



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MIRELLI BIANCHIN

**METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE DITERPENOS EM  
CAFÉ TORRADO EMPREGANDO MICRO-ONDAS E  
ULTRASSOM**

---

Londrina  
2017

MIRELLI BIANCHIN

**METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE DITERPENOS EM  
CAFÉ TORRADO EMPREGANDO MICRO-ONDAS E  
ULTRASSOM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina – Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta de Toledo Benassi.

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bianchin, Mirelli.

Metodologia para extração de diterpenos em café torrado empregando micro-ondas e ultrassom / Mirelli Bianchin. - Londrina, 2017.

100 f. : il.

Orientador: Marta de Toledo Benassi.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2017. Inclui bibliografia.

1. Caveol - Tese. 2. Cafestol - Tese. 3. Micro-ondas - Tese. 4. Ultrassom - Tese. I. Toledo Benassi, Marta de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

MIRELLI BIANCHIN

**METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE DITERPENOS EM CAFÉ  
TORRADO EMPREGANDO MICRO-ONDAS E ULTRASSOM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina – Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Marta de Toledo Benassi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Josiane Vignoli  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Rafael Eloy Dias  
Instituto Federal Catarinense - IFSC

Londrina, 26 de janeiro de 2017

*“Que nossos esforços desafiem as impossibilidades”  
(Charles Chaplin)*

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Solange e Antoninho, aos meus irmãos, Araceli e Angelo, e ao meu namorado, Hugo, por todo amor e apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus.

A Profa. Dra. Marta de Toledo Benassi, um exemplo de profissional e pessoa, agradeço por ter compartilhado tantos conhecimentos, pela confiança e por ter acreditado no meu trabalho. Agradeço não apenas pela excelente orientação, mas por ter contribuído para o meu crescimento profissional e humano.

À minha família, fonte da minha força de vontade e inspiração, em especial aos meus pais Solange e Antoninho, por terem fornecido condições para minha formação, pela dedicação, incentivo e, que em meio a tempos difíceis, sempre estiveram ao meu lado acreditando no meu potencial.

Ao meu companheiro, Hugo, pela paciência, compreensão, apoio e por inúmeras vezes ter enxergado o melhor de mim.

Aos professores, funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos que de alguma maneira contribuíram com este trabalho.

Ao Prof. Dr. Fabio Yamashita pelas sugestões na elaboração do trabalho, pelo ensinamento e pelo auxílio com o tratamento dos dados estatísticos.

A Profa. Dra. Josiane Vignoli e ao Prof. Dr. Rafael Eloy Dias pela avaliação e sugestões.

A Prof. Dra. Suzana Lucy Nixdorf e equipe do laboratório DIA, pelo auxílio com as análises e por ter disponibilizado o laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação e Automação Analítica. Em especial a Dra. Alessandra Maffei Monteiro, pela amizade, disponibilidade, ajuda e troca de conhecimento.

Ao Prof. Dr. César Ricardo Teixeira Tarley e seu aluno Fabio Antonio Cajamarca por ter disponibilizado o equipamento de micro-ondas e ensinado a operá-lo.

Aos meus colegas de laboratório pela ajuda e por terem tornado o laboratório um lugar mais agradável. Em especial Talita Kato, Natália Cenedesi, Marcela Guelfi, André Mori, Daneysa Kalschene e Lucas Bonfanti. Aos amigos que fiz em Londrina, em especial a Bruna Auriema e Talita Kato, pela amizade, ajuda, companheirismo, pelas experiências compartilhadas e boas conversas. Amizades que levarei para toda vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

BIANCHIN, Mirelli. **Metodologia para extração de diterpenos em café torrado empregando micro-ondas e ultrassom**. 2016. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

Caveol e cafestol, diterpenos da fração lipídica do café, são estudados pelos impactos de seu consumo a saúde e como possíveis discriminadores de espécies de café. Para a extração destes compostos, o processo de saponificação direta a quente com posterior extração líquido/líquido da fração insaponificável é reportado como mais eficiente. A metodologia usual apresenta, entretanto, diversas etapas de separação, exigindo maior tempo de análise, um analista treinado, e a utilização de volumes relativamente altos de solventes. Extração empregando sonicação e saponificação assistida em micro-ondas têm sido descritas para diferentes matrizes e compostos, destacando como técnicas versáteis, simples, rápidas e que permitem bom controle das condições operacionais. O objetivo do estudo foi propor uma metodologia de extração de caveol e cafestol em café torrado a partir do uso de micro-ondas, para o processo de saponificação direta à quente da fração lipídica, e de sonicação, para extração da matéria insaponificável. As etapas de saponificação e extração foram estudadas separadamente, e os resultados obtidos em cada processo foram comparados ao método convencional que utiliza saponificação em banho e extração líquido/líquido. O teor de caveol e cafestol foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Para a saponificação em micro-ondas, seguiu-se um planejamento fatorial  $3^2$ , variando-se a temperatura (70, 80 e 90 °C) e o tempo (4, 8 e 12 min) de reação. A temperatura e o tempo tiveram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre o teor de diterpenos, sendo recomendada para saponificação conjunta de caveol e cafestol a reação por 12 min à 80 °C. Para a etapa de extração da fração insaponificável por sonicação, o efeito da amplitude da onda ultrassônica (41, 102, 5 e 164  $\mu\text{m}$ ), do volume de solvente (2, 4 e 6 mL), e do tempo de processo (2, 4 e 6 min) foram estudados através de um planejamento composto central de face centrada ( $2^3$ ). Foi também avaliado o efeito da sonicação na estrutura da matriz: imagens de microscopia eletrônica de varredura, mostraram que a sonicação causou ruptura celular, provocando danos à abertura dos poros. A amplitude e o tempo exerceram efeito positivo ( $p < 0,05$ ) na extração, verificando-se comportamento diferenciado entre os diterpenos. Considerando-se o interesse na extração conjunta dos compostos por sonicação a melhor condição ocorreu em amplitude de 164  $\mu\text{m}$ , volume de 4 mL e tempo de 6 min. Comparativamente à saponificação em banho convencional, o uso de micro-ondas apresentou rendimentos inferiores de caveol (24%) e cafestol (35%), mas permitiu redução expressiva de tempo de reação (80%). Na etapa de sonicação, também houve menor rendimento da extração (13% para caveol e 3% para cafestol) comparado ao método de extração líquido/líquido, mas a sonicação permitiu a retirada de 2 etapas de lavagem com solvente, com conseqüente redução no tempo de extração e volume de solvente utilizado. De forma geral, as técnicas apresentaram bons rendimentos de extração e mostram-se promissoras para uso para isolamento dos diterpenos numa escala ampliada.

**Palavras-chaves:** Caveol. Cafestol. *Coffea arábica*. Saponificação. Sonicação e Cromatografia líquida.

BIANCHIN, Mirelli. **Methodology for diterpenes extraction of roasted coffee using microwave and ultrasound**. Dissertation (Masters In Food Science) - State University of Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

Kahweol and cafestol, diterpenes of the coffee oil, are studied due to their impacts on human health and in order to discriminate coffee species. The most efficient method for the extraction of these compounds is to apply a direct hot saponification procedure (DHS) followed by a liquid/liquid extraction of the unsaponifiable fraction. However, the conventional method involves several stages of separation, which requires long analysis time, a trained analyst, and the use of relatively high volumes of solvents. The techniques of ultrasound assisted extraction and saponification using microwave have been largely used to different matrices and compounds. Therefore, they have been describing as versatile, simple and fast procedures, which also allow a good control of operating conditions. The aim of this study was to propose a methodology to extraction of kahweol and cafestol from roasted coffee applying microwave for the DHS step and sonication procedure for the extraction of the unsaponifiable fraction. The saponification and extraction steps were studied separately. Each result were compared to the obtained by the conventional method, which uses saponification in bath and liquid/liquid extraction. The contents of kahweol and cafestol were determined by high performance liquid chromatography. A  $3^2$  factorial design was used to study the microwave saponification step in order to evaluate the effect of temperature (70, 80 and 90 °C) and reaction time (4, 8 and 12 min). Temperature and reaction time had a significant effect ( $p < 0.05$ ) on the diterpenes contents. The use of 80 °C during 12 min is the condition recommended for simultaneous extraction of the diterpenes. A  $2^3$  face-centered central composite design was applied for the study of the extraction of the unsaponifiable fraction using ultrasound; the effect of the amplitude of the ultrasonic wave (41, 102, 5 and 164  $\mu\text{m}$ ), the solvent volume (2, 4 and 6 mL) and process time (2, 4 and 6 min) were studied. The effect of the ultrasonic wave application in the matrix structure was also evaluated: scanning electron microscopy images showed that the ultrasound caused cellular rupture, which leads to the damages to the pores. The parameters of amplitude and time had a positive effect ( $p < 0.05$ ) in the extraction procedure, but the behavior was differentiated among the two diterpenes. Considering the interest in the simultaneous extraction of the compounds by ultrasound, the best condition was obtained at the amplitude of 164  $\mu\text{m}$ , volume of 4 mL and time of 6 min. The use of microwave lead to lower yields of kahweol (24%) and cafestol (35%) compared to conventional bath saponification, however a significant reduction of reaction time (80%) was achieved. A lower extraction yield (13% for kahweol and 3% for cafestol) was also obtained using the sonication procedure compared to the liquid/liquid extraction method. On the other hand, the sonication allowed the removal of two solvents washing steps, with a consequent reduction in the extraction time and in the volume of solvent. In a general way, the techniques presented good reaction/extraction yields and they are promising for isolation of diterpenes on an extended scale.

**Keywords:** Kahweol. Cafestol. *Coffea arabica*. Saponification. Ultrasound and liquid chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

<b>Figura 1</b> - Fórmulas estruturais, espectros de UV e cromatograma para do caveol e cafestol.....	22
<b>Figura 2</b> - Reação de saponificação de diterpenos.....	26
<b>Figura 3</b> - Metodologia para extração de diterpenos proposta por Dias et al. (2010).....	27
<b>Figura 4</b> - Espectro eletromagnético.....	30
<b>Figura 5</b> - Mecanismo de aquecimento por polarização dipolar.....	31
<b>Figura 6</b> - Mecanismo de aquecimento por condução iônica.....	31
<b>Figura 7</b> - Esquema de transferência de calor nos sistemas de aquecimento convencional e aquecimento por micro-ondas.....	33
<b>Figura 8</b> - Propagação da onda ultrassônica em meio líquido: formação e colapso da bolha de cavitação.....	39
<b>Figura 9</b> - Sistema de extração assistida por ultrassom utilizando probe como fonte de propagação.....	41

### **CAPÍTULO 2 - SAPONIFICAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS NA EXTRAÇÃO DE DITERPENOS EM CAFÉ ARÁBICA TORRADO**

---

<b>Figura 1</b> - Cromatogramas dos diterpenos, caveol e cafestol, em café arábica torrado obtidos após a saponificação em micro-ondas (80°C/12 min) (A) e em banho (80°C/60 min) (B). Detecção: 230 nm. Picos: caveol (1) e cafestol (2).....	65
<b>Figura 2</b> - Superfícies de resposta para teores de caveol (A) e cafestol (B) obtidos por saponificação em micro-ondas sob diferentes condições de temperatura e tempo.....	67
<b>Figura 3</b> - Desejabilidade para caveol e cafestol obtidos por saponificação em micro-ondas e determinados por CLAE.....	69
<b>Figura 4</b> - Perfil da concentração de caveol e cafestol obtidos por saponificação em micro-ondas (A) e em banho térmico (B) à 80°C em função do tempo de reação.....	70

### CAPÍTULO 3 - EXTRAÇÃO DE DITERPENOS EM CAFÉ ARÁBICA TORRADO POR SONICAÇÃO

---

<b>Figura 1</b> - Procedimento para extração de caveol e cafestol utilizando sonificador.....	82
<b>Figura 2</b> - Microscopia eletrônica de varredura em amostras de café torrado após extração por sonicação (102,5 $\mu\text{m}$ , 4 min, 4mL) (A, imagem ampliada em B) e por extração líquido/líquido (C).....	87
<b>Figura 3</b> - Interação entre tempo e amplitude, com volume em ponto central (4 mL, sobre o teor de caveol extraído por sonicação e quantificação por CLAE .....	89
<b>Figura 4</b> - Efeito da interação (A) amplitude e volume com tempo em nível superior (6 min) e (B) volume com tempo com amplitude em tempo superior (164 $\mu\text{m}$ ), na extração de cafestol por sonicação e quantificação por CLAE .....	90
<b>Figura 5</b> - Desejabilidade de caveol e cafestol extraídos por sonicação e determinados por CLAE .....	92
<b>Figura 6</b> - Cromatogramas correspondentes à extração por ultrassom na condição otimizada (164 $\mu\text{m}$ , 6 min, 4 mL) (A) e extração líquido/líquido pelo método de Dias et al. (2010) (B). Detecção: 230 n. Picos: caveol (1) e cafestol (2).....	92

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

<b>Tabela 1</b> - Teor de cafeol e cafestol (mg 100g <sup>-1</sup> ) em café arábica e canéfora torrados. ....	23
<b>Tabela 2</b> - Aplicação de ultrassom na extração (EAU) em diferentes matrizes. ....	43

### **CAPÍTULO 2 - SAPONIFICAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS NA EXTRAÇÃO DE DITERPENOS EM CAFÉ ARÁBICA TORRADO**

---

<b>Tabela 1</b> - Teores de cafeol e cafestol café arábica torrado obtidos por CLAE após saponificação em micro-ondas conforme delineamento fatorial completo 3 <sup>2</sup> .....	64
<b>Tabela 2</b> - Efeitos das variáveis temperatura (X <sub>1</sub> ) e tempo (X <sub>2</sub> ) na saponificação por micro-ondas para obtenção de cafeol e cafestol em café arábica torrado .....	65
<b>Tabela 3S</b> - Análise de variância da saponificação assistida por micro-ondas para cafeol. ....	76
<b>Tabela 4S</b> - Análise de variância da saponificação assistida por micro-ondas para cafestol. ....	76

### **CAPÍTULO 3 - EXTRAÇÃO DE DITERPENOS EM CAFÉ ARÁBICA TORRADO POR SONICAÇÃO**

---

<b>Tabela 1</b> - Teores de cafeol e cafestol (mg 100 g <sup>-1</sup> ) obtidos pelo planejamento composto central de face centrada (2 <sup>3</sup> ) utilizando sonicação como processo de extração e CLAE para identificação e quantificação.....	85
<b>Tabela 2</b> - Efeitos das variáveis amplitude da onda ultrassônica (X <sub>1</sub> ), tempo de extração (X <sub>2</sub> ) e volume de solvente (X <sub>3</sub> ) na extração de cafeol e cafestol por sonicação .....	85
<b>Tabela 3S</b> - Análise de variância da extração por sonicação na obtenção de cafeol. ....	99
<b>Tabela 4S</b> - Análise de variância da extração por sonicação na obtenção de cafestol. ....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
AOAC	Association of Analytical Communities
b.l	Base lipídica
b.s	Base seca
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EAU	Extração assistida por ultrassom
Eq.	Equivalente
MI	Matéria insaponificável
SDQ	Saponificação direta a quente

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	20
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>21</b>
3.1 DITERPENOS DO CAFÉ	21
3.2 METODOLOGIAS PARA EXTRAÇÃO DE DITERPERNOS	25
3.3 USO DE ENERGIA MICROONDAS	29
3.3.1 Princípios teóricos	29
3.3.2 Aplicações das micro-ondas	34
3.4 EXTRAÇÃO POR ULTRASSOM	36
3.4.1 Princípios Teóricos	37
3.4.2 Ultrassom em Processos de Extração	41
<b>REFERENCIAS</b>	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO 2 - SAPONIFICAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS NA EXTRAÇÃO DE DITERPENOS EM CAFÉ ARÁBICA TORRADO</b>	<b>57</b>
<b>RESUMO</b>	<b>58</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>58</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>60</b>
2.1 REAGENTES E PADRÕES	61
2.2 MATERIAL	61
2.3 MÉTODOS	61

2.3.1	Reação de saponificação assistida por micro-ondas .....	61
2.3.2	Extração dos diterpenos e análise cromatográfica .....	62
2.4	Delineamento experimental e análise dos resultados.....	63
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>72</b>
	<b>MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>76</b>
	<b>CAPÍTULO 3 -EFEITOS DA SONICAÇÃO NA EXTRAÇÃO DE DITERPENOS EM CAFÉ ARÁBICA TORRADO.....</b>	<b>77</b>
	<b>RESUMO.....</b>	<b>78</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>80</b>
2.1	REAGENTES E PADRÕES.....	80
2.2	MATERIAL.....	81
2.3	PROCEDIMENTOS PARA EXTRAÇÃO.....	81
2.3.1	Extração de caveol e cafestol por sonicação.....	81
2.3.2	Extração de caveol e cafestol pelo método convencional (líquido/líquido) .....	82
2.4.	QUANTIFICAÇÃO DOS DITERPENOS .....	82
2.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	83
2.6	ANÁLISE DA ESTRUTURA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	84
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>84</b>

<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>94</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>	<b>99</b>
<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>100</b>

# **CAPÍTULO 1**

---

**Introdução, objetivos e revisão bibliográfica**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Pertencente ao gênero *Coffea* da família Rubiaceae, o café é um dos grãos mais antigos consumidos pelo homem, manuscritos datam sua cultura em 575 d.c no lêmén (MARTINS, 2008). Existem cerca de 100 espécies de café, 25 delas são mundialmente cultivadas, mas somente *Coffea arabica* e *Coffea canephora* são produzidas e comercializados em grande escala. No Brasil, a espécie arábica representou, em 2016, em torno de 80% da produção total (CONAB, 2016).

Segundo dados divulgados pela Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC), cerca de 80% dos brasileiros com idade superior a 40 anos bebem café diariamente, mesmo entre jovens (16 a 20 anos), faixa em que o consumo é menor, a proporção dos que consomem diariamente é de 49% (ABIC, 2016). Em 2015, o Brasil beneficiou 43,2 milhões de sacas de 60 kg de café, o mercado interno consumiu 20,5 milhões de sacas, cerca de 4,9 kg de café torrado habitante/ano. Em torno de 36,9 milhões de sacas de café foram exportadas em 2015, correspondendo a 7,0% dos embarques do agronegócio, e fazendo com que o Brasil atingisse um novo recorde em exportação (CECAFE, 2016a; CONAB, 2016). Segundo dados da Organização Internacional do Café (ICO) (2016), o Brasil continua sendo o maior produtor mundial de café, com safra estimada de 49,6 milhões de sacas em 2016, e o segundo maior consumidor, atrás apenas dos Estados Unidos, em números absolutos (CECAFE, 2016b; CONAB, 2016).

Os grãos de café torrados são constituídos, em média de aproximadamente 59% de carboidratos, 13% de proteína, 13% de lipídios, 4% de cinzas, e de outros compostos em menor quantidade, como, ácidos não voláteis (7%), água (2%) trigonelina (1%) e cafeína (1%), porém estes valores podem variar com as espécies e variedades do grão (GEORGE, RAMALAKSHMI, RAO, 2008; FARAH, 2012).

Dos constituintes da matéria insaponificável do grão de café, os diterpenos, o caveol e cafestol são os compostos majoritários. O interesse por estes compostos é reportado em diversos estudos, que investigam desde a contribuição à saúde dos consumidores até a aplicação como parâmetros de qualidade (ROOS et al., 1997; CAVIN et al., 2002; RUBAYIZA, MEUREN, 2005; HIGDON, FREI, 2006; CAMPANHA, DIAS, BENASSI, 2010; MURIEL, ARAUZ, 2010; BUTT, SULTAN, 2011; KITZBERGER et al., 2013a). Em relação aos efeitos na saúde, alguns estudos

demonstram que o alto consumo de café não filtrado está associado ao aumento do colesterol sérico, atribuído principalmente à ingestão de cafestol (URGERT et al., 1995; CROZIER et al., 2014). Com mais destaque, o caveol e cafestol têm sido associados a efeitos positivos à saúde, como na prevenção de carcinomas e de danos ao DNA, também são reconhecidos pelas suas propriedades antioxidante e quimio-preventivas (CROZIER et al., 2014; GAASCHT, DICATO, DIEDERICH, 2015).

O caveol e o cafestol são encontrados na forma esterificada com diferentes ácidos graxos ou, em menor proporção, na forma livre (SPEER; KÖLLINGSPEER, 2006). Assim, para a determinação destes compostos, podem ser aplicadas etapas de saponificação e separação.

Dias et al. (2010) propuseram um método analítico para quantificação de diterpenos que envolve a saponificação à quente do café em banho, seguida da separação dos compostos por consecutivas lavagens com solvente orgânico. Embora o método seja eficiente, verifica-se, devido à complexidade da matriz, a necessidade de um longo preparo da amostra, antes da identificação e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Além disso, por envolver extração líquido/líquido, volumes relativamente grandes de solvente orgânico são utilizados e são requeridas várias etapas para extração final, exigindo treinamento dos analistas envolvidos e maior tempo de análise. Esses fatores representam uma limitação quando se considera o interesse pela extração dos diterpenos em maior escala.

Considerando a dificuldade de síntese desses compostos e a restrita disponibilidade de compra, a extração de diterpenos a partir de café torrado é uma opção atraente (GUERCIA et al., 2016), principalmente quando se há o interesse na extração, para posterior separação e isolamento, para o uso como padrões analíticos. Belandria et al. (2016) ressaltam que a extração de compostos com alto valor agregado, como caveol e cafestol, são uma alternativa inovadora para a indústria de café.

Recentemente, observou-se uma tendência à utilização de métodos analíticos “mais verdes”. A redução de resíduos e solventes, do tempo de exposição do analista à periculosidade e toxicidade, a maior seletividade e praticidade devido a automação, são algumas das vantagens da aplicação de tecnologias limpas emergentes (ARMENTA, GARRIGUES, LA GUARDIA 2008; GALUSZKA, MIGASZEWSK, NAMIESNIK, 2013; FUMES et al., 2015).

Processos de aquecimento por micro-ondas e extração por sonicação, são utilizados como alternativas para a extração de compostos da fração lipídica (ARAUJO, SANDI, 2006; AZEVEDO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014; ROCHA et al., 2014; TSUKUI et al., 2014; ORTIZ, BENINCÁ, ZANOELO, 2015). O uso de micro-ondas destaca-se em relação a outros métodos de aquecimento, por permitir, com maior precisão, o controle das condições do procedimento, evitando possíveis degradações térmicas e oxidação, além de garantir reprodutibilidade do processo (TSUKUI, OIGMAN, REZENDE, 2014). Quanto a extração por sonicação, segundo Cravotto et al. (2008), esta é uma técnica reconhecida por diminuir o tempo, aumentar o rendimento e muitas vezes a qualidade da extração.

Não há, porém, relatos da utilização das técnicas de micro-ondas e ultrassom na extração específica de caveol e cafestol em café torrado. Somente no trabalho de Oigman et al. (2012) verificou-se o uso de micro-ondas na extração de diterpenos em grãos verdes através de reação de metanólise. Tsukui et al. (2014) também utilizaram do aquecimento por micro-ondas em grão verde, mas para realizar a extração prévia dos lipídios, seguida da metanólise.

Assim, considerando-se a importância do caveol e cafestol e o interesse pela extração em maior escala para posterior isolamento desses compostos, é interessante o desenvolvimento de metodologias que empreguem tecnologias limpas, como micro-ondas e sonicação, na extração dos diterpenos.

O capítulo 1 contém a introdução geral do trabalho, os objetivos e a revisão bibliográfica, na qual é abordada a importância dos diterpenos em café, com ênfase em *Coffea arabica*, destacando as técnicas de extração para caveol e cafestol e os princípios teóricos e aplicações do aquecimento por micro-ondas e da extração por sonicação.

O capítulo 2 descreve o desenvolvimento do método de saponificação assistida por micro-ondas na extração de caveol e cafestol em café arábica torrado.

O capítulo 3 aborda a extração de caveol e cafestol através da técnica de sonicação, como substituto ao método de extração líquido/líquido.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Propor uma metodologia de extração dos diterpenos, caveol e cafestol, em café torrado, empregando saponificação por micro-ondas e extração por sonicação.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Adaptar uma metodologia de extração de diterpenos, já validada e eficiente, substituindo as etapas de saponificação a quente em banho e separação líquido/líquido, por saponificação direta à quente, assistida por micro-ondas e extração da fração insaponificável com sonicação;
- Avaliar separadamente cada processo, através da aplicação de planejamento experimental;
- Verificar o efeito do uso de sonicação na estrutura da matriz de café torrado por microscopia eletrônica de varredura;
- Determinar as melhores condições de saponificação e separação em relação ao teor de caveol e cafestol extraído, comparando o rendimento com o obtido pelo método de referência analítico.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 DITERPENOS DO CAFÉ

Os terpenos compreendem uma das classes mais importantes de metabólitos secundários nas plantas. Desempenham papéis na defesa direta e indireta da planta, agindo contra herbívoros e patógenos, e na reprodução pela atração de polinizadores e disseminadores de sementes, entre as principais ações (PERES, 2004; NAGEGOWDA, 2010).

A classificação ocorre de acordo com número de unidades de isopreno e o número de carbonos que contém na estrutura ( $C_x$ - Y u.i)<sup>1</sup> podendo ser hemiterpeno ( $C_5$ -1 u.i), monoterpeno ( $C_{10}$ -2 u.i), sesquiterpeno ( $C_{15}$ -3 u.i), diterpenos ( $C_{20}$ -4 u.i), triterpeno ( $C_{30}$ -6 u.i), tetraterpeno ( $C_{40}$ -8 u.i) e politerpeno ( $C_5$ - n u.i) com  $n > 8$  (HAAGEN-SMIT, 1953; BREITMAIER, 2006).

Dos terpenos presentes no café, o cafestol e caveol (Figura 1), são os compostos de maior representatividade.

Kurzrock e Speer (2001) relatam que Anderson, em 1932, e Slotta e Neisser, em 1938, foram os primeiros a investigar o caveol e cafestol. Kaufmann e Gupta Sem, em 1963, conseguiram isolar a molécula de caveol, entretanto a estrutura química e a configuração foi apresentada somente em 1982 por Lam et al.

Os diterpenos são classificados como álcoois de diterpeno pentacíclico que, na fusão de unidades de isopreno, formam um esqueleto caurano composto por 20 carbonos (DJERASSI, CAIS, MITSCHER, 1959; SPEER, KOLLING-SPEER, 2006) (Figura1). No grão de café, encontram-se na forma livre ou esterificada com diferentes ácidos graxos, sendo a segunda presente em maior proporção (SPEER; KOLLING-SPEER, 2006). Kolling-Speer, Strohschneider e Speer (1999) relataram teor de cafestol e caveol livres em grãos verdes de café arábica variando de 4 a 9 mg 100 g<sup>-1</sup> e 4,5 a 19 mg 100g<sup>-1</sup>, respectivamente. Para grãos verdes de café canefora o valor médio de cafestol livre foi de 12,4 mg 100g<sup>-1</sup>. Van Rooij et al. (1995) reportaram teores de ésteres de caveol e cafestol na faixa de 6800 a 8500 mg 100 g<sup>-1</sup> em grãos verdes de *C. arabica* e de 100 a 290 mg 100 g<sup>-1</sup> em *C. canephora*, sendo os teores de diterpenos livres significativamente mais baixos.

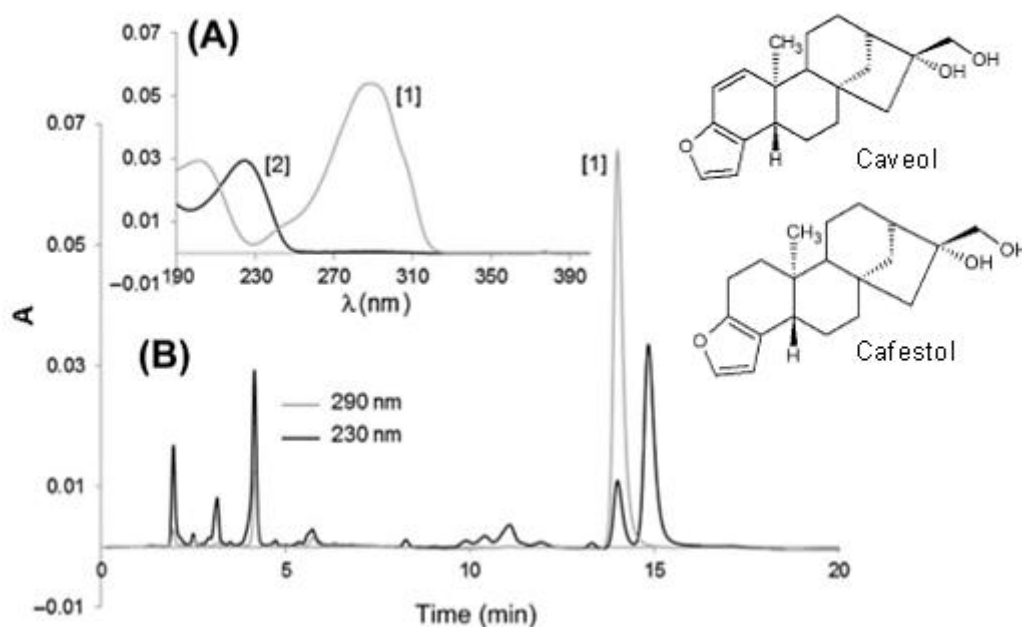
---

<sup>1</sup> ( $C_x$ - Y u.i)<sup>1</sup> refere-se:  $C_x$  ao número de carbonos e Y u.i às unidades de isopreno.

A diferença estrutural entre caveol e cafestol é devida a uma dupla ligação entre os carbonos C1 e C2. Assim, os compostos apresentam espectros com pico de absorção máxima em comprimentos de ondas diferentes: 290 nm para o caveol e 230 nm para o cafestol (Figura 1A).

O caveol na forma purificada é mais suscetível a alterações físico-químicas, quando submetido a condições de estresse, como aquecimento, luz e à presença de oxigênio e ácidos (KURZROCK; SPEER, 2001).

**Figura 1-** Fórmulas estruturais, espectros de UV e cromatograma de café torrado destacando caveol e cafestol.



(A) Espectros de caveol [1] e cafestol [2] (190-400 nm) - (B) Cromatograma típico de separação de diterpenos em café arábica com grau claro de torra.

**Fonte:** Benassi e Dias, 2015.

O teor de lipídios em café torrado varia de 8,6 a 20% (LAGO, 2001; PACETTI, LUCCI, FREGA, 2015). A matéria insaponificável (MI) deste grão, é relativamente alta (9,0% a 13,4%) se comparada à demais óleos vegetais (abaixo de 1%) (LAGO, 2001). Os diterpenos correspondem a aproximadamente 20% do total de lipídios no grão, porém como a maioria está na forma esterificada com diferentes ácidos graxos, estes compostos são considerados os componentes majoritários da MI de café torrado (PACETTI, LUCCI, FREGA, 2015).

O teor de caveol e cafestol reportado na literatura é bastante variável. Mesmo dentro da mesma espécie de café variações consideráveis podem ser

observadas (Tabela 1). Cita-se a presença de cafeol em *C. arabica* e *C. canephora*, e de teores muito baixos até a ausência de cafeol em café canéfora (ROOS et al., 1997; SPEER, KOLLING-SPEER, 2006; CAMPANHA, DIAS, BENASSI, 2010; DIAS et al., 2010; GIRIDHAR, SRIVEDI, RAVISHANKAR, 2010; SOUZA, BENASSI, 2012; BENASSI, DIAS, 2015; MORI et al., 2016).

**Tabela 1-** Teor de cafeol e cafeol (mg 100g<sup>-1</sup>) em café arábica e canéfora torrados.

	<b>Cafeol</b>	<b>Cafeol</b>	<b>Referência</b>
<b>Café arábica</b>	736	573	Urgert et al. (1995)
	328	397	Araújo e Sandi (2006)
	661 - 923	360- 478	Campanha, Dias e Benassi (2010)
	370	820	Souza e Benassi (2012)
	439-1068	339-742	Kitzberger et al. (2013b) e Kitzberger, Scholz, Benassi (2014)
	175 - 1068	176 - 966	Zanin (2014)
<b>Café canéfora</b>	5 - 8	239 - 250	Roos et al. (1997)
	N.I	163 - 275	Campanha, Dias e Benassi (2010)
	N.I	210	Souza e Benassi (2012)
	0-14	359-151	Mori et al. (2016)

NI- Não identificado \*Valor zero corresponde a valores abaixo do limite de quantificação de 3,2 mg 100g<sup>-1</sup>

Em sua revisão, Benassi e Dias (2015) relataram que a faixa de concentração de diterpenos em café torrado citada pela literatura é bastante ampla. De forma geral, são observados teores mais elevados de cafeol em *C. arabica* (187 a 668 mg 100 g<sup>-1</sup>) em relação ao café canéfora (76 a 363 mg 100 g<sup>-1</sup>). Existe grande variação nos teores de cafeol reportados para café arábica torrado (132 a 1096 mg 100 g<sup>-1</sup>); em café canéfora é reportada a presença de baixas concentrações de cafeol (inferiores a 15 mg 100 g<sup>-1</sup>) ou a ausência do composto.

Quanto à termo-estabilidade dos compostos, alguns autores observaram manutenção dos teores de diterpenos em cafés torrados (URGERT et al., 1995; CAMPANHA, DIAS, BENASSI, 2010) mas há relatos que o cafeol e cafeol podem sofrer desidratação durante o processo de torra, gerando dehidroderivados,

ou formando produtos como o caveal e cafestal (isômeros de função) e ainda isocaveol, um isômero de posição (SPEER, KOLLING-SPEER, 2006).

A fim de verificar a influência da torra no teor de diterpenos, Dias et al. (2014) submeteram cafés arábica e canéfora ao processo de torra à 230 °C em diferentes tempos (2, 4, 6, 8 e 10 min). Inicialmente, houve a tendência de estabilidade e aumento no teor dos dois diterpenos (expresso em mg 100 g<sup>-1</sup> em base seca), e o comportamento foi atribuído ao aumento relativo na concentração de lipídios durante o processo de torra, que ocorre pela degradação de outros componentes da matriz mais termolábeis. Após 8 min de processo, observou-se a formação de produtos de degradação dehidroderivados (dehidrocaveol e dehidrocafestol). Segundo os autores, apesar de ter sido constatado que os diterpenos podem sofrer degradação com a torra, o fato dos teores de caveol e cafestol variarem pouco com o processo, demonstra a viabilidade do uso desses compostos na diferenciação das espécies em produtos de café torrado.

Apesar do estudo de diterpenos ser citado desde 1930, recentemente houve um aumento no interesse em analisar esses compostos considerando-se tanto os efeitos a saúde como na área de controle de qualidade de produtos de café.

O caveol e cafestol, por estarem presentes em concentrações diferentes em *C. arabica* e *C. canephora*, e por não serem muito afetados pela intensidade de torra podem ser empregados como possíveis identificadores de espécies em café torrado e moído (CAMPANHA; DIAS; BENASSI, 2010; SOUZA, BENASSI, 2012, MORI et al., 2016).

Até a última década, havia ênfase em estudos que citavam os diterpenos pelos efeitos negativos à saúde dos consumidores devido à ação hipercolesterolêmica (elevação do colesterol total e LDL), atribuída notadamente ao cafestol (ROOS et al., 1997, HIGDON; FREI, 2006). Mais recentemente os efeitos positivos à saúde têm sido estudados e destacados. Crozier et al. (2014), em revisão, citam os benefícios do consumo de café, como o fato da ingestão regular estar associada ao menor risco de desenvolvimento da diabetes mellitus tipo 2, câncer endometrial, hepatocelular e doença de Parkinson. Butt e Sultan (2011) relatam que cafestol e o caveol são eficazes na redução do estresse oxidativo e atuam auxiliando na proteção do DNA celular. Estes compostos possuem ainda capacidade quimioprotetora e anticarcinogênica devido a habilidade de capturar radicais livres (CAVIN et al., 2002; HIGDON, FREI, 2006; GEORGE, RAMALAKSHMI, RAO, 2008;

GENKINGER, GEBARA, 2015). Gaascht, Dicato e Diederich (2015) citam que cafestol e caveol atuam como inibidores de citocromo P450, uma enzima responsável pela ativação de agentes cancerígenos e os danos do DNA.

### 3.2 METODOLOGIAS PARA EXTRAÇÃO DE DITERPERNOS

Para extração da fração lipídica de matrizes de origem animal ou vegetal é desejável o uso de técnicas quantitativas, se possível não destrutivas, rápidas e com baixo consumo de solvente. É importante evitar a transferência de constituintes solúveis de um material para o solvente com o qual a matriz está em contato; evitar o uso de condições muito agressivas de processo, como altas temperaturas e variações da mesma, para garantir que o lipídio não sofra reações químicas e conseqüentemente modificações estruturais, principalmente quando, após extração, pretende-se avaliar componentes lipídicos específicos (BRUM, ARRUDA, BISMARA, 2009; MEDINA, 2013).

A literatura oferece diversas abordagens quanto aos métodos para a extração de lipídios, os mais documentados são o de Soxhlet (1879), de Folch, Lees, Stanley (1957) e Bligh & Dyer (1959).

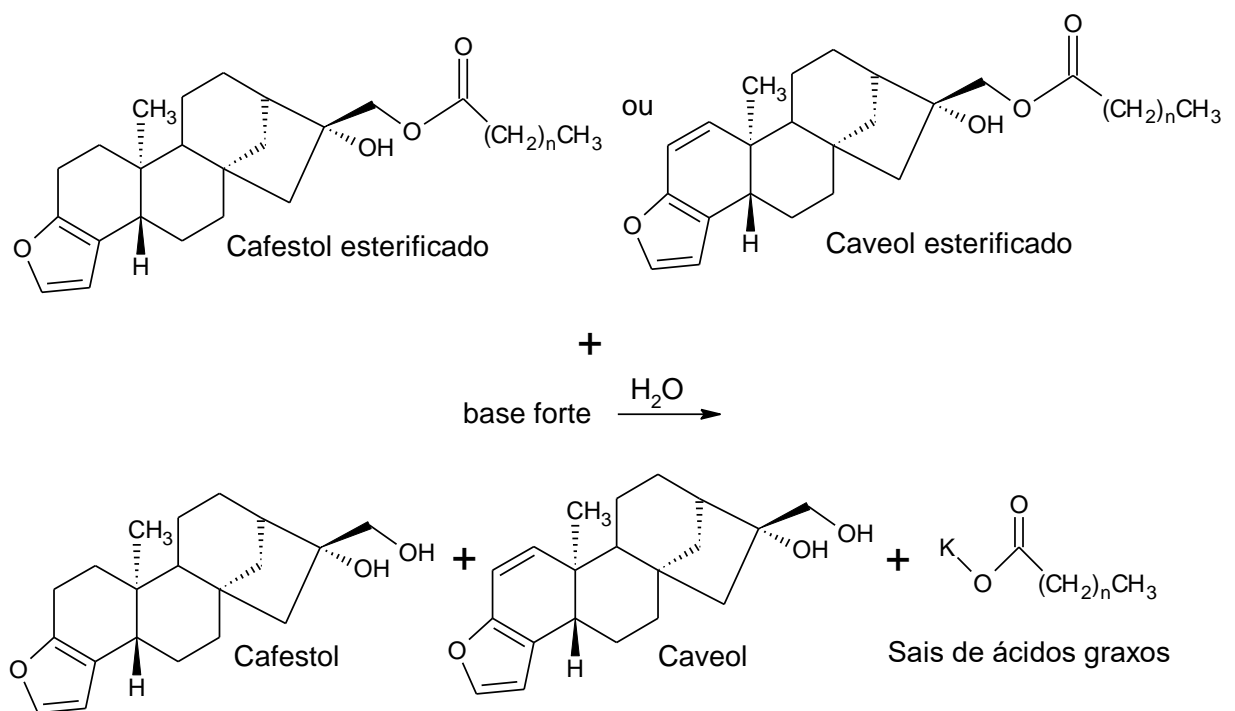
O método de Soxhlet é o mais clássico para extração de lipídios, sendo recomendado pela Association of Analytical Communities (AOAC). Embora seja uma metodologia versátil, simples e robusta, possui limitações importantes como o longo tempo de extração (varia de 6 a 24 h), o grande volume de solvente utilizado e principalmente, o fato do material orgânico extraído ficar no solvente, que sofre constante ebulição, favorecendo reações de oxidação e hidrólise (BRUM, ARRUDA, BISMARA, 2009; SCHLECHTRIEM, FLIEDNER, SCHÄFFERS, 2009).

Outro método amplamente empregado, por ser versátil e econômico é o descrito por Bligh & Dyer (1959) como uma adaptação de Folch, Lees, Stanley (1957). O método consiste na extração a frio da fração lipídica através da mistura de clorofórmio-metanol: água. Em relação ao Soxhlet, o método de Bligh & Dyer apresenta muitos aspectos positivos, como não necessitar de equipamentos de laboratório específicos, reduzido volume de solventes utilizados, não envolver aquecimento, evitando degradação de compostos termicamente instáveis e menor tempo de análise (MANIRAKIZA, COVACI, SCHEPENS 2001; SHAHIDI, WANASUNDARA, 2002; SCHLECHTRIEM et al., 2009).

Segundo Benassi e Dias (2015), para extração de caveol e cafestol, existem duas diferentes abordagens. Na primeira realiza-se a extração prévia dos lipídios, através de métodos como Soxhlet ou Bligh & Dyer, seguida de saponificação e separação. Na segunda, emprega-se saponificação direta da fração lipídica, com posterior separação da fração insaponificável.

A reação de saponificação dos diterpenos está apresentada na Figura 2.

**Figura 2-** Reação de saponificação de diterpenos.



**Fonte:** Adaptado de Tsukui, Oigman, Rezende (2014).

O uso de saponificação direta a quente (SDQ) foi preconizado por Urgert et al. (1995) que realizaram a extração dos lipídios de grãos torrados de café com solução etanólica de NaOH à 80°C durante uma hora, com posterior extração da matéria insaponificável com diisopropil éter e limpeza com água.

Dias et al. (2013) estudaram a eficiência de diferentes métodos na extração de diterpenos em café torrado. A utilização da extração, por Soxhlet ou Bligh & Dyer, seguida de saponificação à quente, implicou em grandes perdas de diterpenos. O processo de saponificação direta a quente com posterior extração da fração insaponificável foi reportado como mais eficiente na extração de caveol e cafestol. O extrato obtido por SDQ apresentou teores de caveol e cafestol 15%



Mesmo considerando o extenso uso e a aplicabilidade do método de Dias et al. (2010) para diferentes matrizes, observa-se algumas limitações para utilização da metodologia na extração de diterpenos em maior escala. O aquecimento em banho proposto no método é eficiente na reação de saponificação dos diterpenos, uma vez que a proporção de amostra: volume utilizada é pequena. Ampliando-se a escala, o aquecimento convencional poderia não ser tão adequado, tendo em vista que a transferência de calor depende das correntes de condução e convecção; caso o equilíbrio térmico demore para ser atingido haveria maior dificuldade no controle de reações químicas (THOSTENSON, CHOU, 1999; HAYES, 2002; SANSEVERINO, 2002; KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009). Também considerando uma ampliação de escala, com o volume relativamente alto de solvente utilizado, haveria maior exposição do analista a toxicidade e geraria resíduos químicos, resultando num impacto ambiental e humano. Deve-se considerar ainda, que para realizar a extração pelo método proposto, há a necessidade de profissionais treinados, pelo grande número de etapas que devem ser adequadamente padronizadas, o que reflete também em tempo maior para realizá-las. Desta forma, ensaios de rotina ficariam limitados.

Recentemente, tem-se observado um forte movimento em direção à utilização de métodos analíticos “mais verdes”, o qual tem estimulado o desenvolvimento de novas técnicas de extração de lipídios em alternativa aos métodos convencionais. Além disto, a utilização de processos de extração que reduzam o consumo de energia, permitam a utilização de solventes alternativos, ou diminuam e/ou eliminem o uso de solventes orgânicos, são algumas das propostas da química verde. Esses novos modelos de extração têm demonstrado seus benefícios, não só na redução dos riscos ao meio ambiente, mas também à saúde humana (LI et al., 2013; FUMES et al., 2015; TIWARI, 2015).

Processos de micro-ondas e ultrassom (OLIVEIRA et al., 2014; ROCHA et al., 2014; TSUKUI et al., 2014), automatizam algumas operações, podendo ser uma alternativa sustentável e bastante prática (FUMES et al., 2015), e vem sendo aplicados com sucesso na extração de lipídios de matrizes alimentares (CRAVOTTO et al., 2008; GOULA, 2013; ROCHA et al., 2014; TSUKUI et al., 2014)

### 3.3 USO DE ENERGIA MICROONDAS

A tecnologia de radiação de micro-ondas foi desenvolvida durante a Segunda Guerra Mundial por cientistas britânicos, que utilizavam um dispositivo que de micro-ondas (magnetron) em radares para detectar aeronaves inimigas (SANSEVERINO, 2002). Em 1946, após observações que o magnetron além de emitir micro-ondas também gerava de calor, essa tecnologia foi direcionada para o aquecimento de alimentos. Até a década de 1990, a utilização das micro-ondas ficou restrita à indústria de alimentos e polímeros, somente na metade da década de 1990, aparelhos mais sofisticados foram desenvolvidos e utilizados pelo meio científico (SOUZA, MIRANDA, 2011).

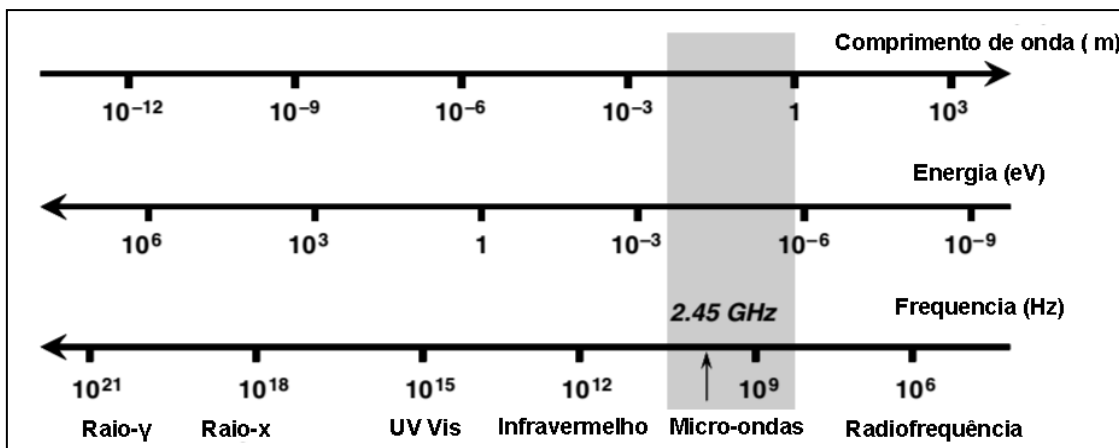
A aplicação da energia de micro-ondas na extração de compostos é amplamente utilizada, principalmente, por apresentar vantagens em relação aos métodos de extração convencionais. Em geral, o uso desta técnica permite a redução do tempo de extração/reação, do volume de solvente, da formação de produtos de degradação e o aumento do rendimento (CARRO et al., 2002; CHEN, XIE, GONG, 2007; ZHANG, YANG, LIU, 2008; LI et al., 2010; UPADHYAY, RAMALAKSHMI, RAO, 2012; OIGMAN et al., 2012).

Em reações químicas, as micro-ondas são utilizadas principalmente para acelerar as reações, garantindo, também, o aumento do rendimento e da seletividade (SÁ et al., 2010).

#### 3.3.1 Princípios teóricos

A região das micro-ondas no espectro eletromagnético corresponde à ondas eletromagnéticas com frequências que variam de 300 a 300.000 MHz em comprimentos de onda de 1 mm a 1 m (Figura 4) (KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009). Por se tratar de uma onda eletromagnética, as micro-ondas são constituídas de um campo elétrico e um magnético, onde apenas o campo elétrico está envolvido na transferência de energia para reação de aquecimento (HAYES, 2002).

**Figura 4-** Espectro eletromagnético.

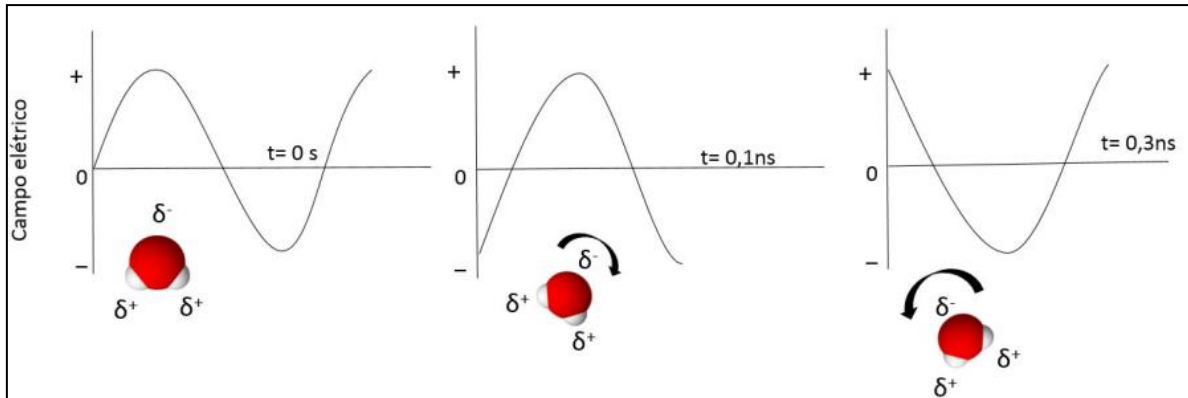


Fonte: Kappe, Dallinger e Murphree (2009).

O aquecimento de um material por irradiação com micro-ondas, também denominado aquecimento dielétrico, está relacionado com o campo elétrico da onda e com a habilidade de um material específico (solvente /reagente/amostra) em absorver a energia das micro-ondas e convertê-la em calor. Existem dois mecanismos principais para a transformação de energia eletromagnética em calor: a polarização dipolar e a condução iônica (SANSEVERINO, 2002; KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009).

Na polarização dipolar ocorre o alinhamento das moléculas (dipolos permanentes ou induzidos) com o campo eletromagnético aplicado. A Figura 5 ilustra como os dipolos de uma molécula reorientam-se, quando estão em fase com o campo elétrico oscilante (E). Conforme o campo eletromagnético oscila, o dipolo da molécula tenta alinhar-se a ele, ocorrendo rotação, fricção e colisão entre moléculas. As forças de interação aumentam a energia cinética do sistema o que resultam em aquecimento. Quando o campo é removido, as moléculas voltam ao estado desordenado e a energia que foi absorvida para a orientação é dissipada em forma de calor. Em resumo, a energia eletromagnética que se propaga em forma de onda, é convertida em energia cinética, devido aos movimentos de ordenação das moléculas, gerando calor (SANSEVERINO, 2002; KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009; SOUZA FILHO, SERRA, 2015).

**Figura 5-** Mecanismo de aquecimento por polarização dipolar.

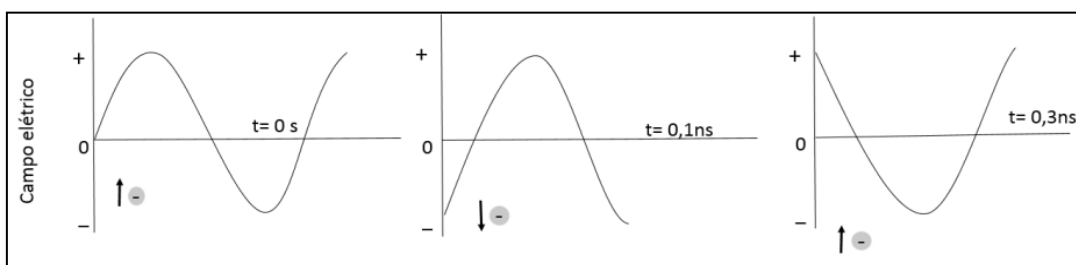


Fonte: Kappe, Dallinger e Murphree (2009).

Entre os fatores que determinam a eficiência do movimento de rotação dipolo devido a polarização dipolar, a frequência do campo elétrico e o tempo de relaxação (tempo para que os dipolos retornem ao estado de desordem inicial) são os de maior impacto. Se o dipolo não conseguir se realinhar em tempo suficiente (irradiação de alta frequência) ou se reorientar rapidamente (irradiação de baixa frequência) em relação ao campo eletromagnético aplicado, não ocorrerá aquecimento (KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009).

Em relação ao mecanismo de condução iônica, a propagação do campo elétrico faz com que as espécies carregadas (íons livres) se movam constantemente em direções opostas (Figura 6), o que resulta em um aumento da temperatura devido a fricção e colisão das moléculas (SOUSA FILHO, SERRA, 2015). Este mecanismo depende do tamanho, carga, condutividade dos íons dissolvidos e da interação destes com o solvente (SANSEVERINO, 2002). Segundo Kappe, Dallinger e Murphree (2009), em capacidade de geração de calor, o mecanismo de condução iônica tem um efeito mais pronunciado que o mecanismo de rotação dipolar.

**Figura 6-** Mecanismo de aquecimento por condução iônica.



Fonte: Kappe, Dallinger e Murphree (2009).

Segundo Sanseverino (2002), nos equipamentos de micro-ondas o campo elétrico é geralmente aplicado na frequência de 2,45 GHz e oscila  $4,9 \times 10^9$  vezes por segundo. Nesta frequência, o único parâmetro capaz de influenciar as propriedades dielétricas do material, é a temperatura do sistema. O aumento da temperatura durante o aquecimento faz com que a viscosidade do solvente diminua, o que resulta na diminuição do tempo de relaxação dos dipolos (FORTUNY et al. 2008).

Embora a radiação por micro-ondas possa provocar mecanismos de aquecimento diferentes, a distribuição de calor depende das propriedades dielétricas do material (CHANDRASEKARAN, RAMANATHAN, BASAK, 2013). A energia de micro-ondas que é transferida para as moléculas de um material é absorvida em velocidades diferentes, que dependem da frequência da radiação, temperatura e do fator de dissipação ( $\tan \delta$ ). O fator de dissipação mensura a capacidade que uma amostra tem de converter a radiação eletromagnética em calor. Este fator é dado pela razão entre perda dielétrica e a constante dielétrica de um material (Equação 1) (SANSEVERINO, 2002).

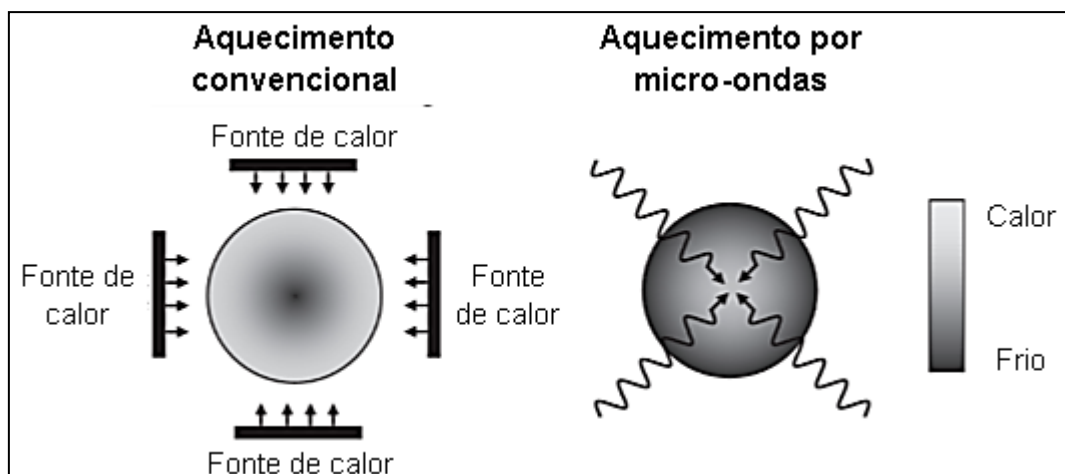
$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'} \quad \text{Eq.1}$$

A perda dielétrica ( $\epsilon''$ ) mede a eficiência da conversão da energia eletromagnética em calor e a constante dielétrica é uma medida que indica a polaridade do material ( $\epsilon'$ ). Esses parâmetros são intrínsecos do material, mas em geral os solventes podem ser classificados como de alta ( $\tan \delta > 0,5$ ), média ( $\tan \delta$  entre 0,1 e 0,5) e baixa ( $\tan \delta < 0,1$ ) capacidade absorção de energia. Quanto maior o fator de dissipação, maior será a absorção de energia e mais a substância será aquecida. Geralmente, solventes com maior polaridade (etanol, água, metanol) absorvem mais energia que os menos polares (hexano, tolueno) ou com momento de dipolo nulo ( $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ) (SANSEVERINO, 2002; KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009).

O aquecimento dielétrico se comporta diferente do convencional (Figura 7), no qual calor é transferido primeiro para o recipiente para posteriormente alcançar o material, ou seja, a transferência acontece por meio de condução, seguida de irradiação e convecção. O método convencional é mais lento e menos eficiente, já

que a transferência de energia depende das correntes de convecção e da condutividade térmica do meio, resultando em temperaturas do recipiente superiores à do material (SANSEVERINO, 2002). Essa diferença de temperatura faz com que o equilíbrio térmico demore muito tempo para ser atingido, o que dificulta o controle da reação química (HAYES, 2002; KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009). No aquecimento convencional, em recipiente hermético, a temperatura deve ser mantida de 10 à 30 °C acima do ponto de ebulição do solvente, para aumentar a eficiência do processo reacional, porém o sobre-aquecimento favorece a formação de produtos de degradação (KAPPE; DALLINGER; MURPHREE, 2009).

**Figura 7-** Esquema de transferência de calor nos sistemas de aquecimento convencional e aquecimento por micro-ondas.



Fonte: Bhattacharya, Basak (2016).

No aquecimento dielétrico (Figura 7), as moléculas do material reagem diretamente a energia de micro-ondas. Não ocorre transferência de calor, mas transferência de energia eletromagnética que é convertida em energia térmica (KAPPE; DALLINGER; MURPHREE, 2009; THOSTENSON, CHOU, 1999). Como a radiação passa através das paredes do recipiente, o calor é distribuído promovendo aquecimento rápido e uniforme até em materiais de maior espessura. Para a passagem da radiação, o material do frasco utilizado deve permitir a passagem das micro-ondas, como quartzo ou teflon (KAPPE, DALLINGER, MURPHREE, 2009; THOSTENSON, CHOU, 1999; CHANDRASEKARAN, RAMANATHAN, BASAK, 2013).

Sanseverino (2002), em revisão sobre a utilização das micro-ondas, lista uma série de vantagens do uso do micro-ondas, entre elas: taxas de aquecimento de um solvente ou reagente que absorva mais energia de micro-ondas são maiores que no aquecimento convencional; uso de materiais transparentes nos reatores proporciona absorção da energia apenas pelos reagentes/solventes ou até seletivamente por um dos constituintes; energia é transferida diretamente para a amostra, não havendo contato físico com a fonte de aquecimento; e há maior rendimento e seletividade e menor decomposição térmica para várias reações orgânicas em sistemas homogêneos e heterogêneos.

### 3.3.2 Aplicações das micro-ondas

Na otimização de processamentos por micro-ondas parâmetros como volume do solvente extrator, temperatura, tempo e potência do equipamento, além das características da matriz devem ser consideradas. Os binômios tempo/temperatura e tempo/potência são os mais estudados (SANSEVERINO, 2002; TSUKUI et al., 2014; TAGHVAEI et al., 2014). A maior parte dos estudos na literatura foca no uso de micro-ondas para processos de extração, mas os fenômenos envolvidos são similares aos observados para promover reações.

O binômio tempo/temperatura e a proporção sólido/líquido (massa de abóbora/ água) foram estudados por Kostálová, Aguedo e Hromádková (2016) na extração por micro-ondas de pectina em resíduos da abóbora. Em temperaturas mais elevadas e maiores proporções e tempo, ocorreu a diminuição da viscosidade do solvente que conseguiu penetrar nos tecidos da amostra e conseqüentemente extrair mais pectina.

Zhang, Yang e Liu (2008) observaram que maiores concentrações de ácidos clorogênicos, grupo de compostos também presentes em café, foram extraídas em menores proporções de *Lonicera japonica* pelo solvente (etanol/água), indicando que maiores proporções nem sempre são necessárias para se obter eficiência de extração. Segundo os autores, em maiores proporções a energia das micro-ondas foi absorvida, porém dispersa no material. O efeito do binômio tempo/temperatura também foi investigado. Teores mais elevados de ácidos clorogênicos foram obtidos em temperaturas mais elevadas (60 e 80 °C) até 5 min de extração e após este tempo, atingiu-se o equilíbrio da concentração, demonstrando a eficiência do micro-ondas na

extração rápida dos ácidos. Maiores rendimentos na extração por micro-ondas estão associados ao fato da radiação acelerar a ruptura celular por aumento da temperatura e aumento súbito de pressão no interior das células do material.

Uquiche, Jeréz e Ortíz (2008) avaliaram o uso de micro-ondas em pré-tratamento para extração do óleo de avelãs estudando o binômio tempo/potência (120, 180 e 240 s em 400 e 600 W). Nas condições 240 s e 400 W houve aumento de 45 % do rendimento do óleo em relação ao controle (sem irradiação). Também se observou que a irradiação por micro-ondas teve um efeito positivo sobre a estabilidade oxidativa do óleo.

Upadhyay, Ramalakshmi e Rao (2012) avaliaram as condições de extração de ácido clorogênico e cafeína em café verde. Em 5 min a 50 °C e 800 W, foi obtido o maior teor de ácidos clorogênicos e cafeína em comparação a extração por refluxo.

Maior eficiência na extração por micro-ondas em relação aos métodos convencionais também foram reportadas na extração de óleo essencial de orégano (BAYRAMOGLU, SAHIN, SUMNU, 2008), óleo de soja e algas (CRAVOTTO et al., 2008), óleo da semente de algodão (TAGHVAEI et al., 2014) e produção de biodiesel a partir do óleo de *Jatropha curcas L.* (TIPPAYAWONG, SITTISUM, 2012).

Embora o rápido aquecimento seja mencionado como uma das vantagens da radiação por micro-ondas em relação ao aquecimento convencional, há uma certa preocupação com a aplicação da radiação em amostras que contenham compostos termo sensíveis (SPIGNO, FAVERI, 2009; TSUKUI, REZENDE, 2014).

Proestos e Komait (2008), analisando o efeito da energia do micro-ondas na extração de compostos fenólicos em diferentes ervas, relataram maior extração empregando metanol, comparativamente à água. Segundo os autores, embora a água tenha fator de dissipação médio (0,123) a taxa a que absorve a energia de micro-ondas é maior do que a velocidade que o sistema pode dissipar o calor, o que pode ter ocasionado o efeito de sobreaquecimento e a degradação dos compostos fenólicos.

Segundo Hayes (2002), a irradiação por micro-ondas é bastante útil na hidrólise de ésteres, amidas e peptídios. Carro et al. (2002), utilizaram com sucesso o micro-ondas para extração e saponificação de pesticidas organoclorados em ostras, observando-se redução no volume de solvente e no tempo em relação ao método de Soxhlet e maior recuperação para alguns compostos (trans-nonachlo e aldrina).

Oigman et al. (2012) compararam a reação de metanólise assistida por micro-ondas em grãos verde de *C. arabica* ao método convencional (aquecimento sob refluxo 2 h à 90 °C). O rendimento da reação de metanólise após 3 min de irradiação das micro-ondas à 100 °C foi de 99%, enquanto no convencional foi de 26%. Maiores teores de diterpenos foram reportados para o método por micro-ondas ( $9,2 \pm 0,1 \text{ g kg}^{-1}$ ) do que para o de aquecimento sob refluxo ( $2,3 \text{ g kg}^{-1}$ ), sendo ainda relatado que na irradiação de micro-ondas não houve o desenvolvimento de produtos indesejados.

Em estudo posterior, Tsukui et al. (2014) reportaram a utilização das micro-ondas na extração prévia de lipídios de grão verde de café, seguida da metanólise também em micro-ondas. No óleo extraído por micro-ondas (10 minutos à 45 °C), o teor de diterpenos obtido foi de seis vezes maior que o obtido após 4 horas de extração por Soxhlet.

A fim de obter um método mais rápido, eficiente e preciso para extração simultânea de colesterol e óxidos de colesterol em camarões, Souza, Mariutti e Bragagnolo (2016) investigaram o efeito de aquecimento por micro-ondas na reação de saponificação. A melhor condição de saponificação foi obtida na concentração de  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  e 20 mL KOH, 45° C durante 16 min, a qual representou uma redução de tempo de 75 vezes, quando comparado com o método de saponificação à frio. Embora produtos de oxidação não tenham sido observados na reação de saponificação em micro-ondas, verificou-se uma tendência na redução no teor de óxidos quando a amostra foi submetida a maiores tempos de radiação.

### 3.4 EXTRAÇÃO POR ULTRASSOM

As técnicas de extração por ultrassom são amplamente utilizadas para o isolamento de compostos bioativos de fontes naturais (CRAVOTTO et al., 2008). O mecanismo de extração por ultrassom é atribuído às forças mecânicas e de cavitação causadas pelas ondas ultrassônicas do equipamento (EL- ASBAHANI et al., 2015). Enquanto nos métodos clássicos, a extração dos componentes depende da escolha correta do solvente e da utilização de calor e/ou agitação, o ultrassom gera fenômenos físicos e químicos, que geram calor e aceleram a taxa de transferência de massa. Estes fenômenos perturbam as paredes celulares da matriz e facilitam a

penetração do solvente extraíndo os compostos (MANSON, PANIWNKY, LORIMER, 1996; CHEMAT, E-HUMA, KHAN, 2011).

O interesse na aplicação de equipamentos de ultrassom na extração de diversos compostos tem aumentado devido as várias vantagens associadas ao uso. O aumento da taxa de extração, redução do tempo de extração e a economia de energia, solvente e amostra, fazem com que o ultrassom seja considerado uma alternativa econômica, simples, rápida e eficaz em relação às técnicas de extração convencionais (AWAD et al., 2012; TIWARI, 2015).

### 3.4.1 Princípios Teóricos

O ultrassom é definido como ondas mecânicas que possuem uma faixa de frequência entre 20 kHz até 100 MHz (MASON, 1997). Devido a essa ampla faixa de frequência, o ultrassom pode ser classificado como de alta ou baixa capacidade de sonicação (TIWARI, 2015). No primeiro grupo são características a baixa intensidade ( $<1 \text{ W cm}^{-2}$ ) em frequências superiores a 100 kHz, enquanto, no segundo, têm-se alta intensidade ( $10\text{-}1000 \text{ W cm}^{-2}$ ) em frequências entre 20 e 500 kHz (AWAD et al., 2012; TIWARI, 2015).

Os efeitos físicos, mecânicos e químicos do ultrassom estão associados a capacidade de sonicação. Na indústria de alimentos, o ultrassom de baixa capacidade é utilizado, como técnica não-destrutiva, na garantia da qualidade, controle de processo, ou na caracterização das propriedades físico-químicas dos alimentos, como, por exemplo, firmeza em frutos e qualidade de óleos. O ultrassom de alta capacidade de sonicação é aplicado em processos de extração e processamento, pois produz efeitos de perturbação e induz a mudanças físicas e químicas nos alimentos (VILLAMIEL, SORIA, 2010; AWAD et al., 2012; PICO, 2013).

A energia ultrassônica é afetada pelos parâmetros de intensidade, velocidade da onda ultrassônica e da temperatura do meio (PATIST, BATES, 2008).

Segundo Knight (2009), a intensidade de uma onda é proporcional à taxa pela qual a energia é transferida através do meio, e como a energia oscilatória do meio é proporcional ao quadrado da amplitude de oscilação, a intensidade de uma onda é proporcional ao quadrado de sua amplitude. Assim, um ultrassom de baixa intensidade apresentará baixas amplitudes, enquanto o de alta intensidade apresentará altas amplitudes.

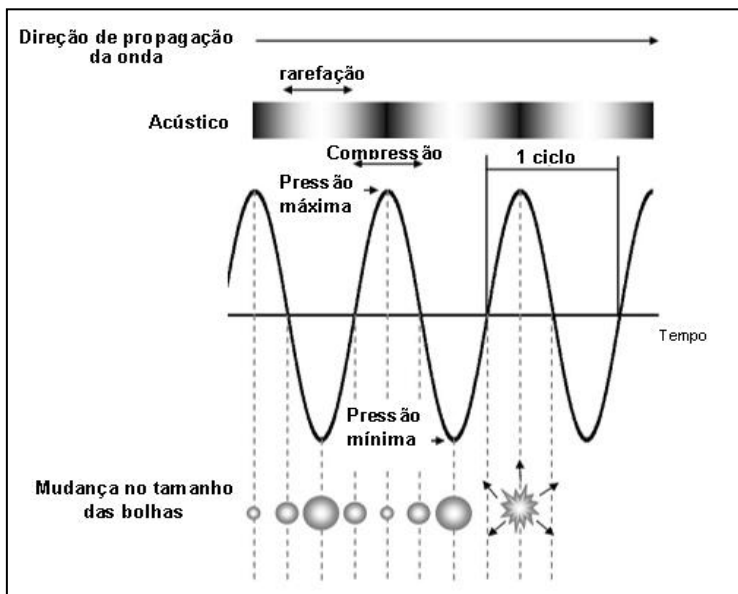
As ondas ultrassônicas, quando propagadas em um meio líquido geram, o efeito chamado pressão acústica ( $P_a$ ). Por ser uma onda senoidal, a pressão acústica depende do tempo ( $t$ ), de frequência ( $f$ ) e da pressão de amplitude máxima da onda ( $P_{a,max}$ ), definida pela Equação 2 (PATIST, BATES, 2008).

$$P_a = P_{a,max} \cdot \text{sen}(2\pi ft) \quad \text{Eq.2}$$

A pressão de amplitude máxima da onda ( $P_{a,max}$ ), é diretamente proporcional à energia transmitida pelo transdutor. Em baixas intensidades, a onda ultrassônica causa o fenômeno de *streaming* acústico, referente ao movimento e mistura dentro de um fluido sem a formação de bolhas. Em intensidades mais altas ocorre o fenômeno de cavitação acústica, devido à geração, crescimento e colapso de bolhas, que provocam a liberação de altas energias (PATIST, BATES, 2008; AWAD et al., 2012).

O efeito de cavitação consiste na formação de ciclos de compressão e de rarefação. Durante a emissão das ondas, as moléculas presentes num meio líquido transmitem umas às outras os movimentos, porém, conforme os ciclos de compressão ocorrem, as moléculas são afastadas do estágio de rarefação, criando pequenas bolhas de ar (Figura 8) que crescem devido a intensidade dos movimentos. Com os estágios de compressão seguintes, há a formação de um campo ultrassônico não estável, devido a interferência de outras bolhas que se formam e da ressonância gerada em torno delas. Com isto, as bolhas colapsam ou implodem no líquido, gerando energia química e efeito mecânico (MASON, 1997; LUQUE DE CASTRO, PRIEGO-CAPOTE, 2007; TIWARI, 2015). As bolhas formadas podem colapsar rapidamente, em menos de um ciclo, ou resistem a mais ciclos de compressão e rarefação (TIWARI, 2015). O colapso das bolhas de cavitação gera micro jatos de ar e ondas de choque. Em contato com uma amostra sólida, os micro jatos causam erosão na superfície da amostra e fragmentação, com o conseqüente aumento da transferência de massa e extração (MANSON, LORIMER, 2002).

**Figura 8-** Propagação da onda ultrassônica em meio líquido: formação e colapso da bolha de cavitação.



Fonte: Villamiel, Soria (2010).

As mudanças de temperatura e pressão durante a implosão das bolhas são parâmetros difíceis de mensurar experimentalmente, pois ocorrem em pequena escala. A temperatura de implosão no interior da cavidade é cerca de 5500 °C, enquanto que ao redor da cavidade é cerca de 2100 °C. A pressão é estimada em torno de 500 atm (TIWARI, 2015).

O efeito das ondas ultrassônicas no fenômeno de cavitação depende além dos parâmetros já citados, da temperatura, das propriedades da matriz, como viscosidade e tensão superficial, e do tipo de reator (banho ou probe) (MANSON, LORIMER, 2002; TIWARI, 2015).

A temperatura afeta a pressão de vapor, a tensão superficial e a viscosidade do líquido. Em temperaturas mais elevadas ocorre o aumento das bolhas de cavitação, porém o efeito deste fenômeno é inibido pela pressão de vapor formada, que bloqueia o colapso. Em baixas temperaturas, a pressão de vapor do solvente é menor, permitindo que as bolhas de cavitação colapsem violentamente (SHAH, PANDIT, MOHOLKAR, 1999; PATIST, BATES, 2008). Em solventes mais viscosos ou com maior tensão superficial, ocorre a redução da formação das bolhas de cavitação, devido às forças de coesão do líquido serem maiores. Para promover a cavitação do líquido, a amplitude da onda deve ser elevada, com isto ocorre o aumento das vibrações mecânicas, da temperatura e da pressão de implosão (PATIST, BATES,

2008; SANTOS, LODEIRO, CAPELO, 2009; SHIRSATH, SONAWANE, GOGATE 2012).

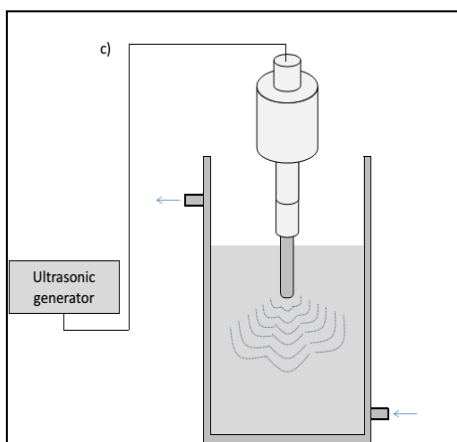
Segundo Manson e Lorimer (2002) e Patist e Bates (2008), existe um limiar de temperatura para que haja efeito de cavitação. Esse limiar deve garantir que a viscosidade do líquido esteja baixa o suficiente para formar e colapsar as bolhas de cavitação e que, ao mesmo tempo, evite o efeito de amortecimento da pressão de vapor sob as bolhas.

Em sua revisão, Tiwari (2015) relata que o tipo e a posição do transdutor no equipamento afetam o desempenho do ultrassom, uma vez que este transforma a energia elétrica em energia sonora (PICO, 2013). Em geral, os transdutores são formados por materiais piezoelétricos ( $\text{BaTiO}_3$ ,  $\text{PbNb}_2\text{O}_6$ ) (MASON, 1997; TIWARI, 2015).

Nos banhos ultrassônicos, aparelhos mais simples e baratos, os transdutores não estão em contato direto com a amostra, ocorrendo, assim, perdas significativas de energia acústica nas profundidades e aos arredores do banho. Comumente são utilizados para dispersão sólida em solvente com melhora a solubilidade, para degaseificação ou limpeza de material (CHEMAT, E-HUMA, KHAN, 2011). Em alimentos, é relatado o uso de banhos ultrassônicos na extração de diferentes compostos, como polifenóis, rutina, quercetina, e isoflavonas, em diversas matrizes (GHAFOR et al., 2009; SHIRSATH, SONAWANE, GOGATE 2012; SALIM, SAMLI, 2013).

Nos probes (Figura 9), a energia fornecida à amostra é cerca de 100 vezes maior do que a fornecida por um banho ultrassônico (SANTOS, CAPELO, 2007; SANTOS, LODEIRO, CAPELO, 2009). Como os transdutores estão em contato direto com a amostra, as perdas de energia acústica são mínimas e, na presença de um solvente adequado, a eficiência da extração pode ser aumentada (CHEMAT, E-HUMA, KHAN, 2011).

**Figura 9-** Sistema de extração assistida por ultrassom utilizando probe como fonte de propagação.



Fonte: Tiwari (2015).

Dentre os diversos fatores que devem ser considerados para extração utilizando probes, a temperatura é o fator a ser controlado. À medida que as ondas ultrassônicas são fornecidas para a amostra, ocorre um aumento lento, mas constante de temperatura no probe, ao atingir um ponto em que começam a ocorrer mudanças físicas, como a fragmentação do probe, o que inviabiliza o seu uso (SANTOS, CAPELO, 2007). Probes de alta intensidade são capazes de elevar a temperatura do meio (amostra, solvente) em até 85 °C acima da temperatura determinada, o que pode ocasionar à degradação de compostos termo sensíveis (TIWARI, 2015).

Na maioria dos equipamentos sonicadores, a eficácia da sonicação é medida através da intensidade de cavitação e não da energia aplicada ao sistema. Assim, a amplitude é o parâmetro fornecido, mantido e monitorado pelo equipamento. Para isto, uma rede de sensores monitora continuamente a saída de energia, e ajusta automaticamente a potência para manter a amplitude ao nível pré-selecionado.

### 3.4.2 Ultrassom em Processos de Extração

Diversas pesquisas têm sido realizadas para avaliar o efeito do ultrassom em processos de extração de diferentes compostos, principalmente em matrizes de origem vegetal, como óleos essenciais, compostos aromáticos, proteínas, pigmentos, compostos fenólicos, entre outros (SHIRSATH, SONAWANE, GOGATE 2012; TIWARI, 2015). Entretanto, não há relatos na literatura do uso de ultrassom para extração de diterpenos em café. Os poucos estudos com ultrassom estão

relacionados com a obtenção do óleo de café para posterior produção de biodiesel. Na Tabela 1 estão dispostas algumas aplicações do ultrassom em diferentes matrizes.

Rocha et al. (2014) avaliaram a capacidade do banho ultrassônico na extração de óleo de borra de café para a produção de biodiesel e determinaram como melhor condição de extração (12% de rendimento) o emprego de 60 °C, frequência de 40 kHz e proporção sólido/líquido de 4 g de borra de café para 4 mL de hexano.

Os efeitos do ultrassom nas características físico-químicas do óleo de *perilla* foram investigados por Li et al. (2015). Observou-se o rendimento de extração do óleo de 36 % sob as condições de 41 °C, 17 min e proporção de 7:1 (líquido/sólido). Em comparação com outros métodos, o ultrassom reduziu o tempo de extração e volume de solvente. Comportamento semelhante foi reportado por Goula (2013) para óleo de semente de romã, e por Heleno et al. (2016) para ergosterol em cogumelos (*A. bisporus* L).

Da Porto, Porreto e Decorti (2013), trabalhando com extração do óleo de uva, verificaram eficiência similar no tratamento por ultrassom por 30 min em comparação com Soxhlet (6 horas).

**Tabela 2-** Aplicação de ultrassom na extração (EAU) em diferentes matrizes.

Composto/ matriz	Condições operacionais	Resultado/ observações	Referencia
Composto fenólicos em grãos de soja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Probe de 7 mm de diâmetro, potência 40 W, amplitude 20%</li> <li>• Tempo de extração: 3 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EAU extraiu mais compostos fenólicos em menor tempo (30 min) do que a extração sólido/líquido convencional (15 horas);</li> <li>• O teor de compostos fenólicos extraídos por EAU foi 54 a 139% maior do que obtido na extração convencional (sólido/líquido – agitação mecânica) e 57% maior que extração por Soxhlet.</li> </ul>	Chung et al. (2010)
Isoflavonas em grãos de soja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Probe de 2 mm de diâmetro, potência de 200 W e frequência de 24 kHz.</li> <li>• Temperatura de extração: 60 °C</li> <li>• Tempo de extração: 10 min</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A extração por ultrassom foi eficiente mas mostrou-se dependente do tipo de solvente</li> <li>• EAU extraiu maior quantidade de isoflavonas (15%) em relação ao método de agitação mecânica.</li> </ul>	Rostagno, Palma, Barroso, (2013)
Compostos fenólicos do bagaço de uva	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Probe 21,4 mm de diâmetro, intensidade de 22,9 W/cm<sup>2</sup>, frequência de 55 ± 5 kHz</li> <li>• Temperatura de extração: 50 °C</li> <li>• Tempo de extração: 1 h, pulsos de 0,5 s.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento do teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante (ABTS e FRAP) em relação ao método convencional</li> <li>• EAU reduziu o tempo e temperatura de extração e proporcionou extratos semelhantes aos obtidos por extração convencional (agitação mecânica).</li> </ul>	González-Centeno et al. (2015)
Pectina da casca de toranja	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Probe 25 mm diâmetro, intensidade de 2,56 W/cm<sup>2</sup> (eq*. potência de 70 W), frequência de 20 kHz</li> <li>• Temperatura de extração: 66 °C</li> <li>• Tempo de extração: 28 min (pulsado 10 s on: 50 s off).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• EAU proporcionou maior rendimento de pectina (&gt;16%) com temperatura mais baixa e tempo de extração mais curto (&lt;38%) em relação ao método convencional.</li> <li>• Observadas alterações de cor, microestrutura, propriedades físico-químicas na extração por EAU.</li> </ul>	Wang et al. (2015)
Óleo de pistache	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Probe 10 mm de diâmetro, amplitude 25 e 50%, potência 100 W, frequência 30 kHz.</li> <li>• Temperatura de extração: 30, 40 e 50 °C</li> <li>• Tempo de extração: pulsos 10 s on: 5 s off.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maiores quantidades óleo (&gt;77,5%) foram extraídas em amplitude ao nível de 50% e em amplitudes ao nível de 25% (&gt;66,3%);</li> <li>• Óleo extraído com ultrassom demonstrou níveis mais elevados de tocoferol e tocotrienol.</li> <li>• A composição de ácidos graxos e o processo de oxidação não foram afetados de forma significativa pela aplicação do ultrassom.</li> </ul>	Hashemi et al. (2015)

EAU: Extração Assistida por Ultrassom; \*eq.=equivalente

Segundo Tiwari (2015), o objetivo principal de um processo de extração é maximizar o rendimento do composto de interesse, com o mínimo impacto possível sobre suas propriedades. Nas condições operacionais geralmente empregadas, a extração por ultrassom não causa alterações significativas nas propriedades estruturais e funcionais da maioria dos compostos bioativos (VILLAMIEL, SORIA, 2010). No entanto, é importante que as condições operacionais (tempo, temperatura, amplitude) sejam otimizadas, principalmente para analitos termos sensíveis.

Ma et al. (2008) observaram degradação de alguns compostos nos extratos da casca de tangerina (*Citrus unshiu Marc.*) após a extração em banho ultrassônico (40 °C por 20 min). Houve perda significativa de ácido caféico e redução dos teores dos ácidos sinápico, *p*-cumárico e ferúlico.

Outro fatores que afetam diretamente o fenômeno de cavitação, ou seja, as fases de nucleação, crescimento e colapso das bolhas, é a intensidade da onda ultrassônica (GUO et al., 2014).

Goula (2013), utilizando probe de 13 mm à 130 W e 20 kHz, estudou vários níveis de amplitude (20, 30, 40, 50 e 60%) e diferentes tempos na extração (10 a 40 min) do óleo de semente de romã. Os maiores rendimentos foram obtidos com o aumento da amplitude, mas o rendimento de extração também aumentou proporcionalmente com o tempo, especialmente na faixa de 2 a 20 min, estabilizando na faixa de 20 a 40 min. Os autores atribuíram esse comportamento ao fato da extração apresentar duas fases: a primeira caracterizada pela penetração do solvente na estrutura celular seguida pela dissolução dos componentes solúveis, enquanto a segunda envolve a difusão dos componentes solúveis pela estrutura porosa do sólidos residuais e sua transferência para o solvente em contato.

Li, Pordesimo e Weiss (2004), estudando a influência de diferentes níveis de intensidade no rendimento de óleo de soja, verificaram que em maiores intensidades (47, 6 W cm<sup>-2</sup>), o rendimento da extração foi superior.

Ressalta-se que o uso de amplitudes mais elevadas nem sempre resulta em extrações eficientes (SANTOS, CAPELO, 2007). Os estudos de Hernández-Santos et al. (2016) demonstraram que, na faixa de amplitude (25-100%) e tempo de extração (5-30 min) estudados, a maior eficiência de extração do óleo de semente de abóbora foi obtida na amplitude 62,5% durante 5 min.

Segundo Awad et al. (2012), o aumento no rendimento de extração utilizando ultrassom pode ser relacionado aos efeitos provocados pela aplicação de ondas ultrassônicas de alta intensidade, que faz com que haja compressão e cisalhamento das moléculas do solvente com amostra.

Os efeitos físicos das bolhas de cavitação foram observados por Zhang et al. (2014) na extração por banho ultrassônico dos ácidos oleanólico e ursólico da flor de romã, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Segundos os autores os danos causados pela extração por sonicação à superfície celular, aumentou a área interfacial entre o solvente e a amostra, fazendo com que o solvente conseguisse penetrar, solubilizar e extrair mais facilmente os compostos. Comportamento similar foi verificado por Zhang et al. (2008) na extração de óleo de linhaça por sonicação.

Abdullah e Koc (2013) observaram que após a sonicação com probe ultrassônico (1,92 cm de diâmetro), a borra de café ficou mais lisa e uniforme e houve diminuição do tamanho das partículas, o que ocasionou maiores rendimentos de óleo de café (98%).

## REFERENCIAS

ABDULLAH, M. A.; KOC, B. Oil removal from waste coffee grounds using two-phase solvent extraction enhanced with ultrasonication. **International Journal Renewable Energy**, Oxford, v. 50, p.965-970, 2013.

ABIC. Associação Brasileira da Indústria de Café. 2016. **Indicadores de consumo de café no Brasil- outubro de 2015**. Disponível em: <http://abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#consint2015.2>  
Acesso em nov. 2016.

ACEVEDO, F.; RUBILAR, M.; SCHEUERMANN, M.; CANCINO, B.; UQUICHE, E.; GARCÉS, M.; INOSTROZA, K.; SHENE, C. Spent Coffee Grounds as a Renewable Source of Bioactive Compounds. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, Valencia, v.7, n.20, p.1-9, 2013.

ARAUJO, J. M. A; SANDI, D. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, Barking, v.101, n.3, p.1087-1094, 2006.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; LA GUARDIA, M. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.71, p.2-8, 2008.

AWAD, T.S.; MOHARRAM, H.A.; SHALTOUT, O.E.; ASKER, D.; YOUSSEF, M.M. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. **Food Research International**, Essex, v.48, n.2, p.410-427, 2012.

AZEVEDO, A. B. A; KIECKBUSCH, T. G; TASHIMA, A. K., MOHAMED, R. S; MAZZAFERA, P; VIEIRA DE MELO, S. A. B. Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v.44, n.2, p.186-192, 2008.

BARBOSA, H. M. A.; MELO, M. M.R.; COIMBRA, M. A.; PASSOS, C. P.; SILVA, C. M. Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v.85, p.165-172, 2014.

BAYRAMOGLU, B.; SAHIN, S.; SUMNU, G. Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. **Journal of Food Engineering**, Londres, v.88, n.4, p.535-540, 2008.

BELANDRIA, V.; OLIVEIRA, P. M. A.; CHARTIER, A.; RABI, J. A.; OLIVEIRA, A. L.; BOSTYN, S. Pressurized-fluid extraction of cafestol and kahweol diterpenes from green coffee. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, v.37, parte A, p.145-152, 2016.

BENASSI, M. T.; DIAS, R. C. E. Assay of kahweol and cafestol in coffee. In: PREEDY, V. R. **Coffee in health and disease prevention**. 1. Ed. Londres: Elsevier, 2015, p.993-1004.

BHATTACHARYA, M.; BASAK, T. A review on the susceptor assisted microwave processing of materials. **Energy**, Oxford, v.97, p.306-338, 2016.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, n.8, p.911- 917, 1959.

BREITMAIER, E. **Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones**. V.1, 1.ed. Tubigen: Wiley-VCH, 2006. 214 p.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; BISMARA, M. A. R. A. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.4, p.849-854, 2009.

BUTT, M. S.; SULTAN, T. Coffee and its consumption: Benefits and risks. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.51, n.4, p.363-373, 2011.

CAMPANHA, F. G.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. Discrimination of coffee species using kahweol and cafestol: effects of roasting and of defects. **Coffee Science**, Lavras, v.5, n.1, p.87-96, 2010.

CARRO, M.; GARCIA, I.; IGNACIO, M. C; LIOMPART, M.; YEBRA, M. C.; MOUTEIRA, A. Microwave-assisted extraction and mild saponification for determination of organochlorine pesticides in oyster samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.374, n.3, p.547-553, 2002.

CAVIN, C.; HOLZHAUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W. W.; SCHILTER, B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.40, n.1, p.1155-1163, 2002.

CECAFE- **Conselho dos exportadores de café do Brasil. Relatório Mensal: Setembro de 2016**. Disponível em: <http://www.cecafe.com.br/publicacoes/relatorio-de-exportacoes/>. Acesso em nov. 2016. a

CECAFE- **Conselho dos exportadores de café do Brasil. Consumo mundial de café (sacas de 60 kg)**. Disponível em: <http://www.cecafe.com.br/dados-estatisticos/consumo-mundial/>. Acesso em nov. 2016. b

CHANDRASEKARAN, S.; RAMANATHAN, S.; BASAK, T. Microwave food processing: a review. **Food Research International**, Essex, v.52, n.1, p.243-261, 2013.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.G.; MEULLEMIESTRE, A.; MEULLEMIESTRE, A.S.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.34, n.1, p.540-560, 2017.

CHEMAT, F.; E-HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.18, n.4, p.813-835, 2011.

CHEN, Y.; XIE, M. Y.; GONG, X. F. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. **Journal of Food Engineering**, Londres, v.81, p.162-170, 2007.

CHUNG, H.; JI, X.; CANNING, C.; SUN, S.; ZHOU, K. Comparison of different strategies for soybean antioxidant extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.58, n.7, p.4508–4512, 2010.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: café (Safr 2016/2017- Terceiro levantamento)**. Brasília. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_09\\_22\\_09\\_06\\_12\\_boletim\\_cafe\\_-\\_setembro\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_22_09_06_12_boletim_cafe_-_setembro_2016.pdf)>. Acesso em nov. 2016.

CRAVOTTO, G.; BOFFA, L.; MANTEGNA, L.; PEREGO, P.; AVOGADRO, M.; CINTAS, P. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.15, n.5, p.898–902, 2008.

CROZIER, A.; LUDWIG, I. A.; CLIFFORD, M. N.; LEAN, M. E. J.; ASHIHARAD, H. Coffee: biochemistry and potential impact on health. **Food & Function**, Cambridge, v.5, p.1695-1717, 2014.

DA PORTO, C.; PORRETO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.20, n.4, p.1076–1080, 2013.

DIAS, R. C. E.; FARIA-MACHADO, F. A.; MERCADANTE, A. Z.; BRAGAGNOLO, N.; BENASSI, M. T. Roasting process affects the profile of diterpenes in coffee. **European Food Research and Technology**, Berlin, v.239, n.6, p.961-970, 2014.

DIAS, R. C. E.; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.; BRAGAGNOLO.; BENASSI, M. T. Comparison of extraction methods for kahweol and cafestol analysis in roasted coffee. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.24, n.3, p. 492-499, 2013.

DIAS, R. C. E.; CAMPANHA, F.G.; VIEIRA, L. G. E.; FERREIRA, L. P.; POT, D.; MARRACCINI, P.; BENASSI, M. T. Evaluation of kahweol and cafestol in coffee tissues and roasted coffee by a new high-performance liquid chromatography methodology. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, Washington, v.58, n.1, p.88–93, 2010.

DJERASSI, C; CAIS, M; MITSCHER, L. A. Terpenoids. XXXVII. The structure of the pentacyclic diterpene cafestol. On the absolute configuration of diterpenes and alkaloids of the phyllocladene group. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.81, n.10, p.2386-2398, 1959.

EL ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; AIT ADDI, E. H.; CASABIANCA, H.; EL MOUSADIK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.483, n.1-2, p.220-243, 2015.

FARAH, A. Coffee Constituents. In: CHU, Y. F. **Coffee: Emerging health effects and disease prevention**. 1. Ed. Koboken: John Wiley & Sons, 2012, p.22-58.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.226, p.497-509, 1957.

FORTUNY, M.; RAMOS, A. L. D.; DARIVA, C.; EGUES, S. M.; SANTOS, A. F. Principais aplicações das micro-ondas na produção e refino de petróleo. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.6, p.1553-1561, 2008.

FUMES, B. H.; SILVA, M. R.; ANDRADE, F. N.; NAZÁRIO, C. E. D.; LANÇAS, F. M. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.71, p.9-25, 2015.

GAASCHT, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Coffee provides a natural multitarget pharmacopeia against the hallmarks of cancer. **Genes & Nutrition**, New Orleans, v.10, n.6, p.51-68, 2015.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIESNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical chemistry**, Amsterdam, v.50, p.78-74, 2013.

GENKINGER, J. M.; GEBARA, V. Coffee intake and pancreatic cancer risk. In: PREEDY, V. R. **Coffee in health and disease prevention**. 1. Ed. Londres: Elsevier, 2015, p.367-373.

GEORGE, S. E.; RAMALAKSHMI, K.; RAO, L. J. M. A perception on health benefits of coffee. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.48, n.5, p.464-486, 2008.

GHAFOOR, K.; CHOI, Y. H.; JEON, J. Y.; JO, I. H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.57, n.11, p.4988-4994, 2009.

GIRIDHAR, P.; SRIVEDI, V.; RAVISHANKAR, G. A. Free diterpenes cafestol and kahweol in beans and in vitro cultures of *Coffea* species. **Current Science**, Bengaluru, v.99, n.8, p.1101-1104, 2010.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R.; COMAS-SERRA, F.; FEMENIA, A.; ROSSELLÓ, C.; SIMAL, S. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.22, n.1, p.506-514, 2015.

GOULA, A. M. Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil – Kinetic modeling. **Journal of Food Engineering**, Londres, v.117, n.4, p.492-498, 2013.

GUO, X.; YE, X.; SUN, Y.; WU, D.; WU, N.; HU, Y.; CHEN, S. Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure, and antioxidant activity of sea cucumber fucoidan.

**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.62, n.5, p.1088-1095, 2014.

GUERCIA, E.; BERTI, F.; NAVARINI, L.; DEMITRI, N.; FORZATO, C. Isolation and characterization of major diterpenes from *C. canephora* roasted coffee oil. **Tetrahedron: Asymmetry**, Oxford, v.27, n.14-15, p.649-656, 2016.

HAAGEN-SMIT, A. J. The biogenesis of terpenes. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.4, p.305-324, 1953.

HASHEMI, S. M.; MICHIELS, J.; YOUSEFABAD, S. H. A.; HOSSEIN, M. Kolkhoung (*Pistacia khinjuk*) kernel oil quality is affected by different parameters in pulsed ultrasound-assisted solvent extraction. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v.70, p.28-33, 2015.

HAYES, B. L. **Microwave Synthesis: Chemistry at the speed of the light**. V.1, 1 ed. Matthews: CEM Publishing. 2002. 289 p.

HELENO, S. A.; DIZ, P.; PRIETO, M. A.; BARROS, L.; RODRIGUES, A.; BARREIRO, M. F.; FERREIRA, I. C. F. R. Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. **Food Chemistry**, Barking, v.197, n.2, p.1054-1063, 2016.

HERNÁNDEZ-SANTOS, B.; RODRÍGUEZ-MIRANDA, J.; HERMAN-LARA, E.; TORRUCO-UCO, J. G.; CARMONA-GARCÍA, R.; JUÁREZ-BARRIENTOS, J. M.; CHÁVEZ-ZAMUDIO, R.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, C. E. Effect of oil extraction assisted by ultrasound on the physicochemical properties and fatty acid profile of pumpkin seed oil (*Cucurbita pepo*). **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.31, p.429-436, 2016.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and Health: A review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.46, n.2, p. 101-112, 2006.

ICO. International Coffee Organization. **Total production by all exporting countries**. Disponível em: < <http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>. > Acesso em nov. 2016.

KAPPE, O.; DALLINGER, D.; MURPHREE, S.S. **Practical microwave synthesis for organic chemists: strategies, instruments, and protocols**. V.1, 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. 299 p.

KITZBERGER, C. S. G.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. Bioactive compounds content in roasted coffee from traditional and modern *Coffea arabica* cultivars grown under the same edapho-climatic conditions. **Food Research International**, Essex, v.61, p.61-66, 2014.

KITZBERGER, C. S. G.; SCHOLZ, M. B. S.; PEREIRA, L. F. P.; BENASSI, M. T. Composição química de cafés arábica de cultivares tradicionais e modernas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.11, p.1498-1506, 2013a.

KITZBERGER, C. S. G.; SCHOLZ, M. B. S.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E.; SERA, T.; GONÇALVES, J. B.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M.T. Diterpenes in green and roasted coffee of *Coffea arabica* cultivars growing in the same edapho-climatic conditions. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.30, n.1, p.52-57, 2013b.

KNIGHT, R. D. **Física - Uma Abordagem Estratégica**. Vol. 2. 2 ed. Porto Alegre: Artemed, 2009. 392 p.

KOLLING-SPEER, I.; STROHSCHNEIDER, S.; SPEER, K. Determination of free diterpenes in green and roasted coffees. **Journal of High Resolution Chromatography**, Weinheim, v.22, n.1, p.43-44, 1999.

KOSVÁLOVÁ, Z.; AGUEDO, M.; HROMÁDKOVÁ, Z. Microwave-assisted extraction of pectin from unutilized pumpkin biomass. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, Lausanne, v.102, p.9-15, 2016.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Diterpenes and diterpene esters in coffee. **Food Reviews International**, New York, v.17, n.4, p.433-450, 2001.

LAGO, R. C. A. Lipídios em grãos de café. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.19, n.2, p.319-340, 2001.

LI, H. Z.; ZHANG, Z. J.; HOUZ, T. Y.; LI, X. J.; CHEN, T. Optimization of ultrasound-assisted hexane extraction of perilla oil using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v.76, p.18-24, 2015.

LI, Y.; FABIANO-TIXIER, A. S.; TOMAO, V.; CRAVOTTO, G.; CHEMAT, F. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.20, n.1, p.12-18, 2013.

LI, J.; ZU, Y. G.; FU, Y. J.; YANG, Y. C.; LI, S. M.; LI, Z. N.; WINK, M. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, v.11, n.4, p.637-643, 2010.

LI, H.; PORDESIMO, L.; WEISS, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. **Food Research International**, Essex, v.37, n.7, p.731-738, 2004.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Ultrasound-assisted preparation of liquid samples. **Talanta**, Londres, v.72, n.2, p.321-334, 2007.

MA, Y. Q.; YE, X. Q.; FANG, Z. X.; CHEN, J. C.; XU, G. H.; LIU, D. H. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.56, n.14, p.5682-5690, 2008.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.14, n.1, p.93-100, 2001.

MANSON, T. J.; LORIMER, J. **Applied sonochemistry: The uses of power ultrasound in chemistry and processing**. V.1, 1 ed. Darmstadt: Wiley-VCH, 2002. 293 p.

MANSON, T. J.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J. P. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.3, p.253-260, 1996.

MASON, T. J., Ultrasound in synthetic organic chemistry. **Chemical society reviews**, Londres, v.26, p.443-45, 1997.

MARTINS, A. L. **História do Café**. 1 ed. São Paulo: Contexto, 2008. 316 p.

MEDINA, A. L. **Rápida extração de lipídios e transesterificação de triacilgliceróis de amostras cárneas assistidos por micro-ondas**. 2013. 144 fls. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

MORI, A. L. B.; KALSCHENE, D. L.; FERRÃO, M. A. G.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G.; BENASSI, M. T. Diterpenes in *Coffea canephora*. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.52, n.1, p.52-57, 2016.

MURIEL, P.; ARAUZ, J. Coffee and liver diseases: A review. **Fitoterapia**, Milano, v.81, n.1, p.297-305, 2010.

NAGEGOWDA, D. A. Plant volatile terpenoid metabolism: Biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.584, n.14, p.2956-2973, 2010.

OIGMAN, S. S.; DE SOUZA, R. O. M. A.; DOS SANTOS JÚNIOR, H. M.; HOVELL, A. M. C.; HAMERSKI, L.; REZENDE, C. M. Microwave assisted methanolysis of green coffee oil. **Food Chemistry**, Barking, v.134, n.1, p.999-1004, 2012.

OLIVEIRA, P. M. A; ALMEIDA, R. H; OLIVEIRA, N. A; BOSTYN, S.; GONÇALVES, C.B; OLIVERA, A. L. Enrichment of diterpenes in green coffee oil using supercritical fluid extraction – Characterization and comparison with green coffee oil from pressing. **The Journal of upercritical Fluids**, Amsterdam, v.95, n.1, p.137-145, 2014.

ORTIZ, W. P. R; BENINCÁ, C; ZANOELO, E. F. Cyclically pressurized extraction of solutes from ground coffee: Kinetic experiments and modeling. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v.141, p.256-262, 2015.

PACETTI, D.; LUCCI, P.; FREGA, N. Unsaponifiable matter of coffee. In: PREEDY, V.R. **Coffee in health and disease prevention**. 1. Ed. Londres: Elsevier, 2015, p.119-127.

PATIST, A.; BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, v.9, n.2, p.147-154, 2008.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário das Plantas**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, 2004. p. 1-10.

PICO, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.43, n.1, p.84-99, 2013.

PROESTOS, C.; KOMAITIS, M. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. **LWT- Food Science and Technology**, Londres, v.41, n.4, p.652-659, 2008.

ROCHA, M. V. P.; MATOS, L. J. B. L.; LIMA, L. P.; FIGUEIREDO, P. M. S.; LUCENA, I. S.; FERNANES, F. A. N.; GONÇALVES, L. R. B. Ultrasound-assisted production of biodiesel and ethanol from spent coffee grounds. **Bioresource Technology**, Essex, v.167, p.343-348, 2014.

ROOS, B.; WEG, G. V. D.; URGERT, R.; BOVENKAMP, P. V. D.; CHARRIER, A.; KATAN, M. B. Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45 n.8, p.3065–3069, 1997.

ROSTAGNO, M. A.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. **Journal of Chromatography A**, New York, v.1012, n.2, p.119-128, 2013.

RUBAYIZA, A. B.; MEURENS, M. Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by Fourier Transform Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.53, n.12, p.4654-4659, 2005.

SÁ, M. M.; MEIER, L.; DUTRA, L. G.; BISOL, T. B. Reator de micro-ondas do DQ/UFSC: Quatro anos acelerando reações, descobertas e oportunidades. **Revista Virtual da Química**, Niterói, v.2, n.3, p.165-177, 2010.

SALIM, S.; SAMLI, R. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.20, n.1, p.595-602, 2013.

SANSEVERINO, A. M. Micro-ondas em síntese orgânica. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.4, p.660-667, 2002.

SANTO, H. M.; LODEIRO, C.; CAPELO, J. L. M. **Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications**, v.1, 1 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2009, 171 pg.

SANTOS, M. H.; CAPELO, J. L. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. **Talanta**, Londres, v.73, n.5, p.795-802, 2007.

SCHLECHTRIEM, C.; FLIEDNER, A.; SCHÄFERS, C. **Contributions to the revision of TG OECD 305: Lipid measurement**. Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology (IME). Germany, 2009. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/48470247.pdf>> Acesso em: fev. 2016.

SCHOLZ, M. B. S.; PAGIATTO, N. F.; KITZBERGER, C. S. G.; PEREIRA, L. F. P.; DAVRIEUX, F.; CHARMETANT, P.; T, LEROY. Validation of near-infrared

spectroscopy for the quantification of cafestol and kahweol in green coffee. **Food Research International**, Essex, v.61, p.176-182, 2014.

SHAH, Y. T.; PANDIT, A. B.; MOHOLKAR, V. S. **Cavitation reaction engineering**. Vol. 1. 1 ed. New York: Springer US, 1999. 352 p.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N. Extraction and analysis of lipids. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology**. 2. Ed. New York: Marcel Dekker Incorporation, 2002, p.150-168.

SHIRSATH, S. R.; SONOWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, Lausanne, v.53, n.1, p.10-23, 2012.

SOUZA, H. A. L.; MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Microwave assisted direct saponification for the simultaneous determination of cholesterol and cholesterol oxides in shrimp. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. Disponível em:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076016300747>. Acesso em: out. 2016.

SOUZA FILHO, P. C.; SERRA, O. A. Metodologias de síntese em fase líquida para a obtenção de nanomateriais inorgânicos à base de terras raras. **Química Nova**, São Paulo, v.38, n.5, p.679-696, 2015.

SOUZA, R. M. N.; BENASSI, M. T. Discrimination of Commercial Roasted and Ground Coffees According to Chemical Composition. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.23, n.7, p.1347-1354, 2012.

SOUZA, R. O. M. A.; MIRANDA, L. S. M. Irradiação de micro-ondas aplicada à síntese orgânica: uma história de sucesso no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v.24, n.3, p.497-506, 2011.

SOUZA, R. M. N.; CANUTO, G. A. B.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. **Química Nova**, São Paulo, v.33, n.4, p.885-890, 2010.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. **Polytechnisches Journal**, Erlangen, v.232, n.5, p.461-465, 1879.

SPEER, K., KOLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Rio de Janeiro, v.18 n.1, p. 201–216, 2006.

SPIGNO, G.; FAVERI, D. M. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. **Journal of Food Engineering**, Londres, v.93, n.2, p. 210-217, 2009.

TAGHVAEI, M.; JAFARI, D. M.; ASSADPOOR, E.; NOWROUZIEFH, S.; OMRAN, A. Optimization of microwave-assisted extraction of cottonseed oil and evaluation of its oxidative stability and physicochemical properties. **Food Chemistry**, Barking, v.160, p.90-97, 2014.

THOSTENSON, E. T.; CHOU, T. W. Microwave processing fundamentals and applications. **Composites: Part A: Applied science and manufacturing**. Oxford, v.30, p.1055-1071, 1999.

TIPPAYAWONG, N.; SITTISUN, P. Continuous-flow transesterification of crude jatropha oil with microwave irradiation. **Scientia Iranica**, Tehran, v.19, n.5, p.1324-1328, 2012.

TIWARI, B. K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.71, n.1, p.100-109, 2015.

TSUKUI, A.; OIGMAN, S. S.; REZENDE, C. M. Óleo de grãos de café cru: diterpenos cafestol e caveol. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v.6, n.1, p.16-33, 2014.

TSUKUI, A.; SANTOS JUNIOS, H. M.; OIGMAN, S. S.; SOUZA, R. O. M. A.; BIZZ, H. R.; REZENDE, C. M. Microwave-assisted extraction of green coffee oil and quantification of diterpenes by HPLC. **Food Chemistry**, Barking, v.164, n.1, p.266-271, 2014.

UPADHYAY, R.; RAMALAKSHMI, K.; RAO, J. M. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans. **Food Chemistry**, Barking, v.130, n.1, p.184-188, 2012.

UQUICHE, E.; JERÉZ, M.; ORTÍZ, J. Effect of pretreatment with microwaves on mechanical extraction yield and quality of vegetable oil from Chilean hazelnuts (*Gevuina avellana Mol*). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Oxford, v.9, n.4, p.495-500, 2008.

URGERT, R. U.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUI, T. G.; BOVERIKAMP, P. V. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.43, n.8, p.2167-2172, 1995.

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

VILLAMIEL, M.; SORIA, A. C. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.21, n.7, p.323-331, 2010.

WANG, W.; MA, X.; XU, Y.; CAO, Y.; JIANG, Z.; DING, T.; YE, X.; LIU, D. Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. **Food Chemistry**, Barking, v.178, n.1, p.106-114, 2015.

WUERGES, K. L. **Teores de diterpenos em bebidas de café com diferentes preparos**. 2015. 62 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências de alimentos)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ZANIN, R. C. **Perfil de ácidos clorogênicos, cafeína e diterpenos em cafés arábica torrados brasileiros**. 2014. 68 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ZHANG, B.; YANG, R.; LIU, C. Z. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v.62, p.480-483, 2008.

ZHANG, S. Z.; WANG, L. J.; LI, D.; JIAO, S. S.; CHEN, X. D.; MAO, Z. H. Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v.62, n.1, p.192-198, 2008.

ZHANG, Y.; FU, Q.; ZANG, L.; CHENG, N.; JIA, M. Extraction optimization of oleanolic and ursolic acids from pomegranate (*Punica granatum L.*) flowers. **Food and Bioproducts Processing**, Londres, v. 92, n.3, p.321-327, 2014.

## **CAPÍTULO 2**

---

**Saponificação assistida por micro-ondas na extração  
de diterpenos em café arábica torrado**

## SAPONIFICAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS NA EXTRAÇÃO DE DITERPENOS EM CAFÉ ARÁBICA TORRADO

### RESUMO

A extração de caveol e cafestol, diterpenos específicos do café, envolve reações de saponificação. Esta etapa é determinante para a qualidade da extração porque, durante a hidrólise, os diterpenos ficam suscetíveis a mudanças estruturais. A saponificação assistida por irradiação de micro-ondas tem sido empregada com sucesso para diferentes matrizes, mas o uso para diterpenos não é reportado. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da saponificação em reator de micro-ondas na extração de diterpenos em café torrado. Empregou-se planejamento fatorial  $3^2$  variando-se temperatura (70, 80 e 90°C) e tempo (4, 8, 12 min) de processo. A quantificação dos diterpenos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência e os resultados foram comparados com os obtidos por método de referência, que utiliza saponificação em banho. A temperatura e o tempo de processo tiveram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre o teor de diterpenos, sendo recomendada para saponificação conjunta de caveol e cafestol a reação a 80°C durante 12 min. Comparativamente à saponificação em banho, o uso de micro-ondas apresentou rendimentos para caveol (24%) e cafestol (35%) menores, mas permitiu redução expressiva do tempo de reação (80% comparado ao método de referência), com bom controle das condições de processo, e possibilidade de ampliação de escala.

**Palavras chaves:** caveol, cafestol, reator de micro-ondas, *Coffea arabica*.

### 1. INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais populares do mundo e a produção e comercialização do grão representa uma atividade econômica importante para muitos países, incluindo o Brasil, o qual é o maior produtor mundial de café e o segundo maior consumidor (ICO, 2017). As espécies de café mais importantes comercialmente são o *Coffea canephora* e o *Coffea arabica* L. No Brasil, o café arábica representa 80% da produção total de café (CONAB, 2017).

Os lipídios são um dos principais componentes do café e estão relacionados com a qualidade e as propriedades funcionais da bebida (HIGDON, FREI, 2006; BUTT, SULTAN, 2011; TOCI et al., 2013). Benefícios à saúde decorrentes do consumo moderado de café, como a redução da incidência de doenças crônico-degenerativas, têm sido reportados, assim como a correlação do consumo da bebida com a redução da taxa de mortalidade (FREEDMAN et al., 2012; DING et al., 2015).

A fração lipídica do café é composta principalmente por triacilgliceróis, esteróis e quantidades significativas de diterpenos da família caurano. O caveol e cafestol, principais representantes dos diterpenos no café, correspondem a 20% dos lipídios no grão e podem ser encontrados forma livre ou esterificados com diferentes ácidos graxos, sendo a segunda a mais abundante (PETTIT, 1987; SPEER; KOLLING-SPEER, 2006; GEORGE, RAMALAKSHMI, RAO, 2008).

Diterpenos têm sido citados como bioativos de interesse pela reconhecida capacidade antioxidante, e propriedades anticarcinogênicas e anti-inflamatórias (CAVIN et al., 2002; CROZIER et al., 2014; GAASCHT, DICATO, DIEDERICH, 2015). Considerando a dificuldade de síntese desses compostos, a restrita disponibilidade de compra e o alto preço dos padrões comerciais, a extração de diterpenos a partir de café torrado é uma opção válida (GUERCIA et al., 2016).

Como a maior proporção dos diterpenos em café está na forma esterificada, para a extração do caveol e cafestol é necessário que ocorra uma etapa de hidrólise, como saponificação ou metanólise para a obtenção dos diterpenos livres (OIGMAN et al., 2012; BENASSI, DIAS, 2015). Caveol e cafestol apresentam sensibilidade a ácidos, bases e oxidantes, que está relacionada à presença do anel furano (BENGIS, ANDERSON, 1932; COREY et al., 1987). O controle da etapa de saponificação é muito importante, uma vez que durante a hidrólise os compostos ficam susceptíveis à mudanças na estrutura (SPEER, KÖLLINGSPEER, 2006; TSUKUI et al., 2014), assim, condições de estresse como variações de temperatura devem ser evitadas (OIGMAN et al., 2012).

A literatura reporta duas abordagens para separação de diterpenos em café: extração prévia dos lipídios seguida de saponificação (PETITT, 1987; KOLLING-SPEER, STROHSCHNEIDER, SPEER, 1999; SCHARNHOP, WINTERHALTER, 2009; ZHANG, LINFORTH, FISK, 2012) ou metanólise (OIGMAN, et al., 2012; TSUKUI et al., 2014), com posterior separação dos compostos ou saponificação direta seguida de separação com solvente orgânico (URGERT et al., 1995; ROSS et al., 1997; DIAS et al., 2010; ACEVEDO et al., 2013; DIAS et al., 2013; BARBOSA et al., 2014; MORI et al., 2016). Dias et al. (2013), estudando extração de diterpenos de café, reportaram uma maior eficiência da saponificação à quente (em banho à 80 °C, 1 h) comparativamente a saponificação à frio e a extração (Soxhlet ou Bligh & Dyer) seguida de saponificação à quente.

O emprego de aquecimento em banho apresenta limitações quando se considera o interesse em adaptar procedimentos de um método analítico (DIAS et al., 2010) para uma extração em maior escala com posterior isolamento de compostos de interesse. Nos métodos que utilizam saponificação, o tempo da reação varia de 1 a 4 h, o que torna o processo exaustivo e limitado. Uma ampliação da proporção (amostra/solvente) aumentaria ainda mais o tempo da reação de saponificação e restringiria a utilização do aquecimento convencional, devido às zonas irregulares de aquecimento que são formadas durante a transferência de calor por condução e convecção (BHATTACHARYA, BASAK, 2016).

Como alternativa aos métodos convencionais, a utilização do aquecimento por irradiação de micro-ondas tem se mostrado uma técnica promissora que pode ser utilizada para a extração de diferentes compostos (XIAO et al., 2012; UPADHYAY, RAMALAKSHMI, RAO, 2012; WANG, DING, REN, 2016). Entre as vantagens do uso de micro-ondas na promoção de reações químicas em relação ao aquecimento convencional destacam-se a redução no tempo e aumento da taxa de reação, aumento do rendimento e da seletividade e menor consumo de energia, permitindo realizar transformações mais seguras, com menor produção de resíduos e em um maior número de amostras (SA et al., 2010; ZHOU et al., 2016).

Não há informações na literatura sobre o uso da energia de micro-ondas para promover a reação de saponificação em diterpenos. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos dos parâmetros de tempo e temperatura na saponificação assistida por micro-ondas para extração de caveol e cafestol em café torrado. A eficiência do processo de saponificação em micro-ondas foi verificada através do teor de caveol e cafestol extraído. Após a definição da melhor condição de processo, os resultados foram comparados aos obtidos utilizando como referência o método de saponificação em banho térmico (DIAS et al., 2010).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

A proposta de metodologia de saponificação em micro-ondas foi baseada e adaptada do método estabelecido por Dias et al. (2010), que consiste na saponificação direta à quente da fração lipídica do café em banho à 80 °C por 1h, seguida da separação da matéria insaponificável e quantificação dos diterpenos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## 2.1 REAGENTES E PADRÕES

Para a etapa de saponificação utilizou-se hidróxido de potássio (KOH) 85 % (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e etanol P.A. (Impex, Varginha, Minas Gerais, Brasil). Para a separação dos compostos e análise cromatográfica foram empregados terc-butil metil éter 99,5% (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha), acetonitrila grau HPLC (Panreac, Barcelona, Espanha), padrões analíticos de caveol e cafestol (Axxora, San Diego, EUA) certificados pela Alexis Biochemicals (Lausen, Suíça) e água purificada (Sistema de purificação Milli-Q®, Millipore, Billerica, EUA).

## 2.2 MATERIAL

Utilizou-se café arábica torrado comercial, em grão (Spresso Melitta, Avaré, São Paulo). A amostra foi caracterizada quanto à granulometria e umidade. O café foi moído em moedor (moinho Krups GVX 2, China) até a granulometria de 16 mesh. A umidade ( $4,95 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ) foi determinada em equipamento de infravermelho (OHAUS, Parsippany, EUA) à  $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 7 min (DIAS et al., 2010) e o resultado obtido foi utilizado para os cálculos do teor de caveol e cafestol em base seca.

## 2.3 MÉTODOS

### 2.3.1 Reação de saponificação assistida por micro-ondas

A reação foi realizada em equipamento de micro-ondas (Ethos One, Milestone, Itália), sob agitação fixa, em potência 700 W até atingir a temperatura desejada. O perfil de aquecimento constituiu de uma rampa de aquecimento linear durante 2 min, seguido do tempo de reação estipulado pelo planejamento fatorial (Item 2.4), e de um tempo de exaustão de 2 min, no qual o interior do equipamento atingiu  $65 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . O equipamento de micro-ondas foi operado no modo de controle de temperatura monitorado por sensor infravermelho.

Em frasco teflon, 10 mL de hidróxido de potássio ( $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) em etanol (96%) foram adicionados à 1,0 g de café torrado e moído. Optou-se por manter a proporção original de 1:10 (m/v), utilizada por Dias et al. (2010), mas ampliando-se a escala em cinco vezes.

Para saponificação em banho, 200 mg de amostra e 2 mL de hidróxido de potássio ( $2,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) em etanol (96%) foram submetidos ao aquecimento ( $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) em banho termostaticado (MA 127/BO, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) durante 1 hora (DIAS et al., 2010).

### 2.3.2 Extração dos diterpenos e análise cromatográfica

A extração e análise foram realizadas conforme Dias et al. (2010). Adaptou-se os volumes de solvente devido a ampliação de 5 vezes na escala. Após saponificação em micro-ondas, as amostras foram transferidas para tubos de centrífuga e adicionou-se 10 mL água destilada e 10 mL de terc-butil metil éter para a extração da fração insaponificável. Nas amostras saponificadas em banho, seguiu-se o mesmo procedimento, somente alterando o volume de 10 mL dos solventes, para 2 mL. Em seguida, as amostras foram agitadas e centrifugadas (2 min a 3000 rpm) (Sovall SS-3, Ivan Sorval, Nova Iorque, EUA), e para a coleta da fase orgânica, o processo de adição de solvente orgânico e centrifugação foi repetido três vezes. Após limpeza da fração insaponificável com água destilada (10 mL) o extrato orgânico foi coletado e o solvente evaporado em banho termostaticado a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  (MA 127/BO, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil). O extrato foi ressuscitado em fase móvel, filtrado em membrana de PVDF Millex®  $0,22 \text{ } \mu\text{m}$  (Millipore, São Paulo, Brasil) e acondicionado em tubos *vials*.

Para quantificação dos diterpenos, utilizou-se Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japão), com bomba com gerenciador de solvente quaternário e degaseificador (DGU 20 As), auto amostrador (SIL20HT), válvula injetora (LC20AT) com alça de amostragem, forno para coluna (CTO 20A), detector UV/Vis (SPDM20A), interface e sistema de dados controlado pelo software *LC solution*. A análise cromatográfica foi adaptada de Dias et al. (2010). Utilizou-se uma coluna Kinetex  $2,6 \text{ } \mu\text{m}$  C18 (150 mm x 4,6 mm) (*Phenomenex*, Torrance, EUA), eluição isocrática com fase móvel na proporção de 60:40 de água e acetonitrila, vazão de  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ , volume de injeção de  $0,400 \text{ } \mu\text{L}$  e detecção a 230 nm (cafestol) e 290 nm (caveol). A temperatura da coluna foi mantida a  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  e o tempo de corrida foi 30 min. A injeção dos extratos foi feita em triplicata e a identificação dos compostos foi realizada com base nos tempos de retenção dos padrões e espectro no UV/Vis. A quantificação foi feita por padronização externa utilizando padrões comerciais,

construindo-se curvas analíticas de 7 pontos, em triplicata, na faixa de 30 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ( $r \geq 0,99$ ,  $p < 0,001$ ). O teor dos diterpenos foi expresso em base seca (bs).

#### 2.4 Delineamento experimental e análise dos resultados

Para a etapa de saponificação em micro-ondas, utilizou-se como delineamento experimental um planejamento fatorial completo  $3^2$ , totalizando 9 ensaios (Tabela 1), que foram conduzidos de forma aleatória. As extrações foram realizadas em triplicata. Como variáveis independentes foram estudados temperatura ( $X_1$ ) e tempo ( $X_2$ ), e, como variáveis dependentes ( $y$ ), o teor de caveol e cafestol. Os níveis escolhidos para tempo de reação (4, 8 e 12 min) foram baseados na literatura (TSUKUI et al., 2014; PINEIRO-AVILA, LA GUARDIA, SALVADOR, 1998; UQUICHE, JERÉZ, ORTIZ, 2008) e, para temperatura (70, 80 e 90 °C), definiu-se como ponto central (80 °C), proposto na metodologia original (DIAS et al., 2010).

Os resultados obtidos pelo planejamento foram analisados utilizando o software Statistica™ Version 7 (Statsoft, Tulsa, EUA), gerando um modelo polinomial de segunda ordem (Equação 1).

$$y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{12}X_1X_2 + B_1B_{22}X_1X_2^2 + B_{11}B_2X_1^2X_2 + B_{11}B_{22}X_1^2X_2^2 \quad \text{Eq.1}$$

Onde  $B_0$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ , correspondem aos coeficientes de regressão linear,  $B_{11}$ ,  $B_{22}$ , os coeficientes de regressão quadrática,  $B_{12}$ , a interação entre os coeficientes lineares do modelo, e  $B_1B_{22}$  e  $B_{11}B_2$  as interações entre termos lineares e  $B_{11}B_{22}$ , as interações entre termos quadráticos.

Os efeitos lineares e quadráticos dos fatores e suas interações foram estudados para cada composto, utilizando de análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de confiança. A função desejabilidade foi empregada para maximizar conjuntamente os teores dos diterpenos.

Após a definição da melhor condição de saponificação em micro-ondas, o teor de caveol e cafestol foi comparado com os obtidos por saponificação em banho utilizando o método de referência (DIAS et al., 2010). Para complementar a informação sobre a influência do tempo para a saponificação, realizou-se um estudo do perfil do teor de diterpenos obtidos na melhor temperatura de saponificação em

função do tempo de reação. Para a etapa utilizando-se micro-ondas, empregaram-se os tempos de 4, 8, 12, 16, 20 e 24 min, e para o banho convencional, de 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 min.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de caveol e cafestol obtidos no delineamento experimental por obtidos por CLAE após saponificação em micro-ondas variaram na faixa de 314 a 474 mg 100 g<sup>-1</sup> e de 250 a 373 mg 100 g<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 1). Para a saponificação conduzida em banho, utilizada como método de referência, foi obtido teor de caveol de 629 mg 100 g<sup>-1</sup> e de cafestol de 582 mg 100 g<sup>-1</sup>; esses valores se encontram na faixa descrita na literatura para café arábica brasileiro (BENASSI, DIAS, 2015, CAMPANHA, DIAS, BENASSI, 2010; KIZTBERGER et al., 2013a; KIZTBERGER et al., 2014).

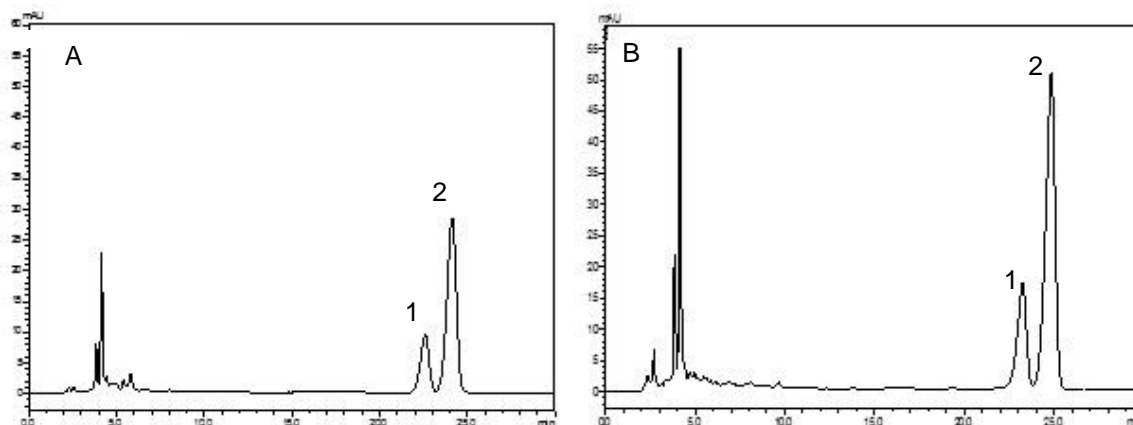
**Tabela 1-** Teores de caveol e cafestol em café arábica torrado obtidos por CLAE após saponificação em micro-ondas conforme delineamento fatorial completo 3<sup>2</sup>.

Ensaio	Variáveis		Caveol (mg 100 g <sup>-1</sup> )	Cafestol (mg 100 g <sup>-1</sup> )
	Temperatura (°C)	Tempo (min)		
1	70	4	314 ± 9	250 ± 7
2	70	8	362 ± 8	287 ± 5
3	70	12	364 ± 14	304 ± 4
4	80	4	393 ± 12	311 ± 6
5	80	8	388 ± 5	310 ± 5
6	80	12	474 ± 16	373 ± 14
7	90	4	352 ± 6	277 ± 5
8	90	8	407 ± 9	301 ± 11
9	90	12	333 ± 10	261 ± 8

Média ± desvio padrão (3 repetições de processo)

Cromatogramas correspondentes à saponificação em micro-ondas e em banho estão na Figura 1, mostrando um perfil similar para o extrato final obtido pelos dois processos.

**Figura 1-** Cromatogramas dos diterpenos, caveol e cafestol, em café arábica torrado obtidos após a saponificação em micro-ondas (80°C/12 min) (A) e em banho (80°C/60 min) (B). Detecção: 230 nm. Picos: caveol (1) e cafestol (2).



Pela tabela de efeitos (Tabela 2), observa-se que a temperatura e o tempo são parâmetros importantes, mas a influência é diferente para cada composto. As tabelas de ANOVA correspondentes estão disponíveis no Material Suplementar (Tabelas 3S e 4S).

**Tabela 2-** Efeitos das variáveis temperatura ( $X_1$ ) e tempo ( $X_2$ ) na saponificação por micro-ondas para obtenção de caveol e cafestol em café arábica torrado.

Fatores	Caveol		Cafestol	
	Efeito	p- valor	Efeito	p- valor
Média	385,9	<0,001	300,8	<0,001
Temperatura (L)	44,73	<0,001	n.s	>0,05
Temperatura (Q)	n.s	>0,05	-25,72	0,079
Tempo (L)	81,16	<0,001	55,81	<0,001
Tempo (Q)	95,27	<0,001	89,90	<0,001
Temperatura (L)*Tempo (L)	-34,26	0,005	-33,33	<0,001
Temperatura (L)*Tempo (Q)	-41,62	<0,001	n.s	>0,05
Temperatura (Q)*Tempo (L)	-65,60	<0,001	-38,17	0,003
Temperatura (Q)*Tempo (Q)	-185,58	<0,001	-140,62	<0,001

n.s: não significativo ao nível de 95% de confiança (p-valor >0,05) (L): termo linear (Q): termo quadrático

Com base nos fatores significativos ( $p < 0,05$ ) gerou-se o modelo matemático que descreve o efeito das variáveis temperatura ( $X_1$ ) e tempo ( $X_2$ ) da reação de saponificação em micro-ondas nos teores de caveol e cafestol (Equações 2 e 3). Obtiveram-se coeficientes de determinação ( $R^2$ ) de 0,94 para caveol e 0,91

para caveol, indicando a boa qualidade dos dois modelos (94% e 91% das variações das respostas podem ser explicadas, respectivamente).

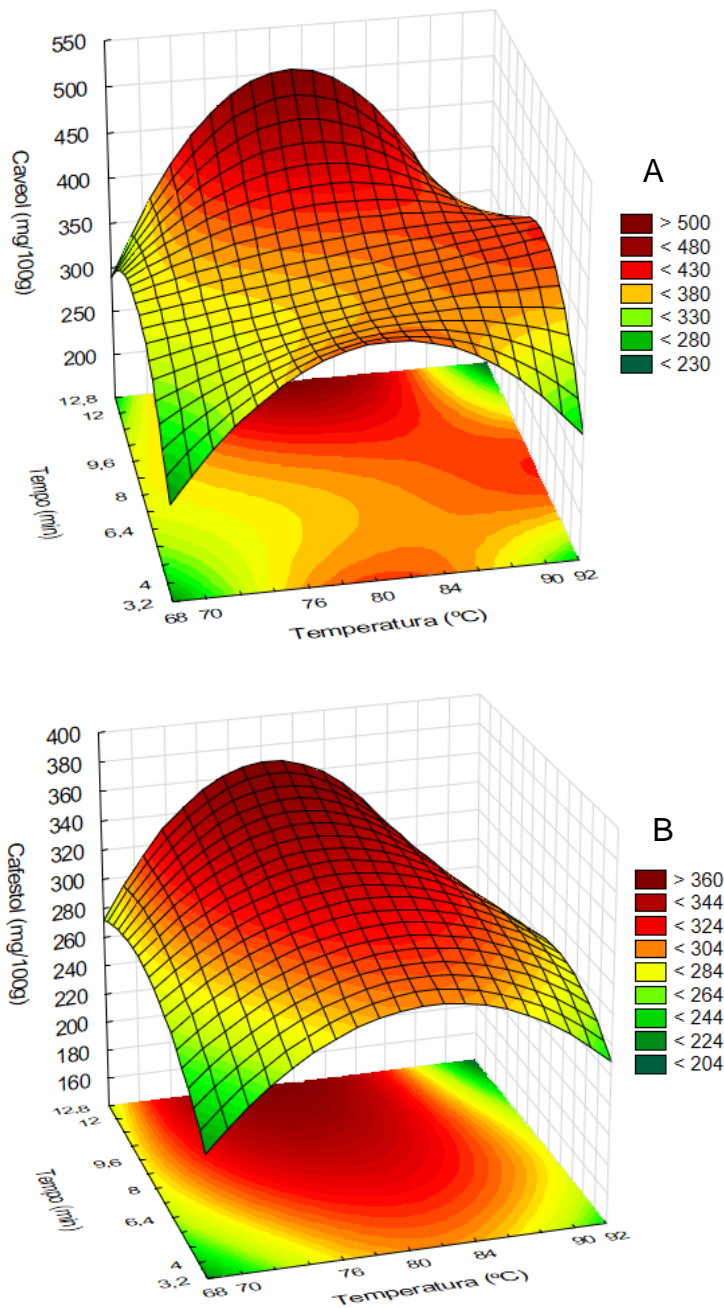
$$\begin{aligned} \text{Caveol} = & 385,9 + 22,36X_1 + 40,57X_2 + 47,63X_2^2 - 17,13X_1X_2 - 20,80X_1X_2^2 \\ & - 32,75X_1^2X_2 - 92,80X_1^2X_2^2 \end{aligned} \quad \text{Eq.2}$$

$$\text{Cafestol} = 300,8 + 27,9X_2 + 44,95 X_2^2 - 16,7X_1X_2 - 19,08X_1^2X_2 - 70,31 X_1^2X_2^2 \quad \text{Eq.3}$$

Para o caveol, constatou-se que a temperatura (termo linear) e o tempo (termo linear e quadrático) exerceram efeito positivo; para o cafestol, o tempo (termo linear) também apresentou efeito positivo ( $p < 0,05$ ), porém a temperatura não teve efeito significativo ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2, Eq. 2 e 3). As demais interações para ambos os compostos apresentaram efeito negativo, o que sugere a presença de uma faixa satisfatória de estudo, na qual se atinge o máximo do teor de caveol e cafestol seguido da redução, devido a formação de pontos de inflexão (Tabela 2, Eq. 2 e 3, Figura 2). Esse comportamento demonstra que o tempo e temperatura são parâmetros importantes na reação de saponificação e que as interações entre eles são limitantes no processo.

Para o caveol e cafestol pode-se observar que a região ótima de saponificação (Figuras 2A e 2B) foi obtida na região próxima ao tempo no nível superior (12 min) e temperatura próxima ao ponto central (80 °C). Para cafestol a temperatura de 80 °C foi a melhor, independentemente do tempo de processo, para caveol, em tempos mais baixos próximos do ponto central, haveria necessidade de temperaturas mais altas.

**Figura 2-** Superfícies de resposta para teores de caveol (A) e cafestol (B) obtidos por saponificação em micro-ondas sob diferentes condições de temperatura e tempo.



Para os dois compostos, observou-se efeito positivo do aumento da temperatura até 80 °C. Em temperaturas mais elevadas há diminuição da tensão superficial e da viscosidade do solvente, o que facilita a penetração do solvente na matriz, e favorece o rompimento celular, permitindo que os compostos fiquem mais disponíveis para extração (LI et al. 2010). Com o uso de temperaturas menores que 80°C, mesmo por tempos prolongados, não foi observada a mesma eficiência,

indicando que estas condições provavelmente não são suficientes para saponificar os ésteres de ácidos graxos diterpênicos.

No entanto, em temperaturas superiores a 80 °C também não observou-se bons resultados, com redução do rendimento dos dois diterpenos. Embora os diterpenos tenham relativa estabilidade até mesmo a processos agressivos como o de torra (DIAS et al., 2014), durante a reação de saponificação estes compostos ficam mais suscetíveis a mudanças na estrutura, podendo ser degradados (TSUKUI et al., 2014). Além disto, Chartier et al. (2013) descrevem que hidrólise é uma etapa crítica devido à sensibilidade do radical furano, e que esta sensibilidade está relacionada aos processos de aquecimento normalmente usados para obter os diterpenos.

O método de saponificação a quente desenvolvido por Dias et al. (2010) foi baseado no trabalho de Urgert et al. (1995), que propôs a saponificação de café torrado a 80°C durante uma hora, porém a relação entre a reação de saponificação e a temperatura específica de 80 °C não é reportada. Chartier et al. (2013), verificaram que a melhor condição de transesterificação para obtenção de caveol e cafestol em óleo de café arábica verde ocorreu na temperatura de 70 °C. Oigman et al. (2012), descrevem que para obtenção dos diterpenos em óleo de café arábica verde por reação de metanólise por micro-ondas, a melhor temperatura foi de 100 °C. Desta forma verifica-se que, para a separação dos diterpenos dos ésteres de ácidos graxos, a temperatura ótima depende do tipo de reação e do tipo de processo utilizado.

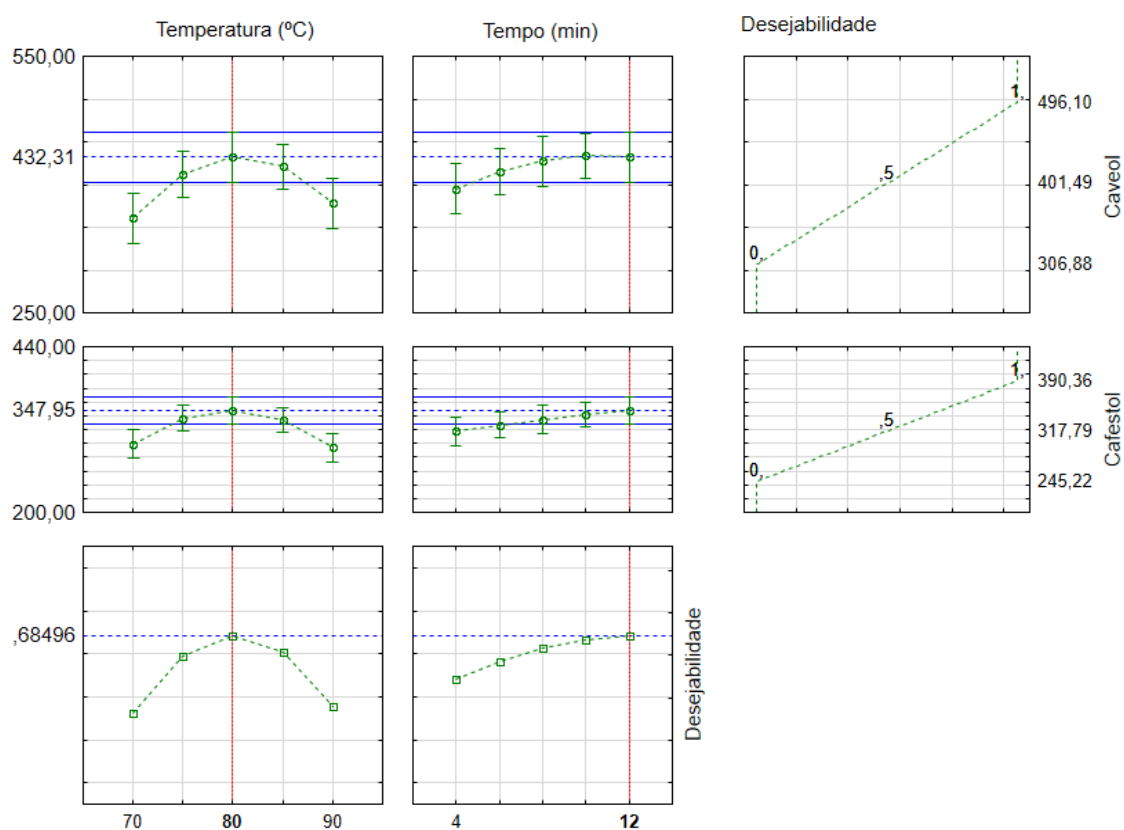
Observa-se que variações na temperatura foram mais significativas para o caveol que para o cafestol. Essa sensibilidade pode ser atribuída a diferenças na estrutura dos compostos; a maior sensibilidade do caveol tem sido descrita na literatura. Oigman et al. (2012) e Chartier et al. (2013) reportam que em reações de transesterificação, dependendo das condições, ambos os diterpenos são afetados, porém o impacto no caveol é maior do que no cafestol.

O cromatograma correspondente à saponificação a 80 °C em micro-ondas (Figura 1) mostra perfil similar ao obtido por saponificação em banho a mesma temperatura. Apesar da maior velocidade no processo de aquecimento no micro-ondas, não foram observados picos de interferentes/produtos de degradação. Oigman et al. (2012) e Tsukui et al. (2014) na extração de diterpenos por metanólise e Liu et al. (2012) na extração de trigonelina, ácido nicotínico e cafeína em café arábica

também não observaram formação de interferentes nas amostras submetidas a irradiação por micro-ondas.

Considerando o interesse em maximizar a extração conjunta dos diterpenos, gerou-se os gráficos de desejabilidade, os quais mostram que a melhor condição de saponificação ocorreu em 80 °C durante 12 min (Figura 3). Nessa condição, foram obtidos teores de caveol e cafestol de  $474 \pm 16$  e  $373 \pm 14$  mg  $100 \text{ g}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 1). Através do valor da desejabilidade global (0,68) dos perfis de tempo e temperatura, verificou-se que a temperatura estava maximizada, mas que a ampliação da faixa de estudo para a variável tempo seria um caminho interessante para o aumento no conteúdo de diterpenos (Figura 3).

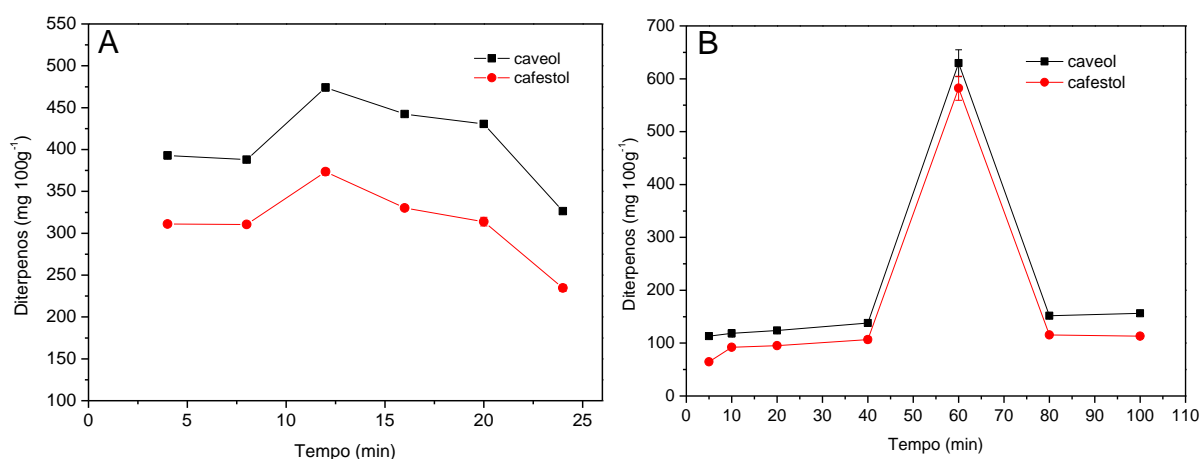
**Figura 3-** Desejabilidade para caveol e cafestol obtidos por saponificação em micro-ondas e determinados por CLAE.



Para isto estudou-se o perfil de saponificação em micro-ondas para cada composto (Figura 4A), fixando-se a temperatura da reação em 80°C e variando-se o tempo de 4 até 24 min. Para comparação, também foi estudada a cinética, na mesma temperatura, em banho térmico, variando-se o tempo de 5 a 100 min (Figura

4B). Observou-se comportamento similar para os dois compostos, tanto no tratamento por micro-ondas quanto no banho convencional.

**Figura 4-** Perfil da concentração de caveol e cafestol obtidos por saponificação em micro-ondas (A) e em banho térmico (B) à 80°C em função do tempo de reação.



O uso de tempos superiores a 12 min não foi eficiente para a saponificação em micro-ondas, havendo decréscimo no teor dos dois diterpenos em tempos mais prolongados. Em processos extrativos, durante o aquecimento por micro-ondas, devido a temperatura e a pressão altamente localizadas, há a migração seletiva de compostos a uma taxa mais rápida (UPADHYAY, RAMALAKSHMI, RAO, 2012; SPIGNO, FAVERI, 2009), porém, embora as ondas eletromagnéticas sejam distribuídas uniformemente, em função do aumento da temperatura reacional pode ocorrer ainda o fenômeno de *hot spots* (HOZ, DÍAZ-ORTIZ, MORENO, 2005; HORIKOSHI et al., 2011). Este fenômeno consiste na formação de zonas irregulares de aquecimento, que podem estar relacionadas com a degradação dos compostos. Chen, Xie e Gong (2007) observaram que, mesmo em temperaturas fixas, tempos mais prolongados de irradiação das micro-ondas provocaram a degradação de saponinas.

Comparando-se o perfil cinético da reação de saponificação em micro-ondas e da conduzida em banho térmico (Figura 4B), verificou-se que em ambos os casos há um aumento até o tempo ótimo de reação (12 min para micro-ondas, 60 min para banho), seguido da redução nos teores de diterpenos. O tempo de processo foi mais importante no banho térmico, observando-se que o tempo ótimo (60 min) corrobora com o preconizado por Dias et al. (2010).

Com relação à eficiência do processo, menores teores de caveol e cafestol foram obtidos pela reação de saponificação em micro-ondas (24% e 35%, respectivamente) comparados ao método de saponificação em banho. Esse menor rendimento, notadamente do cafestol, poderia estar associado a uma menor eficiência no processo de saponificação ou à degradação térmica dos compostos

Destaca-se, no entanto, que houve redução significativa do tempo (1/5 do convencional), e que o processo em micro-ondas permitiu uma ampliação expressiva de escala (5 vezes). Segundo Zhou et al. (2016) reações químicas conduzidas em micro-ondas ocorrem mais rapidamente devido à redução da energia de ativação da reação. Souza, Mariutti e Bragagnolo (2016) também descrevem que na saponificação por micro-ondas, para obtenção de colesterol e óxidos de colesterol em camarão, houve redução do tempo (75%) em relação ao método de saponificação a frio.

#### **4. CONCLUSÃO**

A temperatura e o tempo de saponificação influenciaram significativamente o teor de diterpenos extraídos. A melhor condição para reação de saponificação em micro-ondas, para obtenção de caveol e cafestol, ocorreu a 80 °C durante 12 min.

Utilizando a saponificação em micro-ondas obteve-se menor rendimento dos diterpenos, mas houve a redução expressiva do tempo de processo em comparação com à reação conduzida em banho térmico, e também foi possível a ampliação de escala. Desta forma, o procedimento desenvolvido pode ser usado para facilitar e agilizar a extração de caveol e cafestol em café arábica torrado, já que acelera à reação de saponificação. A técnica irradiação de micro-ondas foi aplicada com sucesso podendo ser considerada uma alternativa interessante para extração dos diterpenos.

## REFERENCIAS

- ACEVEDO, F.; RUBILAR, M.; SCHEUERMANN, M.; CANCINO, B.; UQUICHE, E.; GARCÉS, M.; INOSTROZA, K.; SHENE, C. Spent coffee grounds as a renewable source of bioactive compounds. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, Valencia, v.7, n.20, p.1-9, 2013.
- BARBOSA, H. M.A.; MELO, M. M.R.; COIMBRA, M. A.; PASSOS, C. P.; SILVA, C. M. Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 85, p. 165-172, 2014.
- BENGIS, R.; ANDERSON, R.J. The chemistry of the coffee-bean. I- Concerning the unsaponifiable matter of the coffee-bean oil: Preparation and properties of kahweol. **The Journal of Biological Chemistry**. Maryland, v.97, n.1, p.99-113, 1982.
- BENASSI, M.T.; DIAS, R. C. E. Assay of kahweol and cafestol in coffee. In: PREEDY, V. R. **Coffee in health and disease prevention**. 1. Ed. Londres: Elsevier, 2015, p.993-1004.
- BHATTACHARYA, M.; BASAK, T. A review on the susceptor assisted microwave processing of materials. **Energy**, Oxford, v.97, p. 306-338, 2016.
- BUTT, M. S.; SULTAN, T. Coffee and its consumption: Benefits and risks. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.51, n.4, p.363-373, 2011.
- CAMPANHA, F. G.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. Discrimination of coffee species using kahweol and cafestol: effects of roasting and of defects. **Coffee Science**, Lavras, v.5, n.1, p.87-96, 2010.
- CAVIN, C.; HOLZHAUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W. W.; SCHILTER, B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.40, n.1, p.1155-1163, 2002.
- CHARTIER, A.; BEAUMESNIL, M.; OLIVEIRA, A.L.; ELFAKIR, C.; BOSTYN, C. Optimization of the isolation and quantitation of kahweol and cafestol in green coffee oil. **Talanta**, Londres, v.117, n.15, p.102-111, 2013.
- CHEN, Y.; XIE, M.Y.; GONG, X.F. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. **Journal of Food Engineering**, Londres, v.81, p.162-170, 2007.
- CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de café (Safra 2017- Primeiro levantamento)**. Brasília. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_01\\_17\\_09\\_06\\_50\\_boletim\\_cafe\\_-\\_janeiro\\_de\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_01_17_09_06_50_boletim_cafe_-_janeiro_de_2017.pdf)>. Acesso em fev. 2017.
- COREY, E.J.; WESS, G.; XIANG, Y.B.; SINGH, A.K. Stereospecific total synthesis of cafestol. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.109, n.5, p. 4717-4718, 1987.

CROZIER, A.; LUDWIG, I.A.; CLIFFORD, M.N.; LEAN, M.E.J.; ASHILHARAD, H. Coffee: biochemistry and potential impact on health. **Food & Function**, Cambridge, v.5, p.1695-1717, 2014.

DIAS, R.C.E.; FARIA-MACHADO, F.A.; MERCADANTE, A.Z.; BRAGAGNOLO, N.; BENASSI, M.T. Roasting process affects the profile of diterpenes in coffee. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 239, n. 6, p. 961-970, 2014.

DIAS, R. C. E.; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.; BRAGAGNOLO.; BENASSI, M.T. Comparison of extraction methods for kahweol and cafestol analysis in roasted coffee. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.24, n.3, p.492-499, 2013.

DIAS, R. C. E.; CAMPANHA, F.G.; VIEIRA, L. G. E.; FERREIRA, L. P.; POT, D.; MARRACCINI, P.; BENASSI, M. T. Evaluation of kahweol and cafestol in coffee tissues and roasted coffee by a new high-performance liquid chromatography methodology. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, Washington, v.58, n.1, p. 88–93, 2010.

DING, M.; SATIJA, A.; BHUPATHIRAJU, S.N.; HU, Y.; SUN, Q.; HAN, J.; LOPEZ-GARCIA, E.; WILLET, W.; VAN DAM, R.M.; HU, F.B. Association of coffee consumption with total and cause-specific mortality in three large prospective cohorts. **Circulation**, Boston, v.134, n.10, p.2305-2315, 2015.

FREEDMAN, N.D.; PARK, Y.; ABNET, C.C.; HOLLENBECK, A.R.; SINHA, R. Association of coffee drinking with total and cause-specific mortality. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v.366, p.1891-1904, 2012.

GAASCHT, F.; DICARO, M.; DIEDERICH, M. Coffee provides a natural multitarget pharmacopeia against the hallmarks of cancer. **Genes & Nutrition**, New Orleans, v.10, n.6, p.1-17, 2015.

GEORGE, S. E.; RAMALAKSHMI, K.; RAO, L. J. M. A perception on health benefits of coffee. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.48, n.5, p.464-486, 2008.

GUERCIA, E.; BERTI, F.; NAVARINI, L.; DEMITRI, N.; FORZATO, C. Isolation and characterization of major diterpenes from *C. canephora* roasted coffee oil. **Tetrahedron: Asymmetry**, Oxford, v.27, n.14-15, p.649-656, 2016.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and Health: A review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.46, n.2, p. 101-112, 2006.

HORIKOSHI, S.; OSAWA, S.; ABE, M.; SERPONE, N. On the generation of hot-spots by microwave electric and magnetic fields and their impact on a microwave-assisted heterogeneous reaction in the presence of metallic Pd nanoparticles on an activated carbon support. **The Journal of Physical Chemistry**, Washington, v.115, p. 23030–23035, 2011.

HOZ, A. L.; DÍAZ-ORTIZ, A.; MORENO, A. Microwaves in organic synthesis: Thermal and non-thermal microwave effects. **Chemical Society Reviews**, Londres, v. 64, p.164-178, 2005.

ICO - International Coffee Organization. **World coffee consumption**. Disponível em: <http://www.ico.org/prices/new-consumption-table.pdf>. Acesso em fev. 2017.

KITZBERGER, C. S.G.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. Bioactive compounds content in roasted coffee from traditional and modern *Coffea arabica* cultivars grown under the same edapho-climatic conditions. **Food Research International**, Essex, v. 61, p.61-66, 2014.

KITZBERGER, C. S.G.; SCHOLZ, M. B. S.; PEREIRA, L. F.P.; BENASSI, M. T. Composição química de cafés arábica de cultivares tradicionais e modernas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.11, p.1498-1506, 2013a.

KOLLING-SPEER, I.; STROHSCHNEIDER, S.; SPEER, K. Determination of free diterpenes in green and roasted coffees. **Journal of High Resolution Chromatography**, Weinheim, v.22, n.1, p.43-44, 1999.

LI, J.; ZU, Y.G.; FU, Y.J.; YANG, Y.C.; LI, S.M.; LI, Z.N.; WINK, M. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia Bunge.*) kernel and evaluation of its antioxidant activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, v.11, n.4, p.637-643, 2010.

LIU, H.H.; SHAO, J.L.; LI, Q.; LI, Y.; YAN, H.M.; HONG, L. Determination of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in yunnan arabica coffee by microwave-assisted extraction and HPLC with two columns in series. **Journal of AOAC International**, Arlington, v.95, n.4, p.1138-1141, 2012.

MORI, A.L.B.; KALSCHENE, D.L.; FERRÃO, M.A.G.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, R.G.; BENASSI, M.T. Diterpenes in *Coffea canefora*. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.52, p.52-57, 2016.

OIGMAN, S. S.; DE SOUZA, R. O. M. A.; DOS SANTOS JÚNIOR, H. M.; HOVELL, A. M. C.; HAMERSKI, L.; REZENDE, C. M. Microwave assisted methanolysis of green coffee oil. **Food Chemistry**, Barking, v.134, n.2, p.999-1004, 2012.

PETTIT, B.C.J. Identification of the diterpene esters in Arabica and Canephora. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.35, n.4, p.594-551, 1987.

PINEIRO-AVILA, G.; LA GUARDIA, M.; SALVADOR, A. Microwave-assisted saponification of animal greases for cholesterol determination. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.371, n.2-3, p.297-303, 1998.

ROOS, B.; WEG, G. V.D.; URGERT, R.; BOVENKAMP, P.V.D.; CHARRIER, A.; KATAN, M. B. Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45 n.8, p.3065-3069, 1997.

SÁ, M.M.; MEIER, L.; DUTRA, L.G.; BISOL, T.B. Reator de micro-ondas do DQ/UFSC: Quatro anos acelerando reações, descobertas e oportunidades. **Revista Virtual da Química**, Niterói, v.2, n.3, p.165-177, 2010.

SCHARNHOP, H.; WINTERHALTER, P. Isolation of coffee diterpenes by means of high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.22, n.3, p.233-237, 2009.

SOUZA, H. A.L.; MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. Microwave assisted direct saponification for the simultaneous determination of cholesterol and cholesterol oxides in shrimp. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076016300747>. Acesso em: out. 2016.

SPEER, K.; KOLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Rio de Janeiro, v.18 n.1, p. 201–216, 2006.

SPIGNO, G.; FAVERI, D.M. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. **Journal of Food Engineering, Londres**, v.93, n.2, p. 210-217, 2009.

TOCI, A.T.; NETO, V.J.M.F.; TORRES, A.G.; FARAH, A. Changes in triacylglycerols and free fatty acids composition during storage of roasted coffee. **LWT - Food Science and Technology**, Londres, v.50, n.2, p.581-590, 2013.

TSUKUI, A.; SANTOS JUNIOS, H.M; OIGMANA, S.S; SOUZA, R.O.M.A; BIZZ, H.R; REZENDE, C.M. Microwave-assisted extraction of green coffee oil and quantification of diterpenes by HPLC. **Food Chemistry**, Barking, v.164, p.266-271, 2014.

UPADHYAY, R.; RAMALAKSHMI, K.; RAO, J.M. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans. **Food Chemistry**, Barking, v.130, p.184-188, 2012.

UQUICHE, E.; JERÉZ, M.; ORTÍZ, J. Effect of pretreatment with microwaves on mechanical extraction yield and quality of vegetable oil from Chilean hazelnuts (*Gevuina avellana Mol*). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Oxford, v. 9, n.4, p.495-500, 2008.

URGERT, R. U.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUI, T. G.; BOVERIKAMP, P.V. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.43, n.8, p.2167-2172, 1995.

WANG, H.; DING, J.; REN, N. Recent advances in microwave-assisted extraction of trace organic pollutants from food and environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.75, p.197-208, 2016.

XIAO, X.; SONG, W.; WANG, J.; LI, G. Microwave-assisted extraction performed in low temperature and in vacuo for the extraction of labile compounds in food samples. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.712, p.85-93, 2012.

ZHANG, C.; LINFORTH, R.; FISK, I.D. Cafestol extraction yield from different coffee brew mechanisms. **Food Research International**, Essex, v.49, n.1, p. 27-31, 2012.

ZHOU, J.; XU, W.; YOU, Z.; WANG, Z.; LUO, Y.; GAO, L.; YIN, C.; PENG, R.; LAN, L. A new type of power energy for accelerating chemical reactions: the nature of a

microwave-driving force for accelerating chemical reactions. **Scientific Reports**, Londres, v.6, p.1-6, 2016.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela 3S-** Análise de variância da saponificação assistida por micro-ondas para caveol.

Fatores	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F	p- valor
Temperatura (L)	3001,40	1	3001,40	16,96	0,0006
Temperatura (Q)	9880,21	1	9880,21	55,82	0,0000
Tempo (L)	8168,72	1	8168,72	46,15	0,0000
Temperatura (L)*Tempo (L)	1732,06	1	1732,06	9,79	0,0055
Temperatura (L)*Tempo (Q)	4290,71	1	4290,71	24,24	0,0001
Temperatura (Q)*Tempo (L)	34441,54	1	34441,54	194,60	0,0000
Temperatura (Q)*Tempo (Q)	3362,80	19	176,99		
Erro	56186,15	26			
Total da soma quadrática	3001,40	1	3001,40	16,96	0,0006

**Tabela 4S-** Análise de variância da saponificação assistida por micro-ondas para cafestol.

Fatores	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F	p- valor
Tempo (L)	4671,80	1	4671,80	37,44	0,0000
Temperatura (L)*Tempo (L)	7274,34	1	7274,34	58,30	0,0000
Temperatura (Q)*Tempo (L)	1456,81	1	1456,81	11,68	0,0026
Temperatura (Q)*Tempo (Q)	19774,37	1	19774,37	158,48	0,0000
Erro	2620,34	21	124,78		
Total da soma quadrática	31355,61	26			

## **CAPÍTULO 3**

---

**Efeitos da sonicação na extração de diterpenos em  
café arábica torrado**

## EFEITOS DA SONICAÇÃO NA EXTRAÇÃO DE DITERPENOS EM CAFÉ TORRADO

### RESUMO

O objetivo do trabalho foi estudar o efeito da sonicação na extração dos diterpenos, caveol e cafestol, em substituição a técnica tradicional que utiliza extração líquido: líquido. Empregou-se um planejamento composto central de face centrada ( $2^3$ ) tendo como variáveis independentes a amplitude da onda ultrassônica (41, 102, 5 e 164  $\mu\text{m}$ ), o tempo de extração (2, 4 e 6 min) e o volume de solvente (2, 4 e 6 mL). Os três parâmetros exerceram efeito significativo sobre a extração ( $p < 0,05$ ). Amplitude maiores (164  $\mu\text{m}$ ) e volume próximos ao ponto central (4 mL) aumentaram significativamente o teor de caveol e cafestol. O tempo exerceu um impacto positivo, mas diferenciado para cada composto. A melhor condição para extração conjunta dos diterpenos por sonicação ocorreu em amplitude de 164  $\mu\text{m}$ , 4 mL de solvente durante 6 min. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que o tratamento com sonificador resultou em modificação física na matriz, ocorrendo ruptura celular e destruição aos poros. O teor de caveol e cafestol obtido por sonicação foi menor ao obtido pela extração líquido/líquido (13% para caveol e 3% para cafestol), porém a sonicação mostrou um impacto positivo intensificando e acelerando a extração. De forma geral, a utilização da sonicação permitiu a simplificação do processo extrativo, reduzindo o número de etapas (duas etapas em relação método convencional), a quantidade de solvente e o tempo da análise, mostrando-se uma alternativa viável para extração acelerada de caveol e cafestol.

**Palavras chaves:** Caveol, cafestol, *Coffea arabica*, amplitude de onda, volume de solvente, extração assistida por ultrassom.

### 1. INTRODUÇÃO

As determinações químicas em alimentos geralmente exigem o preparo de amostra com emprego de etapa de extração. Riscos de segurança, alto consumo de energia e solventes, baixo rendimento, problemas com resíduos químicos, com emissão de voláteis e toxicidade são fatores considerados para avaliar a segurança prática e ambiental do método extrativo.

Nas últimas duas décadas, impulsionado pelo apelo de tecnologias mais “verdes” (*eco-friendly*) e principalmente pelas restrições das técnicas convencionais, novos processos de extração vêm sendo implementados (LUQUE DE CASTRO, PRIEGO-CAPOTE, 2007; TIWARI, 2015; CHEMAT et al., 2017). Entre as técnicas extrativas não convencionais, está a extração assistida por ultrassom (EAU). Este método destaca-se por reduzir o tempo de análise e volume de solvente e

aumentar rendimento, tornando o processo mais simples e automatizado (TIWARI, 2015; CHEMAT et al., 2017).

Na EAU, ondas sonoras de alta energia (intensidades acima de 1 W cm<sup>-2</sup> e frequências entre 20 e 500 kHz), são propagadas no meio causando rápida circulação/agitação do solvente, cisalhamento das moléculas do solvente com amostra e conseqüentemente perturbação da parede celular da matriz. A combinação destes fatores facilita a penetração do solvente, melhorando processos de difusão e transferência de massa e permitindo que compostos sejam extraídos mais rapidamente e com maior eficiência. Estes efeitos são atribuídos principalmente à cavitação acústica, que consiste na formação, crescimento e colapso de microbolhas que se formam no interior do solvente (MANSON, 1997; CHEMAT, E-HUMA, KHAN, 2011; AWAD et al., 2012). Os efeitos de cavitação dependem das condições operacionais como amplitude, frequência, intensidade, tempo de extração e solvente extrator (MANSON, LORIMER, 2002; CHEMAT et al., 2017).

O ultrassom tem sido aplicado com sucesso na extração de diferentes compostos e em diversas matrizes alimentícias, como de pectina da casca de toranja (WANG et al., 2015), de compostos fenólicos em bagaço de uva (GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2015) e em sementes de soja (CHUNG et al., 2010), de antocianinas em amora (ESPADA-BELLIDO et al., 2017), e na extração de óleos de uva (DA PORTO, PORRETO, DECORTI, 2013), pistache (HASHEMI et al., 2015) e de semente de romã (GOULA, 2013). Em café, já foi descrito a utilização na extração de cafeína (WANG et al., 2011), compostos fenólicos (AL-DHABI, PONMURUGAN, JEGANATHAN, 2017) e de óleo a partir da borra (ROCHA et al., 2014), mas não foi reportado o uso da sonicação na obtenção de diterpenos.

Caveol e cafestol, diterpenos específicos da fração lipídica do café, têm sido estudados pelas implicações de seu consumo à saúde, por apresentarem a capacidade antioxidante, anticarcinogênica e quimiopreventiva (LEE, CHOI, JEONG, 2007; HUBER et al., 2008; LEE, CHAE, SHIM, 2012; WANG et al., 2012; GAASCHT, DICATO, DIEDERICH, 2015). São compostos de alto valor comercial e de difícil obtenção. A extração é descrita como o método mais simples e adequado para obtê-los, uma vez que o caveol é bastante instável na forma livre e a síntese do cafestol é praticamente inviável (COREY et al., 1987; OIGMAN et al., 2012; CHARTIER et al., 2013; GUERCIA et al., 2016).

Usualmente, os diterpenos encontram-se na forma esterificada no grão de café (SPEER; KÖLLINGSPEER, 2006), assim para extraí-los, são necessárias etapas de saponificação e separação. Entre as metodologias analíticas para extração de caveol e cafestol, destaca-se a proposta por Dias et al. (2010) pela ampla utilização (SOUZA et al., 2010; SOUZA, BENASSI, 2012; ZHANG et al., 2012; ACEVEDO et al., 2013; KITZBERGER et al., 2014; SCHOLZ et al., 2014; BARBOSA et al., 2014; MORI et al., 2016). A técnica consiste em saponificação direta a quente, seguida de 3 etapas de separação líquido/líquido com *terc*-butil metil éter e limpeza do extrato etéreo com água.

A etapa de separação líquido/líquido é o maior limitante no processo de extração por prolongar o tempo de análise e pelo o uso relativamente alto de solvente orgânico e a necessidade de treinamento do analista para que não ocorra perda de analito durante o processo. Estes fatores são intensificados quando pretende-se realizar a extração dos diterpenos em grande quantidade e rotineiramente.

Considerando o interesse pelo desenvolvimento de tecnologias alternativas e automatização do processo de extração de diterpenos, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da sonicação na extração de caveol e cafestol em café torrado, estudando-se os parâmetros de amplitude da onda ultrassônica, tempo de extração e volume de solvente. Para avaliar a eficiência do processo, o resultado foi comparado com o obtido por método de referência (DIAS et al., 2010).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 REAGENTES E PADRÕES**

Hidróxido de potássio (KOH) 85 % (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), etanol 96% (Impex, Minas Gerais, Brasil), *terc*-butil metil éter 99,5% (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha), acetonitrila grau HPLC (Panreac, Barcelona, Espanha), padrões de caveol e cafestol (Axxora, San Diego, EUA) certificados pela Alexis Biochemicals (Lausen, Suíça), água purificada (Sistema de purificação Milli-Q®, Millipore, Billerica, EUA).

## 2.2 MATERIAL

Utilizou-se café arábica torrado comercial (Mellita®, Lote 002 SM 16:38). Os grãos foram moídos (moinho Krups GVX 2, China) até granulometria de 16 mesh. O café torrado e moído apresentou umidade de  $4,95 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ , obtida em equipamento de infravermelho (OHAUS, Parsippany, EUA) (DIAS et al., 2010). Esse valor foi utilizado para os cálculos do teor de diterpenos em base seca.

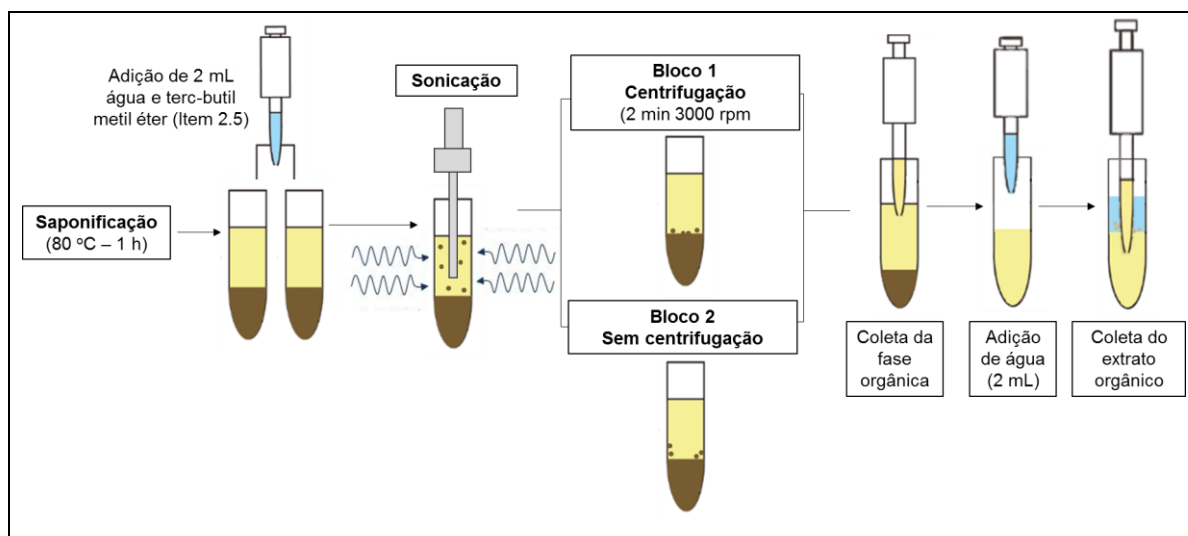
## 2.3 PROCEDIMENTOS PARA EXTRAÇÃO

Previamente à extração, as amostras (200 mg) foram submetidas à saponificação em banho (MA 127/BO, Marconi, São Paulo, Brasil) a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 1h com hidróxido de potássio ( $2,5 \text{ mol L}^{-1}$  em solução etanólica 96%) (DIAS et al., 2010).

### 2.3.1 Extração de caveol e cafestol por sonicação

A metodologia foi adaptada do método de Dias et al. (2010), substituindo-se a etapa de extração líquido/líquido pela extração por sonicação. Após saponificação, realizou-se a extração da fração insaponificável (Figura 1), adicionando-se 2 mL água destilada e o volume de terc-butil metil éter determinado pelo delineamento experimental (Item 2.5). As amostras foram agitadas e submetidas à sonicação (modelo Q700, QSONICA, Newtown, EUA) equipado com probe de ponteira sólida em titânio com 3,2 mm de diâmetro, com imersão de 2/3 do probe. Os parâmetros de amplitude da onda ultrassônica, do tempo de extração e volume de solvente foram variados conforme delineamento experimental (Item 2.5). Parte das amostras (Bloco 1) foram centrifugadas (Sovall SS-3, Ivan Sorval, Nova Iorque, EUA) durante 2 min à 3000 rpm em temperatura ambiente e foi coletada a fase orgânica. Para as amostras que não foram centrifugadas (Bloco 2), a coleta da fase orgânica foi realizada logo após sonicação. Seguiu-se com a limpeza da fração insaponificável com água destilada (2 mL). O extrato orgânico foi retirado (Figura 1) e o solvente foi evaporado em banho termostatizado a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Figura 1-** Procedimento para extração de caveol e cafestol utilizando sonificador.



### 2.3.2 Extração de caveol e cafestol pelo método convencional (líquido/líquido)

Para comparação dos resultados, após o mesmo procedimento de saponificação, utilizou-se separação líquido/líquido adicionando-se água destilada (2 mL) e terc-butil metil éter (2 mL) para extração da fração insaponificável (DIAS et al., 2010). Após agitação e centrifugação (3 min à 3000 rpm à temperatura ambiente) a fase orgânica foi retirada. Este processo foi repetido 3 vezes. Posteriormente, adicionou-se água destilada (2 mL) para limpeza do extrato o qual foi coletado e evaporado à 70 °C.

### 2.4. QUANTIFICAÇÃO DOS DITERPENOS

A análise foi realizada baseada em Dias et al. (2010) com modificações. Utilizou-se cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu, Kyoto, Japão), com bomba com gerenciador de solvente quaternário e desgaseificador (DGU 20 As), auto amostrador (SIL20HT), válvula injetora (LC20AT) com alça de amostragem, forno para coluna (CTO 20A), detector DAD UV/Vis (SPDM20A), interface e sistema de dados controlado pelo software *LC solution*.

Utilizou-se coluna Kinetex 2.6 µm C18 (50 x 4,6 mm) (*Phenomenex*, Torrance, EUA); eluição isocrática com fase móvel de 60:40 (água:acetonitrila), vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção de 400 µL; temperatura da coluna de 55 °C; e tempo de corrida de 30 min. A detecção foi feita a 230 nm para cafestol e 290 nm para caveol. Os compostos foram identificados com base nos tempos de retenção em

comparação aos padrões e espectro no UV. A quantificação foi realizada por padronização externa, na faixa de concentração de 30 a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (DIAS et al., 2010; MORI et al., 2016), com curvas analíticas com 7 pontos ( $r \geq 0,99$ ,  $p < 0,001$ ), em triplicata. Os teores dos diterpenos foram expressos em  $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$  em base seca (bs).

## 2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para investigar a influência das variáveis do processo de sonicação na extração de caveol e cafestol, utilizou-se um planejamento composto central de face centrada ( $2^3$ ), totalizando 18 pontos experimentais incluindo as repetições dos pontos centrais (Tabela 1). A ordem dos experimentos foi aleatorizada e as extrações foram realizadas em triplicata.

Três variáveis independentes foram estudadas em três níveis: amplitude da onda ultrassônica ( $X_1$ ) (41, 102, 5 e 164  $\mu\text{m}$ ), tempo de extração ( $X_2$ ) (2, 4 e 6 min) e volume de solvente ( $X_3$ ) (2, 4 e 6 mL). A amplitude de 164  $\mu\text{m}$  (equivalente a 80 % da capacidade do probe) foi definida como limite superior, uma vez que maior amplitude poderia provocar o desgaste do material e corrosão do probe. A faixa de tempo foi definida após testes preliminares e considerando também a manutenção do probe. O volume máximo e mínimo de solvente foi baseado na metodologia empregada para comparação (DIAS et al., 2010). O planejamento com face centrada escolhido permitiu trabalhar dentro desses limites operacionais.

O planejamento foi dividido em dois blocos, para verificar o efeito de um processo adicional de centrifugação na separação das fases. No Bloco 1, após sonicação, as amostras foram submetidas à centrifugação, no Bloco 2 a fase orgânica foi coletada diretamente após a sonicação (Figura 1 e Tabela 1).

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software Statistica™ Version 7 (Statsoft, Tulsa, EUA). Um modelo polinomial de segunda ordem (Equação 1) foi gerado para avaliar o rendimento ( $y$ ) em função de variáveis independentes ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) e suas interações.

$$y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{23}X_2X_3 \quad \text{Eq.1}$$

Onde  $B_0$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ , correspondem aos coeficientes de regressão linear,  $B_{11}$ ,  $B_{22}$  e  $B_{33}$  aos coeficientes de regressão quadrática,  $B_{12}$ ,  $B_{13}$  e  $B_{23}$  à interação entre os coeficientes lineares do modelo.

Os efeitos lineares e quadráticos dos fatores e as interações foram estudados para cada composto por análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de confiança. Para verificar a melhor condição para extração conjunta do caveol e cafestol utilizou-se a função desejabilidade.

O teor de caveol e cafestol foi determinado na melhor condição de extração por sonicação e comparado ao obtido pelo método de referência com extração líquido/líquido.

## 2.6 ANÁLISE DA ESTRUTURA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O resíduo da extração foi seco em estufa a 105 °C durante 1 h. Posteriormente, o material foi adicionado em fita de carbono e recoberto por uma camada de ouro, pelo processo de metalização (60 s). As imagens foram obtidas por microscópio eletrônico de varredura SHIMADZU (modelo SSX-550 SUPERSCAN, Kyoto, Japão) e utilizou-se o programa Digital Micrograph (Gatam Software Team, Pleaston, EUA) para análise das imagens e comparação entre os métodos de extração.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas extrações utilizando sonicação seguindo o delineamento experimental, foram obtidos teores na faixa de 360 a 553 mg 100 g<sup>-1</sup> para cafestol e de 221 a 563 mg 100 g<sup>-1</sup> para caveol, diterpeno para o qual se observou maior variabilidade (Tabela 1).

**Tabela 1-** Teores de caveol e cafestol (mg 100 g<sup>-1</sup>) obtidos pelo planejamento composto central de face centrada (2<sup>3</sup>) utilizando sonicação como processo de extração e CLAE para identificação e quantificação.

Ensaio	Bloco	Variáveis			Caveol	Cafestol
		Amplitude da onda ultrassônica (μm)	Tempo de extração (min)	Volume de solvente (mL)		
1	1	41	2	2	305 ± 8	365 ± 8
2	1	164	2	2	522 ± 6	366 ± 8
3	1	41	6	2	421 ± 20	494 ± 17
4	1	164	6	2	348 ± 15	451 ± 16
5	1	41	2	6	344 ± 8	390 ± 15
6	1	164	2	6	467 ± 18	492 ± 15
7	1	41	6	6	298 ± 19	360 ± 20
8	1	164	6	6	497 ± 13	493 ± 10
9	1	102,5	4	4	471 ± 15	474 ± 13
10	1	102,5	4	4	508 ± 12	505 ± 14
11	2	41	4	4	446 ± 12	487 ± 1
12	2	164	4	4	476 ± 3	509 ± 1
13	2	102,5	2	4	478 ± 19	479 ± 20
14	2	102,5	6	4	551 ± 20	550 ± 21
15	2	102,5	4	2	390 ± 8	488 ± 7
16	2	102,5	4	6	221 ± 7	378 ± 19
17	2	102,5	4	4	455 ± 9	494 ± 9
18	2	102,5	4	4	563 ± 16	553 ± 14

Média ± desvio padrão (3 repetições de processo)

**Tabela 2-** Efeitos das variáveis amplitude da onda ultrassônica (X<sub>1</sub>), tempo de extração (X<sub>2</sub>) e volume de solvente (X<sub>3</sub>) na extração de caveol e cafestol por sonicação.

Fatores	Caveol		Cafestol	
	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
Média	483	<0,001	501	<0,001
Amplitude (L)	101,00	<0,001	47,41	<0,001
Tempo (L)	n.s	>0,05	54,47	<0,001
Tempo (Q)	110,46	0,013	n.s	>0,05
Volume (Q)	-305,88	<0,001	-141,37	<0,001
Amplitude (L) * Tempo (L)	-56,02	<0,001	n.s	>0,05
Amplitude (L) * Volume (L)	n.s	>0,05	65,23	<0,001
Tempo (L) * Volume (L)	n.s	>0,05	-64,82	<0,001
Blocos	-20,75	>0,05	14,03	>0,05

n.s: não significativo ao nível de 95% de confiança (p-valor > 0,05) L: termo linear Q: termo quadrático

Os três parâmetros estudados, amplitude da onda ultrassônica (X<sub>1</sub>), tempo (X<sub>2</sub>) e volume de solvente (X<sub>3</sub>), exerceram efeitos significativos (p<0,05) na

extração dos diterpenos (Tabela 2), porém em diferentes termos. Os resultados foram ajustados para equações polinomiais de segunda ordem (Equação 2 e 3), obtendo-se coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,69 e 0,79, para caveol e cafestol, respectivamente. Não houve significância para bloco (Tabela 2), demonstrando que a etapa adicional de centrifugação não influenciou o processo de extração. A utilização da centrifugação auxilia na sedimentação de particulados, facilitando a separação da fase orgânica, no entanto é uma etapa adicional no processo, ficando assim a critério do analista seu uso.

$$\text{Caveol} = 483 + 50,50X_1 + 55,23X_2^2 - 152,94X_3^2 - 28,01X_1X_2 \quad \text{Eq.2}$$

$$\text{Cafestol} = 501 + 23,70X_1 + 27,24X_2 - 70,70X_3^2 + 32,71X_1X_3 - 32,41X_2X_3 \quad \text{Eq.3}$$

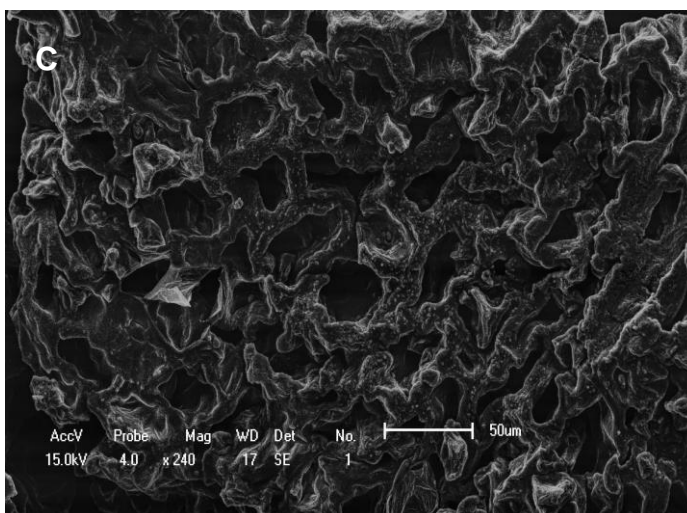
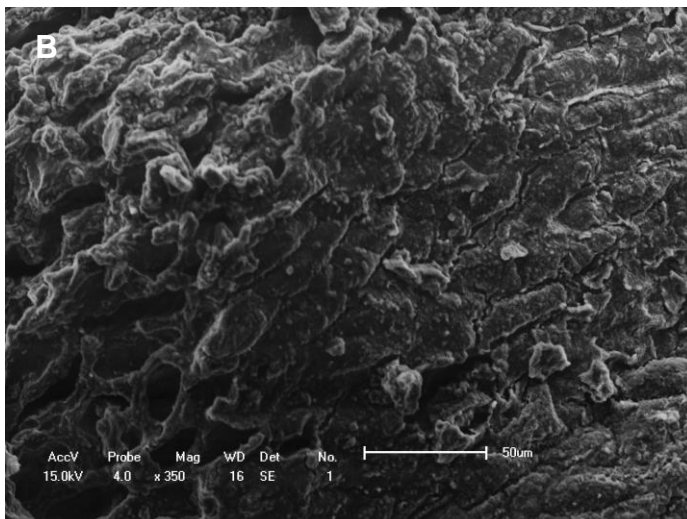
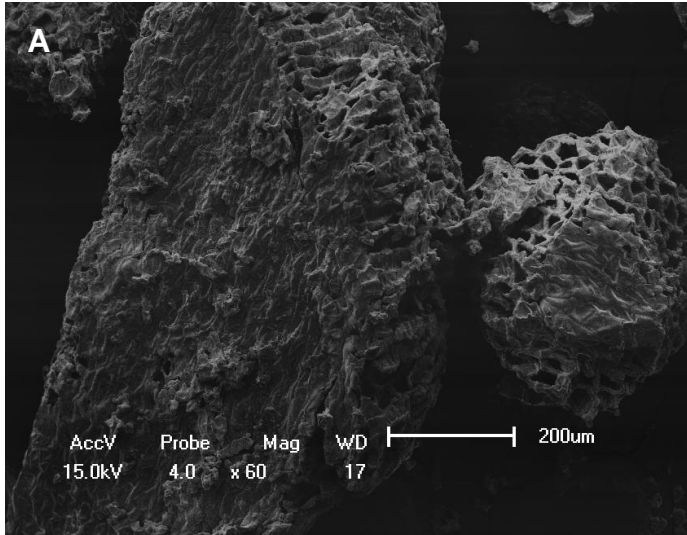
Onde  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  correspondem, respectivamente, a amplitude, tempo e volume.

Na extração do caveol e cafestol, observou-se que a amplitude (termo linear) exerceu efeito positivo, com maior influência sobre o caveol (Eq. 2 e 3 e Tabela 2). Dessa forma, dentro da faixa estudada, a utilização de maiores amplitudes contribui positivamente para a extração dos diterpenos,

A amplitude está associada ao efeito de cavitação acústica (TIWARI, 2015). Quanto maior a amplitude mais intensa é a propagação da onda no meio líquido e mais bolhas são criadas e colapsadas (ZHANG et al., 2008). Este fenômeno faz com que ocorra a ruptura celular da matriz e aumente a superfície de contato entre sólido e líquido, a difusão do solvente, e conseqüentemente a taxa de transferência de massa, facilitando o processo extrativo (SUSLICK, PRICE 1999; GOULA, 2013).

Diversos estudos reportaram que em altas potências e intensidades, as quais são proporcionais à amplitude da onda ultrassônica, ocorre o aumento do rendimento na extração, como, por exemplo, em óleos como o de canola (SICAIRE et al., 2016), soja (LI, PORDESIMO, WEISS, 2004) e semente de romã (GOULA, 2013) e de compostos específicos como carotenoides (LI et al., 2013), antocianinas e compostos fenólicos (ESPADA-BELLIDO et al., 2017), colesterol (LI, CHANG, LI, 2017). A Figura 2 mostra a estrutura do resíduo de café após a extração por sonicação (Figura 2A e 2B) e após a extração convencional (Figura 2C).

**Figura 2-** Microscopia eletrônica de varredura em amostras de café torrado após extração por sonicação (102,5  $\mu$ m, 4 min, 4mL) (A, imagem ampliada em B) e por extração líquido/líquido (C).



Na extração líquido/líquido, a superfície da matriz apresenta poros bem definidos, ao contrário do que aparece nas amostras tratadas com sonicação, nas quais a superfície porosa foi parcialmente destruída, aparecendo fissuras e poucos poros. Em alguns casos (ZHANG et al., 2008; ABDULLAH, KOC, 2013; ZHANG et al. 2014) a ruptura celular está relacionada com maior rendimento da extração. Chemat et al. (2017) descrevem que os fenômenos de cavitação ocasionam altas forças de cisalhamento ao meio, e a implosão das bolhas de cavitação na superfície do material causam diferentes efeitos físico à matéria-prima, como ruptura, fragmentação, erosão e destruição estrutural. Estes efeitos podem ocorrer isoladamente ou em sinergismo, e contribuem para o aumento da transferência de massa e da taxa de transferência de soluto, o que está associado com melhor desempenho do ultrassom em processos extrativos.

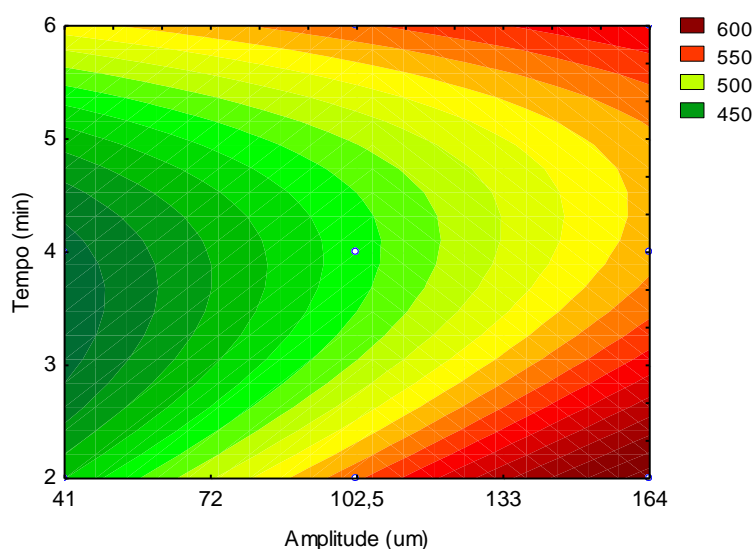
O tempo de processo também exerceu um efeito positivo ( $p < 0,05$ ) favorecendo a extração de cafeol (termo quadrático) e cafeol (termo linear) (Eq. 2 e 3, Tabela 2). Este comportamento sugere que, de forma geral na faixa estudada, tempos mais prolongados favorecem a extração dos compostos.

A técnica de ultrassom é conhecida por acelerar os processos extrativos em comparação às técnicas convencionais (FU et al., 2014; WANG et al., 2015; HELENO et al., 2016). A literatura (TOMA et al., 2001; GOULA, 2013; SAHIN, SAMH, 2013) relata que, independentemente dos analitos de interesse, a extração assistida por sonicação apresenta um tempo ótimo, o qual está associado a duas etapas principais. A primeira envolve a penetração do solvente na matriz provocando a dissolução dos componentes e a segunda, a transferência do soluto para o solvente por difusão através dos poros do material. Além disso, à medida que as ondas ultrassônicas são fornecidas para o sistema, ocorre um aumento lento, mas gradual da temperatura, devido à transferência de energia para a amostra (SANTOS, CAPELO, 2007; TIWARI, 2015). Esse o aumento da temperatura também pode facilitar a solubilidade e difusividade do solvente, acelerando a extração (ZHANG et al., 2009; GOULA, 2013).

Deve-se considerar, porém, que para cafeol, verificou-se uma interação negativa entre amplitude e tempo. Assim, para a extração específica do cafeol, é preferível o emprego de tempos menores de extração para permitir o uso de amplitudes mais elevadas, como pode ser observado na superfície de contorno (Figura 3). Ressalta-se que durante a extração, na condição de amplitude e tempo em

nível superior, observou-se aumento da temperatura do meio ( $50 \pm 5$  °C). O aumento de temperatura, conforme discutido anteriormente, pode favorecer a extração, mas também pode provocar a degradação de compostos pelo aquecimento do meio devido à exposição a maiores tempos de sonicação (SAHIN, SAMH, 2013). Considerando a maior sensibilidade térmica do caveol, atribuída à sua estrutura (KURZROCK; SPEER, 2001; OIGMAN et al., 2012), a exposição a temperaturas elevadas pode ter causado maior impacto a esse diterpeno do que ao cafestol, resultando assim em uma menor eficiência de extração.

**Figura 3-** Interação entre tempo e amplitude, com volume em ponto central (4 mL, sobre o teor de caveol extraído por sonicação e quantificação por CLAE.

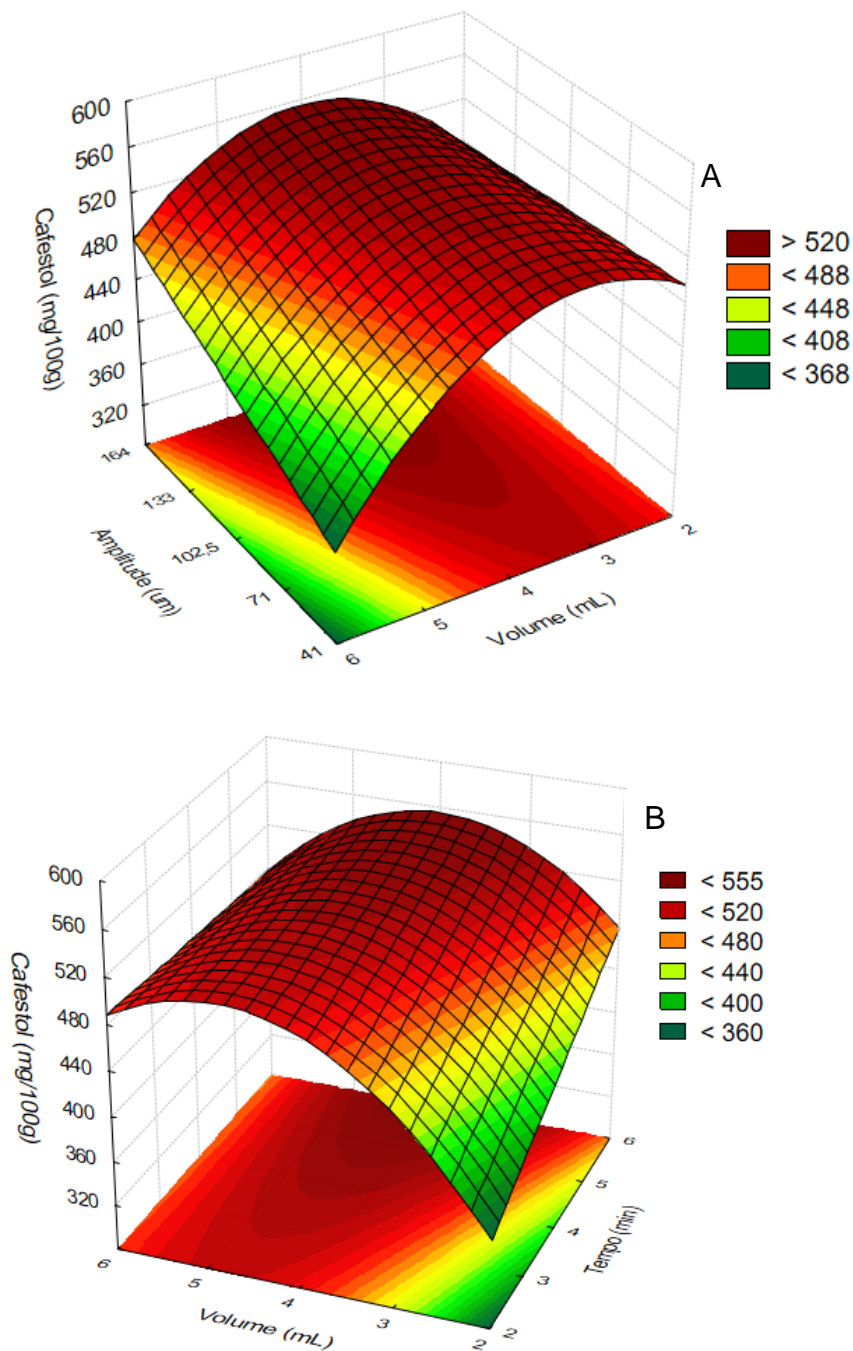


Para um composto menos sensível à temperatura, como cafestol, a utilização de maior amplitude e tempo mostrou efeito positivo na extração. No entanto, provavelmente, a extração por tempos mais prolongados não seria interessante, pois poderia ocorrer a diminuição do efeito da sonicação. À medida que a temperatura aumenta, ocorre o aumento das bolhas de cavitação, porém o efeito deste fenômeno é inibido pela pressão de vapor formada, que bloqueia o colapso das bolhas (SHAH, PANDIT, MOHOLKAR, 1999; PATIST, BATES, 2008).

Dentre as variáveis estudadas, o volume foi a que apresentou maior efeito na extração dos diterpenos (Eq. 2 e 3, Tabela 2). Verificou-se que, devido ao efeito quadrático negativo, a utilização de volumes em nível superior e inferior (6 e 2 mL) não foram adequados para extração do caveol e cafestol.

As interações do volume com o tempo e a amplitude influenciaram a extração do cafestol (Eq. 3, Tabela 2), também demonstrando que volumes próximos ao ponto central são os mais adequados.

**Figura 4** -Efeito da interação (A) amplitude e volume com tempo em nível superior (6 min) e (B) volume com tempo com amplitude em tempo superior (164  $\mu\text{m}$ ), na extração de cafestol por sonicação e quantificação por CLAE.

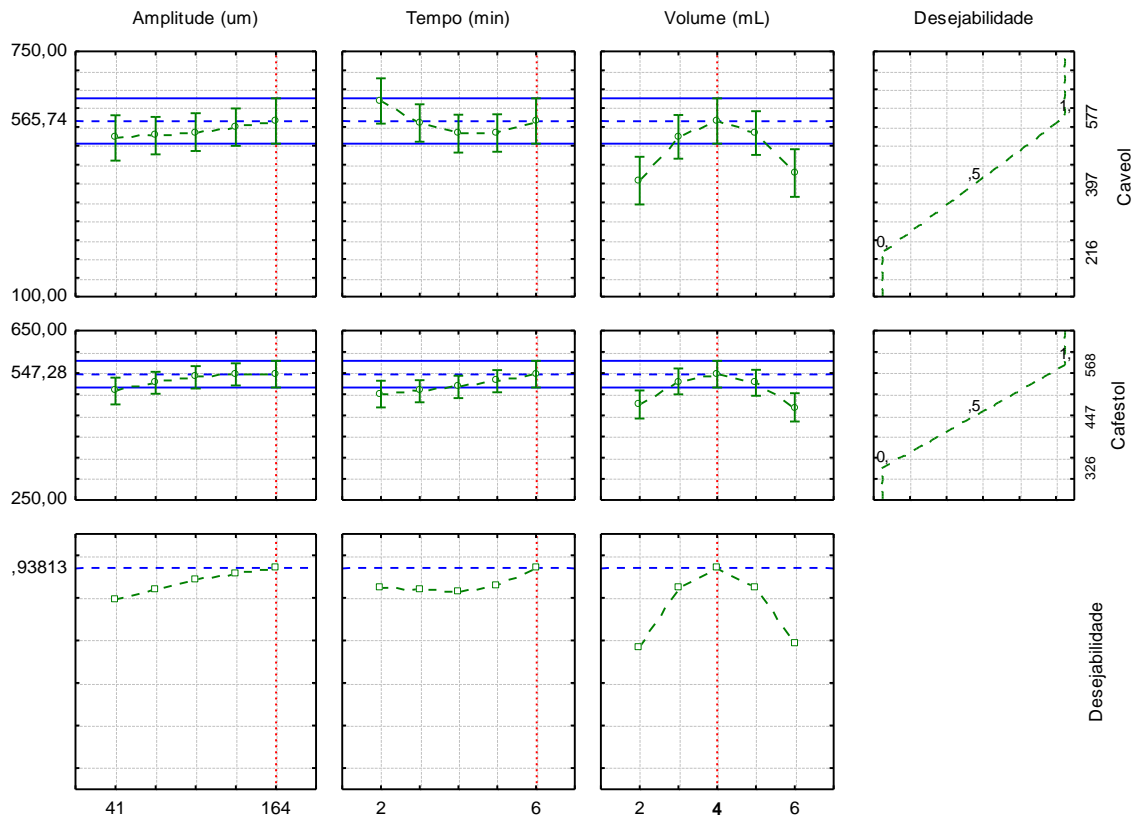


Na Figura 4A, que representa o efeito do volume e da amplitude na extração do cafestol, verifica-se que a melhor extração ocorre em amplitudes maiores e volume em ponto central. O mesmo comportamento é observado na interação entre volume e tempo (Figura 4B), sendo que as melhores condições estão em tempos mais prolongados e volumes em ponto central.

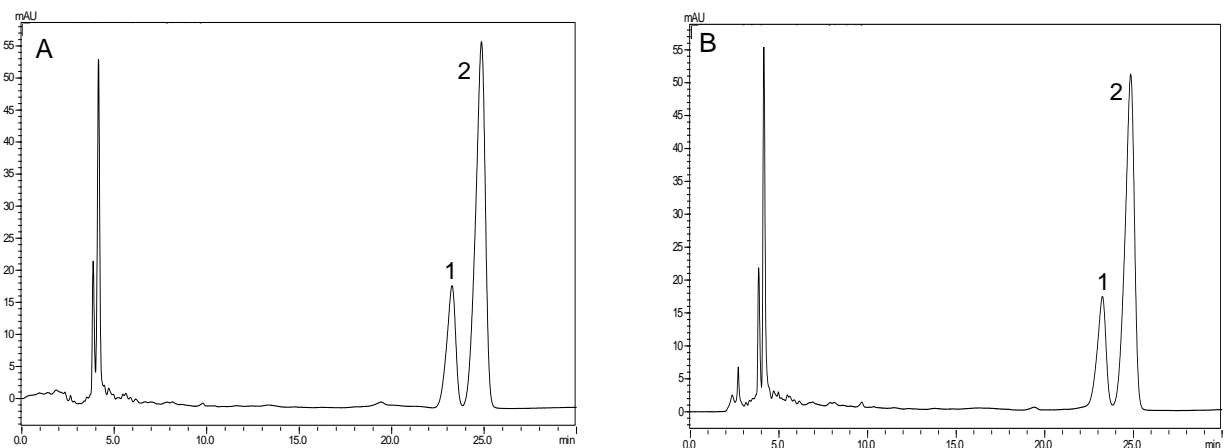
Em geral, maiores rendimentos são obtidos quando se utiliza proporções maiores de solvente em relação ao sólido, pois o aumento do gradiente de concentração favorece a transferência de massa e difusão dos analitos (ZHANG et al., 2008; SAHIN, SAMH, 2013; HELENO et al., 2016). No entanto, maiores proporções de líquido podem causar adicionalmente dispersão da energia ultrassônica, reduzindo os efeitos de cavitação e conseqüentemente baixo rendimento (AL-DHABI, PONMURUGAN, JEGANATHAN, 2017). Portanto, a escolha do volume adequado de solvente é importante (HELENO et al., 2016) e para a extração do caveol e cafestol por sonicação o volume de 4 mL foi o mais eficiente.

Através do valor da desejabilidade global (0,94) para os perfis de amplitude, tempo e volume, verificou-se que os três parâmetros foram maximizados. Considerando o interesse na extração simultânea de caveol e cafestol, a melhor condição foi obtida por sonicação em 164  $\mu\text{m}$ , durante 6 min e com volume de 4 mL (Figura 5).

**Figura 5-** Desejabilidade de caveol e cafestol extraídos por sonicação e determinados por CLAE.



**Figura 6-** Cromatogramas correspondentes à extração por ultrassom na condição otimizada (164 µm, 6 min, 4 mL) (A) e extração líquido/líquido pelo método de Dias et al. (2010) (B). Detecção: 230 n. Picos: caveol (1) e cafestol (2).



Os resultados da extração por EAU foram comparados ao método de referência (DIAS et al., 2010) que utiliza extração líquido/líquido. Não foram observadas diferenças no perfil cromatográfico do extrato final (Figura 6).

Os teores de caveol e cafestol obtidos pela extração líquido/líquido foi de 582 e 553 mg 100g<sup>-1</sup>, respectivamente. Na extração por sonicação, em condição otimizada, o valor observado para o caveol e cafestol foi de 508 e 536 mg 100g<sup>-1</sup>, respectivamente. Observou-se rendimento sensivelmente menor, 13% para caveol e 3% para cafestol, ao obtido pelo método de referência, porém houve redução do volume de solvente e do tempo de extração. É importante ressaltar que o tempo de análise para a extração convencional depende da habilidade do analista, mas o fato da EAU reduzir duas etapas de lavagens com solvente, facilita e acelera o processo, apresentando-se assim como uma alternativa prática e econômica, com menores possibilidades de erros.

#### **4. CONCLUSÃO**

As variáveis amplitude de onda, tempo de extração e volume de solvente influenciaram significativamente o processo extrativo por sonicação, sendo que a melhor condição para extração simultânea dos diterpenos foi obtida em 164 µm, 4 mL e 6 min.

Nestas condições os teores de caveol e cafestol foram próximos aos obtidos pelo método líquido/líquido demonstrando a eficiência da sonicação na extração dos diterpenos. Observou-se ainda que EAU intensificou e acelerou o processo, reduzindo o número de etapas (duas etapas em relação método convencional), a quantidade de solvente e o tempo da análise.

Os resultados indicaram que a EAU é uma tecnologia promissora e economia para extração acelerada de caveol e cafestol em café torrado.

## REFERENCIAS

ABDULLAH, M. A.; KOC, B. Oil removal from waste coffee grounds using two-phase solvent extraction enhanced with ultrasonication. **International Journal Renewable Energy**, Turkey, v.50, n.1, p.965-970, 2013.

ACEVEDO, F.; RUBILAR, M.; SCHEUERMANN, M.; CANCINO, B.; UQUICHE, E.; GARCÉS, M.; INOSTROZA, K.; SHENE, C. Spent Coffee Grounds as a Renewable Source of Bioactive Compounds. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, California, v.7, n.20, p.1-9, 2013.

AL-DHABI, N. A.; PONMURUGAN, K.; JEGANATHAN, P.M. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.34, p.206-2013, 2017.

AWAD, T.S.; MOHARRAM, H.A.; SHALTOUT, O.E.; ASKER, D.; YOUSSEF, M.M. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. **Food Research International**, Essex, v.48, n.2, p.410-427, 2012.

BARBOSA, H. M.A.; MELO, M. M.R.; COIMBRA, M. A.; PASSOS, C. P.; SILVA, C. M. Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v.85, p.165-172, 2014.

CHARTIER, A.; BEAUMESNIL, M.; OLIVEIRA, A.L.; ELFAKIR, C.; BOSTYN, C. Optimization of the isolation and quantitation of kahweol and cafestol in green coffee oil. **Talanta**, Londres, v.117, n.15, p.102-111, 2013.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.G.; MEULLEMIESTRE, A.; MEULLEMIESTRE, A.S.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.34, n.1, p.540-560, 2017.

CHEMAT, F.; E-HUMA, Z.; KHAN, M.K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.18, n.4, p.813-835, 2011.

CHUNG, H.; JI, X.; CANNING, C.; SUN, S.; ZHOU, K. Comparison of different strategies for soybean antioxidant extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.58, n.7, p.4508-4512, 2010.

COREY, E.J.; WESS, G.; XIANG, Y.B.; SINGH, A.K. Stereospecific total synthesis of cafestol. **Journal of the American Chemical Society**. Washington, v.109, n.5, p.4717-4718, 1987.

DA PORTO, C.; PORRETO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.20, n.4, p.1076-1080, 2013.

DIAS, R. C. E.; CAMPANHA, F.G.; VIEIRA, L. G. E.; FERREIRA, L. P.; POT, D.; MARRACCINI, P.; BENASSI, M. T. Evaluation of kahweol and cafestol in coffee tissues and roasted coffee by a new high-performance liquid chromatography methodology. **Journal of Agricultural of Food Chemistry**, Washington, v.58, n.1, p.88–93, 2010.

ESPADA-BELLIDO, E.; FERREIRO-GONZÁLEZ, M.; CARRERA, C.; PALMA, M.; BARROSO, C.; BARBERO, G. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. **Food Chemistry**, Barking, v.219, p.23-32, 2017.

FU, Q.; ZHANG, L.; CHENG, N.; JIA, M.; ZHAN, Y. Extraction optimization of oleanolic and ursolic acids from pomegranate (*Punica granatum L.*) flowers. **Food and Bioproducts Processing**, Basingstoke, v.92, n.3, p.321-327, 2014.

GAASCHT, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Coffee provides a natural multitarget pharmacopeia against the hallmarks of cancer. **Genes & Nutrition**, New Orleans, v.10, n.6, p.51-68, 2015.

GONZÁLEZ-CENTENO, M.R.; COMAS-SERRA, F.; FEMENIA, A.; ROSSELLÓ, C.; SIMAL, S. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera L.*): Experimental kinetics and modeling. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.22, n.1, p.506-514, 2015.

GOULA, A.M. Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil – Kinetic modeling. **Journal of Food Engineering**, Londres, v.117, n.4, p.492-498, 2013.

GUERCIA, E.; BERTI, F.; NAVARINI, L.; DEMITRI, N.; FORZATO, C. Isolation and characterization of major diterpenes from *C. canephora* roasted coffee oil. **Tetrahedron: Asymmetry**, Oxford, v. 27, n.14-15, p.649-656, 2016.

HASHEMI, S.M.; MICHIELS, J.; YOUSEFABAD, S.H.A.; HOSSEIN, M. Kolkhoung (*Pistacia khinjuk*) kernel oil quality is affected by different parameters in pulsed ultrasound-assisted solvent extraction. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v.70, p.28-33, 2015.

HELENO, S.A.; DIZ, P.; PRIETO, M.A.; BARROS, L.; RODRIGUES, A.; BARREIRO, M.F.; FERREIRA, I.C.F.R. Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus L.* by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. **Food Chemistry**, Barking, v.197, n.2, p.1054-1063, 2016.

HUBER, W. W.; ROSSMANIT, W.; GRUSCH, M.; HASLINGER, E.; PRUSTOMERSKY, S.; PETER-VÖRÖSMARTY, B.; PARZEFALL, W.; SCHARF, G.; SCHULTE-HERMANN, R. Effects of coffee and its chemopreventive components kahweol and cafestol on cytochrome P450 and sulfotransferase in rat liver. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.46.n.5, p.1230-1238, 2008.

KITZBERGER, C. S.G.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. Bioactive compounds content in roasted coffee from traditional and modern *Coffea arabica* cultivars grown

under the same edapho-climatic conditions. **Food Research International**, Essex, v.61, p.61-66, 2014.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Diterpenes and diterpene esters in coffee. **Food Reviews International**, New York, v.17, n.4, p.433-450, 2001.

LEE, K.A.; CHAE, J.; SHIM, J.H. Natural diterpenes from coffee, cafestol and kahweol induce apoptosis through regulation of specificity protein 1 expression in human malignant pleural mesothelioma. **Journal of Biomedical Science**, Basel, v.19, p.1-10, 2012.

LEE, K.; CHOI, J.H.; JEONG, H.G. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.45, n.11, p.2118-2125, 2007.

LI, Y.; CHEN, Y.; LI, H. Recovery and purification of cholesterol from cholesterol-b-cyclodextrin inclusion complex using ultrasound-assisted extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.34, n.1, p.281-288, 2017.

LI, Y.; FABIANO-TIXIER, A.S.; TOMAO, V.; CRAVOTTO, G.; CHEMAT, F. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.20, n.1, p.12-18, 2013.

LI, H.; PORDESIMO, L.; WEISS, J. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. **Food Research International**, Essex, v.37, n.7, p.731-738, 2004.

LUQUE DE CASTRO, M.D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Ultrasound-assisted preparation of liquid samples. **Talanta**, Londres, v.72, n.2, p.321-334, 2007.

MANSON, T.J.; LORIMER, J. **Applied sonochemistry: The uses of power ultrasound in chemistry and processing**. V.1, 1 ed. Darmstadt: Wiley-VCH, 2002. 293 p.

MASON, T.J., Ultrasound in synthetic organic chemistry. **Chemical society reviews**, Londres, v.26, p.443-45, 1997.

MORI, A.L.B.; KALSCHENE, D.L.; FERRÃO, M.A.G.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, R.G.; BENASSI, M.T. Diterpenes in *Coffea canephora*. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.52, n.1, p.52-57, 2016.

OIGMAN, S. S.; DE SOUZA, R. O. M. A.; DOS SANTOS JÚNIOR, H. M.; HOVELL, A. M. C.; HAMERSKI, L.; REZENDE, C. M. Microwave assisted methanolysis of green coffee oil. **Food Chemistry**, Barking, v.134, n.2, p.999-1004, 2012.

PATIST, A.; BATES, D. Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Oxford, v.9, n.2, p.147-154, 2008.

ROCHA, M.V.P; MATOS, L.J.B.L; LIMA, L.P; FIGUEIREDO, P.M.S; LUCENA, I.S; FERNANES, F.A.N; GONÇALVES, L.R.B. Ultrasound-assisted production of biodiesel

and ethanol from spent coffee grounds. **Bioresource Technology**, Essex, v.167, p.343-348, 2014.

SAHIN, S.; SAMH, R.S. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.20, n.1, p.595-602, 2013.

SANTOS, M.H.; CAPELO, J.L. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. **Talanta**, Londres, v.73, n.5, p.795-802, 2007.

SCHOLZ, M.B.S.; PAGIATTO, N.F.; KITZBERGER, C.S.G.; PEREIRA, L.F.P.; DAVRIEUX, F.; CHARMETANT, P.; T, LEROY. Validation of near-infrared spectroscopy for the quantification of cafestol and kahweol in green coffee. *Food Research International*, Essex, v.61, n.1, p.176-182, 2014.

SHAH, Y.T.; PANDIT, A.B; MOHOLKAR, V.S. **Cavitation reaction engineering**. Vol. 1. 1 ed. New York: Springer US, 1999. 352 p.

SICAIRE, A.G.; VIAN, M.A.; FINE, F.; CARRÉ, P.; TOSTAIN, S.; CHEMAT, F. Ultrasound induced green solvent extraction of oil from oleaginous seeds. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.31 n.1, p.319-329, 2016.

SOUZA, R. M. N.; BENASSI, M. T. Discrimination of commercial roasted and ground coffees according to chemical composition. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.23, n.7, p.1347-1354, 2012.

SOUZA, R.M.N.; CANUTO, G.A.B.; DIAS, R.C.E.; BENASSI, M.T. Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. **Química Nova**, São Paulo, v.33, n.4, p.885-890, 2010.

SPEER, K., KOLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Rio de Janeiro, v.18 n.1, p.201–216, 2006.

SUSLICK, K. S.; PRICE, G.J. Applications of ultrasound to materials chemistry. **Annual Review of Materials Science**, v.29, p.295–326, 1999.

TIWARI, B.K. Ultrasound: A clean, green extraction technology. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v.71, n.1, p.100-109, 2015.

TOMA, M.; VINATORU, M.; PANIWNYK, L.; MASON, T.J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v.8, n.1, p.137-142, 2001.

URGERT, R. U.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUI, T. G.; BOVERIKAMP, P.V. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.43, n.8, p.2167-2172, 1995.

WANG, W.; MA, X.; XU, Y.; CAO, Y.; JIANG, Z.; DING, T.; YE, X.; LIU, D. Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. **Food Chemistry**, Barking, v.178, n.1, p.106-114, 2015.

WANG, S.; YOON, Y.C.; SUNG, M.-J.; HUR, H.J.; PARK, J.H. Antiangiogenic properties of cafestol, a coffee diterpene, in human umbilical vein endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.421, n.3, p. 567–571, 2012.

WANG, C.C.; CHOU, Y.Y.; SHEU, S.R.; JANG, M.J.; CHEN, T.S. Application of ultrasound thermal process on extracting flavor and caffeine of coffee. **Thermal Science**, Belgrade, v.1, p.69-74, 2011.

ZHANG, Y.; FU, Q.; ZANG, L.; CHENG, N.; JIA, M. Extraction optimization of oleanolic and ursolic acids from pomegranate (*Punica granatum L.*) flowers. **Food and Bioproducts Processing**, Londres, v.92, n.3, p.321-327, 2014.

ZHANG, C.; LINFORTH, R.; FISK, I.D. Cafestol extraction yield from different coffee brew mechanisms. **Food Research International**, Essex, v.49, n.1, p. 27-31, 2012.

ZHANG, Q.A.; ZHANG, Z.Q. YUE, X.F.; FAN, X.F.; LI, T.; CHEN, S.F. Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. **Food Chemistry**, Barking, v.116, p.513-519, 2009.

ZHANG, S.Z.; WANG, L.J.; LI, D.; JIAO, S.S.; CHEN, X.D.; MAO, Z.H. Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v.62, n.1, p.192-198, 2008.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela 3S-** Análise de variância da extração por sonicação na obtenção de caveol.

Fatores	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F	p- valor
Blocos	3502,7	1	3502,7	0,950	0,334
Amplitude (L)	76513,2	1	76513,2	20,761	0,000
Tempo (Q)	24798,5	1	24798,5	6,728	0,012
Volume (Q)	190143,5	1	190143,5	51,59	0,000
Amplitude (L)*Tempo (L)	18832,5	1	18832,5	5,110	0,028
Erro	176899,6	48	3685,4		
Total da soma quadrática	476901,2	53			

**Tabela 4S-**Análise de variância da extração por sonicação na obtenção de cafestol.

Fatores	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F	p- valor
Blocos	1832,1	1	1832,13	1,896	0,175
Amplitude (L)	16859,8	1	16859,84	17,450	0,000
Tempo (L)	22253,9	1	22253,92	23,034	0,000
Volume (Q)	46469,2	1	46469,20	48,098	0,000
Amplitude (L) * Volume (L)	25531,7	1	25531,72	26,426	0,000
Tempo (L) * Volume (L)	25213,3	1	25213,30	26,097	0,000
Erro	45408,0	47	966,13		
Total da soma quadrática	219067,5	53			

## CONCLUSÃO GERAL

O trabalho permitiu propor condições para extração conjunta dos diterpenos, caveol e cafestol, em café torrado substituindo as etapas de saponificação em banho e extração líquido/líquido, pela saponificação em micro-ondas e extração em sonificador.

A condição de saponificação em micro-ondas sugerida foi de 80 °C por 12 min. Mesmo com rendimentos inferiores ao método convencional, o uso de micro-ondas mostrou-se promissor por permitir trabalhar em escala ampliada (5 vezes) e com redução de tempo (1/5 do tempo do processo convencional).

Para a extração por sonicação, foi proposto o emprego de amplitude da onda ultrassônica de 164  $\mu\text{m}$ , do tempo de 6 min e do volume de solvente de 4 mL, onde obteve-se rendimentos similares ao método líquido/líquido com menor tempo de análise, devido a retirada de duas etapas de extração, e com reduzido consumo de solvente.

As etapas propostas simplificaram e aceleraram o processo de extração do caveol e cafestol, demonstrando ser uma alternativa interessante ao processo convencional.