza, bem como um surfactante em produtos de beleza e cosméticos para uma variedade de propriedades, incluindo ingrediente de fragrância (Da Rocha et al., 2024).

Com composição semelhante ao da CBS, o óleo de palma, com 39% de ácido oleico e 44% de ácido palmítico, se destaca por seu comportamento nas transições e na coexistência de fases sólidas e líquidas. Isso confere ao óleo uma consistência semi-sólida, permitindo flexibilidade na produção em uma ampla gama de produtos alimentícios (Rittner, 1996).

Kiriamiti et al. (2002) avaliaram a extração de óleo da semente de girassol, com teor de ácido oleico em torno de 80%, e explicam que o óleo refinado com elevado teor oleico é de particular interesse, tanto diretamente na indústria alimentícia quanto após sua transformação em produtos adequados para aplicações industriais, como bicarbonatos, bissulfato, solventes para biolubrificantes, fluidos de perfuração hidráulica, agentes dispersantes, cosméticos, entre outros (Kiriamiti et al., 2002).

Perfil de triacilgliceróis

O perfil de triacilgliceróis do óleo de CBS obtido por SFE a 35 MPa e 60 °C está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Perfil de triacilgliceróis do óleo de CBS obtido por SFE a 35 MPa a 60 °C

Triacilgliceróis*	Extrato de CBS (% m/m)
POP	17,90
OOP	48,82
OOO	33,29

* "O" corresponde ao ácido oleico e "P" ao ácido palmítico

Fonte: Autor, 2024.

A Tabela 3 exhibe a composição dos extratos em relação aos triacilgliceróis (TAG), que constituem a principal classe de compostos glicéridos nos extratos. POP, OOP e OOO são esperados, pois o ácido oleico (O) e palmítico (P) foram os ácidos graxos mais abundantes encontrados nos extratos. Essa abundância também foi indicada por Carvalho et al. (2024), que explica que a proporção de ácidos graxos individuais, a origem da

gordura e o histórico de processamento do produto, como uso na indústria alimentícia e cosmética, por exemplo, são fatores cruciais para determinar a quantidade de cada tipo de TAG.

CONCLUSÕES:

A SFE é uma técnica de grande potencial para extração lipídica da CBS. Em relação ao rendimento global, extrações a 25 MPa e a 35 MPa, em todas as temperaturas analisadas, obtiveram resultados estatisticamente semelhantes, sendo estas condições capazes de obter os melhores resultados. Portanto, visando alcançar o melhor rendimento em condições mais brandas com menor gasto operacional a SFE a 25 MPa e 40 °C seria a condição ideal. Quanto ao perfil de ácidos graxos, o óleo da CBS é predominantemente composto por ácido oleico, que representa mais de 68% do perfil de ácidos graxos, com possíveis benefícios na regulação da saciedade e controle de peso seguido pelo ácido palmítico com vantagens como propriedades emulsificantes e versatilidade em produtos alimentícios e cosméticos.

BIBLIOGRAFIA:

- Andrade, K. S. et al. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta*, v. 88, p. 544–552, 2012.
- Carvalho, L. M. S. et al. Supercritical fluid and pressurized liquid extraction of spent tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) almonds. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 209, p. 106238, 1 jul. 2024.
- Dos Santos, P. et al. Supercritical CO₂ extraction of cumbaru oil (*Dipteryx alata* Vogel) assisted by ultrasound: Global yield, kinetics and fatty acid composition. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 107, p. 75–83, 1 jan. 2016.
- Dunford, N. T.; Teel, J. A.; King, J. W. A continuous countercurrent supercritical fluid deacidification process for phytosterol ester fortification in rice bran oil. *Food research international* (Ottawa, Ont.), v. 36, n. 2, p. 175–181, 2003.
- Handojo, L.; Triharyogi, H.; Indarto, A. Cocoa bean shell waste as potential raw material for dietary fiber powder. *International journal of recycling of organic waste in agriculture*, v. 8, n. S1, p. 485–491, 2019.
- International Cocoa Organization. (2024). Production of cocoa beans. *ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*, L.
- Hong, S.-I.; Pyun, Y.-R. Inactivation kinetics of *Lactobacillus plantarum* by high pressure carbon dioxide. *Journal of food science*, v. 64, n. 4, p. 728–733, 1999.
- Kiriamiti, H. K. et al. Extraction rates of oil from high oleic sunflower seeds with supercritical carbon dioxide. *Genie des procedes [Chemical engineering and processing]*, v. 41, n. 8, p. 711–718, 2002
- Mazzutti, S. et al. Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: Antioxidant and antimicrobial activities. *The journal of supercritical fluids*, v. 70, p. 48–56, 2012.
- Machado, B. A. S. et al. Supercritical fluid extraction using CO₂: Main applications and future perspectives. *Separation science and technology*, v. 48, n. 18, p. 2741–2760, 2013.
- Mendes, F. A. T., & Lima, E. L. Perfil Agroindustrial do processamento de amêndoas de cacau em pequena escala no Estado do Pará. Belém, PA: SEBRAE, 2007.
- Monhemi, H.; Housaindokht, M. R. The molecular mechanism of protein denaturation in supercritical CO₂: The role of exposed lysine residues is explored. *The journal of supercritical fluids*, v. 147, p. 222–230, 2019.
- National Institute of standards and technology. Thermophysical Properties of Fluid Systems. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/>>.
- Okiyama, Dayane C. G.; Navarro, Sandra L. B.; Rodrigues, Christianne E. C. Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in food science & technology*, v. 63, p. 103–112, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224416302540>>.
- Perez, Maria; Lopez-Yerena, Anallely; Vallverdú-Queralt, Anna, Traceability, authenticity and sustainability of cocoa and chocolate products: a challenge for the chocolate industry, *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 62, n. 2, p. 475–489, 2022.
- Pinto, R. H. H. et al. Supercritical CO₂ extraction of uxi (*Endopleura uchi*) oil: Global yield isotherms, fatty acid profile, functional quality and thermal stability. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 165, p. 104932, nov. 2020.
- Rittner, H. Óleo de palma: processamento e utilização. São Paulo, 1ª ed., 1996. 320p.
- S. Rebolleda, N. Rubio, S. Beltrán, MT Sanz, ML González-Sanjosé. Extração de óleo de germen de milho com fluido supercrítico: estudo da influência dos parâmetros do processo no rendimento da extração e na qualidade do óleo. *J. Supercrit. Fluidos*, 72 (2012), pp. 270 - 277
- Sahena, F. et al. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *Journal of food engineering*, v. 95, n. 2, p. 240–253, 2009.
- Viganó, J. et al. Exploring the selectivity of supercritical CO₂ to obtain nonpolar fractions of passion fruit bagasse extracts. *The journal of supercritical fluids*, v. 110, p. 1–10, 2016.
- Xu, D. et al. Structural and conformational modification of whey proteins induced by supercritical carbon dioxide. *Innovative food science & emerging technologies: IFSET: the official scientific journal of the European Federation of Food Science and Technology*, v. 12, n. 1, p. 32–37, 2011.
- Younes, A.; LI, M.; KARBOUNE, S. Cocoa bean shells: a review into the chemical profile, the bioactivity and the biotransformation to enhance their potential applications in foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 63, n. 28, p. 9111–9135, 2023.
- Zhong, Q.; Jin, M. Enhanced functionalities of whey proteins treated with supercritical carbon dioxide. *Journal of dairy science*, v. 91, n. 2, p. 490–499, 2008.