

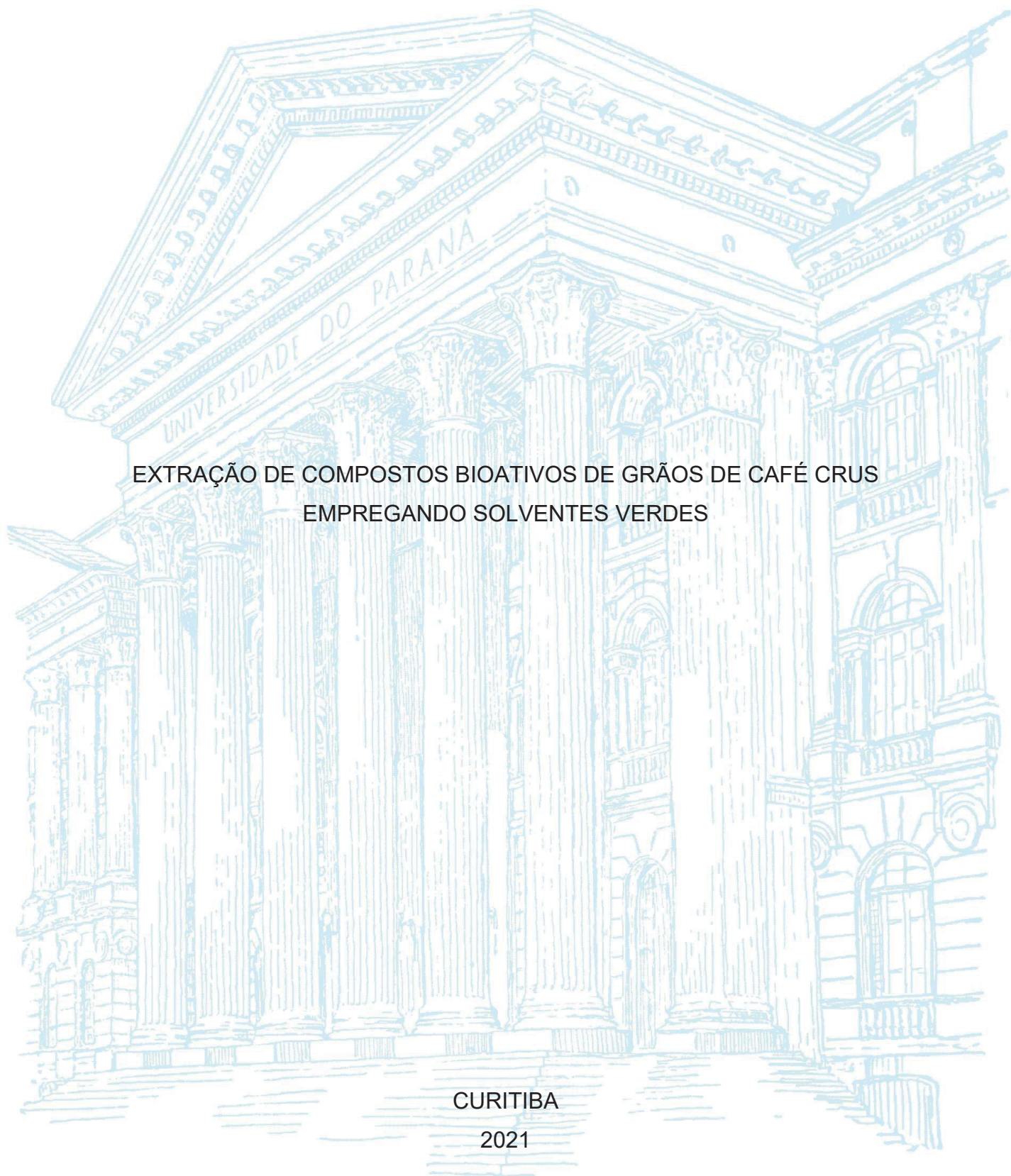
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA ZANDER RONKO

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE GRÃOS DE CAFÉ CRUS  
EMPREGANDO SOLVENTES VERDES

CURITIBA

2021



LETÍCIA ZANDER RONKO

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE GRÃOS DE CAFÉ CRUS  
EMPREGANDO SOLVENTES VERDES

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcos R. Mafra  
Coorientadora: Profa. Dra. Aline Theodoro Toci

CURITIBA  
2021

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

R773e Ronko, Leticia Zander  
Extração de compostos bioativos de grãos de café crus empregando solventes verdes [recurso eletrônico] / Leticia Zander Ronko. – Curitiba, 2021.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2021.

Orientador: Marcos Rogério Mafra.  
Coorientadora: Aline Theodoro Toci.

1. Solventes. 2. Extração (Química). 3. Antioxidantes. 4. Alcalóides. 5. Compostos bioativos.  
I. Universidade Federal do Paraná. II. Mafra, Marcos Rogério. III. Toci, Aline Theodoro. IV. Título.

CDD: 541.3482

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS - 40001016019P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de LETÍCIA ZANDER RONKO intitulada: **Extração de compostos bioativos de grãos de café crus empregando solventes verdes**, sob orientação do Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO MAFRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 08 de Junho de 2021.

Assinatura Eletrônica

09/06/2021 14:38:44.0

MARCOS ROGÉRIO MAFRA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

09/06/2021 15:09:01.0

FREDERICO LUIS FELIPE SOARES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

09/06/2021 14:25:33.0

JOÃO CARLOS DE SOUZA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA)

---

Francisco Heráclito dos Santos, 100 - Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-3232 - E-mail: posalm@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 96341

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prrpg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 96341

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pelo dom da vida e por me permitir inúmeras realizações nesta existência e por me conceder sabedoria, saúde e força para superar todas as adversidades.

Aos meus pais Luiz Fernando Ronko e Simone Zander Ronko por todo apoio e coragem que me deram para superar todos os momentos difíceis, e por sempre acreditarem no meu potencial, e me encorajarem a buscar os meus sonhos. Ao meu irmão Leonardo Zander Ronko que sempre foi meu companheiro de todas as horas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos R. Mafra pela orientação, competência e profissionalismo. Obrigada por confiar em mim e acreditar no meu potencial, e por permitir que essa conquista fosse possível.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Aline T. Toci que apesar da distância foi fundamental para realização deste trabalho. Sou grata aos seus ensinamentos, sua dedicação, atenção, disponibilidade e competência.

A pós Doc. Fabiane Farias por toda paciência, disponibilidade, conhecimento e experiências compartilhadas, sobretudo, sua amizade e carinho.

A minha amiga e companheira Karina Mayumi Ueda por todo trabalho realizado em conjunto, principalmente, pela ajuda e apoio constantes. Sua amizade foi fundamental para mim durante esses dois anos.

A todos os meus amigos do LATOS, Pércia, Fernando, Grazielle, Danielle e José Pedro e Maria Alice por todos os momentos de desconstrução vividos, que permitiram fazer do nosso local de trabalho um ambiente leve e divertido. Levarei nossas histórias para sempre comigo.

Aos meus amigos da vida, em especial, Vallery, Andressa e Eduardo Henrique, que além de me incentivarem, se fizeram presentes em todos os momentos. Obrigada pela amizade e por todo carinho.

A Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Engenharia Química em especial ao LATOS que forneceram a estrutura necessária para que esse trabalho fosse concretizado.

Ao CNPq pela bolsa ofertada.

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta durante a minha trajetória.

*“Lute e empurre fortemente para  
o que você acredita, você ficará surpreso,  
você é muito mais forte do que pensa.”*

Lady Gaga

## RESUMO

Os grãos de café crus são vistos como uma fonte valiosa de compostos bioativos. A obtenção desses compostos é comumente realizada a partir do processo de extração sólido-líquido (ESL). Os solventes orgânicos, muito utilizados na ESL, são conhecidos por produzirem compostos residuais tóxicos, além de não serem biodegradáveis. Uma classe recente de solventes verdes, os solventes eutéticos profundos (DES), têm sido empregues como uma alternativa aos solventes orgânicos, em razão da sua biodegradabilidade, baixa toxicidade, e elevado potencial de aplicação. Além da escolha do solvente adequado, explorar métodos alternativos e ecológicos de extração também é de grande importância. Os métodos de extração convencionais, como agitação e Soxhlet, representam o principal meio de ESL de compostos bioativos de matrizes vegetais. No entanto, esses métodos têm algumas desvantagens, como baixa recuperação de extrato, longa duração de extração e alto gasto de energia. Portanto, o uso de métodos alternativos que reduzam os impactos ambientais é de grande interesse, como é o caso da extração assistida por Ultra-Turrax. Neste contexto, o presente trabalho buscou otimizar um método rápido, eficiente, ambientalmente amigável e que preserve os compostos bioativos presentes nos grãos crus das espécies mais comercializadas de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*). A avaliação das condições otimizadas foi realizada por meio de um planejamento de experimento do tipo fatorial completo, onde foram selecionadas três variáveis: solventes (quatro DES à base de cloreto de colina, água e solução aquosa de cloreto de colina 50% m/v), temperatura (25, 45 e 65 °C), técnica (convencional representada por agitação magnética e não convencional representada por extração assistida por Ultra-Turrax). Os resultados obtidos através da análise dos compostos fenólicos, atividade antioxidante e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) indicaram que a solução aquosa de cloreto de colina 50% m/v resulta em maiores rendimentos de polifenóis, operado a 65 °C, no método não convencional, mostrando que a presença de colina interfere positivamente na extração. Além disso, os resultados revelaram que a agitação promovida pelo Ultra-Turrax é capaz de intensificar os fenômenos de transferências de massa, melhorando o desempenho dos DES. O extrato aquoso apresentou melhor desempenho na extração de alcalóides. Todavia, os DES apresentaram maior capacidade em estabilizar os compostos antioxidantes. Portanto, foi possível demonstrar que a extração assistida por Ultra-Turrax empregando solventes verdes fornece um método rápido e eficaz para a extração de ACGs, cafeína e trigonelina presentes nos grãos crus das duas espécies mais importantes de café.

**Palavras-chave:** Solventes verdes. Extração assistida por Ultra-Turrax. Alcalóides, Ácidos clorogênicos, Atividade antioxidante.

## ABSTRACT

Raw coffee seeds are seen as a valuable source of bioactive compounds. The composite acquisition is commonly performed from the solid-liquid extraction (ESL) process. Organic solvents, widely used in ESL, are known to produce toxic waste compounds, in addition to not being biodegradable. A recent class of green solvents, deep eutectic solvents (DES), have been used as an alternative to natural solvents, due to their biodegradability, low toxicity, and high application potential. In addition to choosing the appropriate solvent, exploring alternative and ecological extraction methods is also of great importance. Conventional extraction methods, such as form and Soxhlet, represent the main ESL medium for bioactive compounds from plant matrices. However, these methods have disadvantages, such as low extract recovery, long extraction duration and high energy expenditure. Therefore, the use of alternative methods that reduce environmental impacts is of great interest, such as the case of extraction assisted by Ultra-Turrax. In this context, the present work sought to optimize a fast, efficient, environmentally friendly method that preserves the bioactive compounds present in the raw beans of the most commercialized coffee species (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*). The evaluation of the optimized conditions was carried out by means of a complete factorial design of the experiment, in which three variables were selected: solvents (four DES based on choline chloride, water and 50% w/v choline chloride), temperature (25, 45 and 65 °C), technical (conventional represented by magnetic emission and unconventional represented by extraction assisted by Ultra-Turrax). The results obtained through the analysis of phenolic compounds, antioxidant activity and high-performance liquid chromatography (HPLC) indicated that the solution of choline chloride solution 50% w/v results in greater compensation of polyphenols, operated at 65 °C, in the method unconventional, showing that the presence of choline interferes positively in the extraction. In addition, the results revealed that the output promoted by the Ultra-Turrax is capable of intensifying the mass transfer phenomena, improving the performance of the DES. The aqueous extract has the best performance in the extraction of alkaloids. However, DES have a greater ability to stabilize antioxidant compounds. Therefore, it has been shown that extraction assisted by Ultra-Turrax using green solvents provides a quick and effective method for the extraction of ACGs, caffeine and trigonelline present in the raw seeds of the two most important coffee species.

**Key-words:** Green solvents. Extraction assisted by Ultra-Turrax. Alkaloids, Chlorogenic acids, Antioxidant activity.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA DO FRUTO CAFÉ.....	23
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS (ACGS) .....	30
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA CAFEÍNA .....	32
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DA TRIGONELINA .....	33
FIGURA 5 - ETAPAS QUE COMPREENDEM O PROCESSO DE EXTRAÇÃO .....	35
FIGURA 6 - PRINCÍPIO DE DISPERSÃO DO ULTRA TURRAX.....	37
FIGURA 7 - DIAGRAMA DE FASE SÓLIDO-LÍQUIDO DE UMA MISTURA EUTÉTICA ENTRE DOIS COMPONENTES.....	41
FIGURA 8 - ESQUEMA DE ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	47
FIGURA 9 - FLUXOGRAMA GERAL DA METODOLOGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA NO PRESENTE TRABALHO .....	49
FIGURA 10 - VARIÁVEIS UTILIZADAS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL COMPLETO.....	53
FIGURA 11 - SISTEMA EMPREGADO NA EXTRAÇÃO CONVENCIONAL DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDES .....	55
FIGURA 12 - SISTEMA NÃO CONVENCIONAL EMPREGADO NA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE.....	55
Figura 13 - GRÁFICO DE EFEITOS PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS ( <i>COFFEA ARÁBICA</i> ).....	70
FIGURA 14 - INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE CAFEÍNA EM EXTRATOS OBTIDOS NO MÉTODO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO .....	74
FIGURA 15 - INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE TRIGONELINA EM EXTRATOS OBTIDOS NO MÉTODO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO .....	77
FIGURA 16 - INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE ACG EM EXTRATOS OBTIDOS NO MÉTODO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO .....	79
FIGURA 17 - EFEITO DAS VARIÁVEIS SOBRE O CONTEÚDO DE CAFEÍNA, ACGS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS DE <i>COFFEA ARÁBICA</i> .....	83
FIGURA 18 - GRÁFICO DE EFEITOS PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS ( <i>COFFEA CANEPHORA</i> ) .....	89

Figura 19 - INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE CAFEÍNA EM EXTRATOS OBTIDOS NO MÉTODO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO. ....	13
FIGURA 20 - INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE TRIGONELINA EM EXTRATOS OBTIDOS NO MÉTODO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO. ....	15
Figura 21 – INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE ACG EM EXTRATOS OBTIDOS NO MÉTODO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO. ....	17
FIGURA 22 – EFEITO DAS VARIÁVEIS SOBRE O CONTEÚDO DE CAFÉINA, ACGS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS DE <i>COFFEA CANEPHORA</i>	21

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS GRÃOS DE CAFÉ CRUS DE DIFERENTES ESPÉCIES.....	26
TABELA 2 - METODOLOGIAS PARA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DA AMOSTRA .....	50
TABELA 3 - HBDs, RAZÃO MOLAR, LOG $K_{(ow)}$ UTILIZADAS DURANTE A SÍNTESE DOS DES .....	52
TABELA 4 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS APLICADAS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A ESPÉCIE ARÁBICA .....	53
TABELA 5 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS APLICADAS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A ESPÉCIE CANEPHORA .....	54
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO CENTESIAL DA MATÉRIA-PRIMA .....	61
TABELA 7 - CONTEÚDO FENÓLICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH) DOS EXTRATOS DE CAFÉ ARÁBICA OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES SOLVENTES E TEMPERATURAS.....	64
TABELA 8 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS DE DPPH E FRAP DOS EXTRATOS DE GRÃOS CRUS DA ESPÉCIE <i>COFFEA ARABICA</i> .....	67
TABELA 9 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE AO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE EXTRATOS PROVENIENTES DE <i>COFFEA ARÁBICA</i> .....	69
TABELA 10 - CONTEÚDO CGAS, CAFÉÍNA E TRIGONELINA OBTIDOS PELO MÉTODO DE EXTRAÇÃO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL. OS RESULTADOS FORAM EXPRESSOS EM BASE SECA EM g. 100g <sup>-1</sup> .....	72
TABELA 11 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH DE EXTRATOS DE <i>COFFEA ARÁBICA</i> ..	82
TABELA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP DE EXTRATOS DE <i>COFFEA ARÁBICA</i> ..	82
Tabela 13 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS DE DPPH E FRAP DOS EXTRATOS DE GRÃOS CRUS DA ESPÉCIE <i>COFFEA CANEPHORA</i> .....	86

TABELA 14 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE AO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE EXTRATOS PROVENIENTES DE <i>COFFEA CANEPHORA</i> .....	89
TABELA 15. CONTEÚDO CGAS, CAFEÍNA E TRIGONELINA OBTIDOS PELO MÉTODO DE EXTRAÇÃO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL. OS RESULTADOS FORAM EXPRESSOS EM BASE SECA EM g. 100g <sup>-1</sup> .....	91
TABELA 16 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP DE EXTRATOS DE <i>COFFEA CANEPHORA</i> .....	20
TABELA 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH DE EXTRATOS DE <i>COFFEA CANEPHORA</i> .....	20

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DES	- Solventes Eutéticos Profundos ( <i>Deep Eutectic Solvents</i> )
MÉTODO NÃO CONVENCIONAL	- Extração assistida por Ultra-Turrax
UT	- Ultra-Turrax
ACGs	- Ácidos clorogênicos
ChCl 50%	- Solução aquosa de cloreto de colina 50% m/v
ChCl	- Cloreto de colina
CCLA	- DES (Cloreto de Colina: Ácido Lático)
CCP	- DES (Cloreto de Colina: 1,2-Propanodiol)
CCXY	- DES (Cloreto de Colina: Xilose)
CCGY	- DES (Cloreto de Colina: Glicerol)
CCAA	- DES (Cloreto de Colina: Ácido Acético)
CCU	- DES (Cloreto de Colina: Uréia)
CCET	- DES (Cloreto de Colina: Etilenoglicol)
DPPH	- 1,1difeníl-2-picril-hidrazil
FRAP	- Capacidade Antioxidante de Redução do Ferro ( <i>Ferric Reduction Antioxidant Power</i> )
TBHQ	- Terc-butil-hidroquinona
TPTZ	- Tripiridil-s-triazina
UV	- Ultravioleta
ESL	- Extração Sólido-Líquido
CFT	- Compostos fenólicos totais
HBA	- Aceptor de Ligações de Hidrogênio ( <i>Hydrogen Bond Acceptor</i> )
HBD	- Doador de Ligações de Hidrogênio ( <i>Hydrogen Bond Donor</i> )
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência

## SUMÁRIO

<b>PARTE I</b> .....	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA E ESTADO DA ARTE</b>	<b>18</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
1.2.1 HISTÓRICO DO CAFÉ.....	21
1.2.2 IMPORTÂNCIA SOCIAL E ECONÔMICA DO CAFÉ.....	22
1.2.3 ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DO CAFÉ.....	23
1.2.4 CONSTITUINTES QUÍMICOS DO CAFÉ CRU.....	25
1.2.5 COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ.....	26
1.2.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	27
1.2.7 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	28
1.2.7.1 Ácidos clorogênicos.....	29
1.2.7.2 Cafeína.....	31
1.2.7.3 Trigonelina.....	33
1.2.8 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	34
1.2.9 EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRA-TURRAX.....	37
1.2.10 SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS (DES).....	40
1.3 ESTADO DA ARTE.....	43
1.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O ESTADO DA ARTE.....	44
<b>CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS E ESCOPO</b> .....	<b>45</b>
<b>2.1 OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
2.1.1 Objetivo geral.....	45
2.1.2 Objetivos específicos.....	45
2.2 Delineamento da dissertação.....	46
<b>CAPÍTULO 3 – Material e Métodos</b> .....	<b>49</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
3.1 PREPARO DA AMOSTRA.....	49
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	50
3.3 PREPARO DOS DES.....	51
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO (ESL).....	52

3.5	EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS .....	54
3.6	AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS .....	56
3.6.1	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS POR FOLIN CIOCALTEAU .....	56
3.6.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	57
3.6.2.1	MÉTODO DPPH (2,2 DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZILA) .....	57
3.6.2.2	MÉTODO FRAP .....	58
	<b>PARTE II .....</b>	<b>60</b>
	<b>CAPÍTULO 4 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DOS SOLVENTES .....</b>	<b>61</b>
4.1	Composição centesimal dos grãos de café crus .....	61
4.2	Avaliação e seleção dos solventes para o delineamento inteiramente casualizado (DIC).....	63
	<b>CAPÍTULO 5 – PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO PARA ESPÉCIE <i>COFFEA ARABICA</i> .....</b>	<b>66</b>
5.1	Planejamento fatorial completo utilizado na ESL .....	66
5.1.1	Compostos fenólicos totais (CFT) .....	69
5.2	Avaliação do perfil fenólico determinado por cromatografia (UPLC-DAD) .....	71
5.2.1	Cafeína.....	74
5.2.2	Trigonelina .....	76
5.2.3	Ácidos clorogênicos totais.....	78
5.3	Atividade antioxidante .....	81
	<b>CAPÍTULO 6 – PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO PARA ESPÉCIE <i>COFFEA CANEPHORA</i> .....</b>	<b>85</b>
6.1	PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO UTILIZADO NA ESL .....	85
6.1.1	Compostos fenólicos totais (CFT) .....	88
6.2	Avaliação do perfil fenólico determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).....	90
6.2.1	Cafeína.....	13
6.2.2	Trigonelina .....	15
6.2.3	Ácidos clorogênicos totais.....	16
6.3	Atividade antioxidante .....	16
	<b>PARTE III .....</b>	<b>24</b>
	<b>CAPÍTULO 8 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>25</b>

REFERÊNCIAS.....27



## PARTE I

### Motivação, estado da arte, objetivos e descrição experimental

---

*Nesta parte serão apresentados a motivação, a revisão da literatura acerca do tema, bem como os objetivos e escopo deste trabalho. Também será apresentada a descrição da metodologia utilizada.*

## **CAPÍTULO 1 - Introdução, Revisão da Literatura e Estado da Arte**

---

### **1.1 Introdução**

O café é uma das bebidas mais populares e consumidas no mundo principalmente devido às suas propriedades psicoativas (AMAMO, 2014). O café tem importância fundamental no mercado de *commodities* agrícola brasileiro. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2017) o Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo. De acordo com a Organização Internacional do Café (ICO), em 2020 a produção brasileira atingiu um total de 69 milhões de sacas de 60 quilos.

A composição química do café varia de acordo com a espécie e depende de fatores genéticos, ambientais, práticas agrícolas, grau de maturação do fruto do café, beneficiamento e condições de estocagem. Dentre diversas espécies catalogadas, as mais comercializadas são *Coffea arábica* e *Coffea canephora*. As diferenças na composição contribuem para que quando submetidos ao processo de torrefação proporcionem bebidas com características sensoriais diferenciadas (TOCI; ZANONI, 2017; TOLEDO et al., 2016).

O café apresenta diversos efeitos biológicos, entre eles destacam-se atividades antioxidante, antimutagênicas, antibióticas, antihipercolesterolêmicas, anti-hipertensivas e anticarcinogênicas. O seu consumo está associado a vários efeitos benéficos ao organismo, tais como redução do risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2, atividade sequestrante de radicais livres, inibição da biossíntese dos leucotrienos, protetor do fígado contra cirrose e redução da incidência de hepatocarcinoma, além de inibição da peroxidação lipídica. Estes benéficos são atribuídos à presença de compostos fenólicos, principalmente ácidos clorogênicos (ACGs), um dos principais componentes da fração fenólica do café (CAVIN et al., 2002; CHU, Y et al., 2011; GAWLIK-DZIKI et al., 2014; BALASUBASHINI et al., 2005; OZERCAN et al., 2006).

Os compostos antioxidantes são de suma importância para os alimentos e sistemas biológicos, uma vez que promovem a inativação dos radicais livres, diminuindo o estresse oxidativo no corpo humano e apresentam ação

anticancerígena, redução na incidência de doenças degenerativas, além de retardar processos degradativos em alimentos. Dentre as principais substâncias antioxidantes, destacam-se os compostos fenólicos. Os antioxidantes oriundos de fontes naturais, principalmente de matrizes vegetais, são preferíveis quando comparados aos antioxidantes sintéticos, posto que, estes compostos podem estar associados a danos à saúde em relação a produção de compostos cancerígenos (ARAÚJO, 2004; SULAMAIN et al., 2011; SHAHIDI, 2015; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008).

Neste contexto, sabendo que o café cru possui uma quantidade significativa de compostos fenólicos, há um grande interesse na sua extração, separação e purificação. Estes compostos podem ser obtidos a partir de diferentes técnicas e solventes, as quais devem preservar as propriedades das biomoléculas (WILLIAM et al., 1979). Para a extração são empregados principalmente solventes orgânicos, como por exemplo acetona, acetato de etila, metanol, etanol e propanol ou suas misturas. Ainda que os solventes orgânicos possuam elevada capacidade de dissolução e extração, em geral apresentam algumas desvantagens, como alta inflamabilidade e produção de compostos residuais tóxicos, o que diminui a qualidade e aplicabilidade do extrato, além de não serem biodegradáveis (DURAND et al., 2017; BARBIERI et al., 2020).

Nesse cenário, os princípios da química verde vêm sendo aplicados para a extração de compostos bioativos de matrizes vegetais. Um dos princípios consiste no desenvolvimento de solventes alternativos de modo que apresentem baixa toxicidade, altos rendimentos e biocompatibilidade com as biomoléculas de interesse, além de facilitar o processo de purificação do produto (AHMAD et al., 2018). Com a finalidade de preservar a atividade dos biocompostos, vários trabalhos têm avaliado uma nova classe de solventes designados Solventes Eutéticos Profundos (DES, do inglês *Deep Eutectic Solvents*) que caracterizam-se pela facilidade de preparo e custo relativamente baixo (AHMAD et al., 2018; SYAKFANAYA et al. 2019; YOO et al. 2018; BARBIERI et al., 2020; YUNIARTI et al., 2019).

Os solventes eutéticos profundos são misturas eutéticas oriundas de um sal de amônio com um composto capaz de fazer ligações de hidrogênio (EMMA et al., 2014). Os DES são utilizados como alternativa na extração de compostos bioativos, frente aos solventes orgânicos convencionais. Este princípio vem sendo ampliado

para a criação de solventes projetados (do inglês, *designer solvents*), ou seja, podem ter algumas de suas propriedades ajustadas, como é o caso da viscosidade. Para a síntese dos DES, diversas combinações de compostos receptores de hidrogênio, HBA (do inglês, *Hydrogen Bond Aceptor*) com compostos doadores de hidrogênio HBD (do inglês, *Hydrogen Bond Donor*) são desenvolvidas, resultando em um grande desvio da idealidade, promovendo um abaixamento “profundo” da temperatura de fusão com relação a solução ideal, possibilitando que a mistura seja líquida mesmo em baixas temperaturas (MARTINS; PINHO; COUTINHO, 2019). Estes solventes têm propriedades compatíveis para dissolver e extrair compostos naturais e bioativos de plantas, óleos ou biomassa, valorizando produtos naturais ou resíduos como fonte de compostos bioativos (EMMA et al., 2014; VIEIRA et. al, 2018).

Na busca por maiores rendimentos na extração de biomoléculas, bem como a preservação de sua bioatividade, o uso de determinadas técnicas de extração associadas a solventes verdes vem sendo explorados. Neste contexto, a combinação constituída por DES e um método de extração não convencional, e.g. extração assistida por ultrassom ou Ultra-Turrax, apresentam resultados promissores relatados na literatura, devido à sua maior eficiência e redução do tempo de extração frente aos métodos convencionais, como o Soxhlet, agitação magnética e prensagem, por exemplo (VILKHU et al., 2008; SORIA; VILLAMIEL, 2010).

Com o intuito de otimizar os processos de extração de biocompostos provenientes de matrizes vegetais bem como a preservação da atividade das biomoléculas extraídas, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um método eficiente para a extração de bioativos presentes em duas espécies diferentes de café cru (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*). Para esse fim, diferentes solventes à base de cloreto de colina e produtos naturais renováveis foram projetados, incluindo água e uma solução de aquosa de cloreto de colina 50 % (m/v). As condições de extração foram otimizadas através de um planejamento experimental do tipo fatorial completo. A eficiência foi avaliada com base no conteúdo fenólico total e na atividade antioxidante, mensurada por dois diferentes métodos, eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) e redução dos íons ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP) . O perfil fenólico dos extratos foi determinado por meio de análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## 1.2 Revisão de Literatura

Neste tópico serão apresentadas as propriedades gerais das duas espécies de café mais importantes economicamente (*Coffea arábica* e *Coffea canephora*), com ênfase nos compostos bioativos, dentre eles: polifenóis (ácidos clorogênicos), cafeína e trigonelina. Também serão expostos os processos de extração destes compostos incluindo as técnicas convencionais e não convencionais. Além disso, serão abordados aspectos relacionados aos solventes empregados na extração, com ênfase nos solventes eutéticos profundos (DES).

### 1.2.1 Histórico do café

O café é proveniente da Etiópia e estima-se que foi descoberto entre os séculos IX e X na província de Keffa por pastores de cabras que observaram o efeito estimulante nos animais que ingeriam o fruto, visto que, tornavam-se mais espertos, resistentes e ágeis ao subir montanhas íngremes e percorrer trajetos longos. Posteriormente, um dos pastores experimentou os frutos, comprovando o efeito estimulante do café (MARTINS, 2012). Os árabes foram os pioneiros no cultivo do café, sendo assim o nome científico *Coffea arábica*, e também foram responsáveis por difundir o café pelo mundo (MUSSATTO et al., 2011).

Em meados de 1615, o café chegou ao continente europeu trazido por viajantes em suas sucessivas passagens pelo oriente. Ainda que países como Alemanha, França e Itália demonstrassem interesse em desenvolver o plantio do café em suas terras, os holandeses foram os precursores no cultivo da planta na Europa (ABIC, 2011). A palavra café tem origem da palavra árabe “qahwa” que significa vinho. Posteriormente quando o café foi levado da Etiópia para a Europa, foi chamado de vinho da Arábia (ILLY, 2002), onde passou a ser consumido na forma de bebida, principalmente devido à crença veiculada às suas propriedades medicinais. O café foi levado para ser cultivado nas colônias europeias na África e na América e assim foi rapidamente difundido pelos continentes (MUSSATO et al., 2011), sendo uma das bebidas mais apreciadas ao redor do mundo, provocando grande impacto social e econômico.

No Brasil, o café chegou por volta de 1727, trazido da Guiana Francesa para Belém pelo sargento Francisco de Mello Palheta. As primeiras mudas foram levadas para o estado do Pará que apresentava condições climáticas e características de solo totalmente favoráveis para o cultivo da planta. A cultura de café neste estado teve grande aceitação, desenvolveu-se rapidamente e foi levada para outros estados brasileiros. Desde então, o consumo e o plantio foram crescentes ao longo dos séculos devido as terras férteis e o clima favorável de tal forma que quinze estados brasileiros passaram a produzir café tornando o Brasil o maior produtor mundial (ABIC, 2016).

### 1.2.2 Importância social e econômica do café

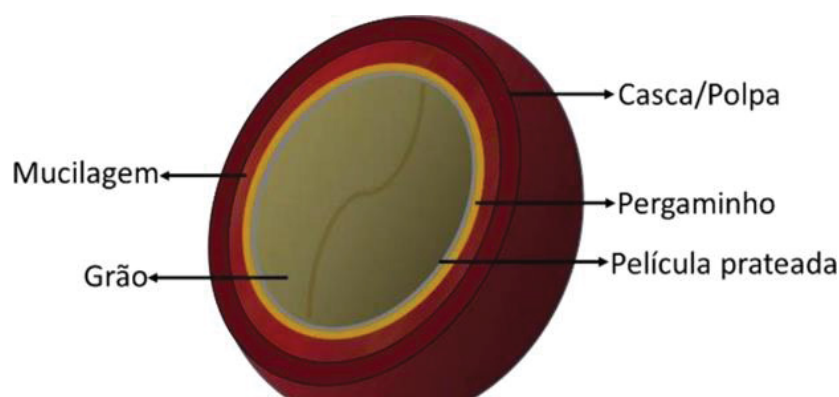
Conforme dados da Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC) e da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), o café é a segunda maior *commodity* do mundo em valor de mercado, perdendo apenas para o petróleo (ABIC, 2015). A cafeicultura é uma das principais atividades agrícolas do Brasil e de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o país é o maior produtor e exportador de café do mundo. Em 2020, o Brasil produziu 61,62 milhões de sacas de 60kg, somando as espécies arábica e canephora. Os principais estados produtores de café do Brasil são: Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo (EMBRAPA, 2020).

O alto consumo de café está associado com a crescente busca da sociedade por melhorias na qualidade de vida e introdução de alimentos funcionais na dieta, uma vez que, o principal motivo do consumo da bebida têm sido seus efeitos fisiológicos, principalmente a ação estimulante, bem como seus atributos sensoriais, tornando a bebida do café uma das mais apreciadas e consumidas em todo mundo. Além disso, o café apresenta atividade antioxidante, atribuída à presença de compostos fenólicos, como os ácidos clorogênicos e acredita-se também que seu consumo moderado é capaz de reduzir o desenvolvimento de alguns tipos de câncer, entre eles, o de intestino grosso (SEGHETO, 2017; BUDRYN et. al, 2009).

### 1.2.3 Aspectos morfofisiológicos do café

O café é uma planta perene, eudicotiledônea pertencente à família botânica das Rubiáceas e ao gênero *Coffea* (EIRA et al., 2006), desenvolvendo-se principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Caracteriza-se por frutos ovóides com cores vermelhas ou amarelas, possuindo duas sementes cartilaginosas, envolvidas em uma polpa adocicada e comestível, denominada mucilagem (FIGURA 1). O interesse desta planta é voltado para suas sementes, que são utilizadas no preparo da bebida (BRUNETON, 1991).

FIGURA 1 – ESTRUTURA DO FRUTO CAFÉ



FONTE: adaptado de Durán e colaboradores (2017)

O fruto do cafeeiro é constituído por mesocarpo, endocarpo, exocarpo e sementes e possui formato oval (MARTINS, 2012; NARITA; INOUE, 2014). Depois da colheita, o café deve ter sua polpa removida para obtenção dos grãos crus, sendo que, este processo pode ser realizado por via seca, úmida ou natural.

No processo natural, predominante no Brasil, os frutos do café são secos por exposição ao sol, logo, a qualidade do produto dependerá do clima e da umidade na região. A umidade elevada acarreta no desenvolvimento de microrganismos, comprometendo a qualidade da bebida e a temperatura é o fator que determina o período de tempo no qual as frutas ficarão submetidas ao sol. No método seco o fruto passa pelo processo de secagem ao sol ou por secadores mecânicos em sua forma integral (com casca e mucilagem), enquanto no método úmido, antes da secagem, o café passa por descascamento. Em seguida, a

mucilagem é removida através de processo fermentativo, onde é possível identificar a presença de bactérias ácido-lácticas. O método seco é mais simples e comumente usado para o processamento de grãos da espécie *canephora* e o método úmido para obtenção dos grãos da espécie arábica (TOLEDO et al., 2016; RESENDE; ARCANJO; SIQUEIRA, 2009; DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010; HAMDUCHE et al., 2016).

São catalogadas mais de 100 espécies do gênero *Coffea* ao redor do mundo e todas elas encontram-se ao longo da faixa equatorial da África, Ásia e América (ABIC, 2016). Todavia, as espécies mais cultivadas e de maior comercialização mundial são: *Coffea arábica* e *Coffea canephora*, sendo este conhecido também como robusta ou conilon e representam cerca de 99% da produção mundial do café (ABIC, 2016). As duas espécies apresentam diferenças na composição química dos grãos, resultando em bebidas com qualidade e características distintas e, conseqüentemente, preço diferenciado.

O *Coffea arábica* corresponde a 75% do mercado mundial e o *Coffea canephora* a 24%. No Brasil, a produção de café arábica é de três a quatro vezes maior do que a produção da espécie *canephora*, sendo o maior produtor mundial dessa espécie (ABIC, 2016). A espécie arábica apresenta atributos sensoriais diferenciados, apresentando melhor aroma e menor amargor. A bebida preparada a partir dessa espécie caracteriza-se por sua complexidade de aroma e sabor, conseqüentemente apresenta maior valor de mercado, custando até o dobro do valor do *Coffea canephora* (ILLY, 2002; KWON et al., 2015).

A espécie *Coffea arábica*, proveniente de regiões montanhosas é uma planta complexa, desenvolve-se preferencialmente em altitudes elevadas, de 1000 a 2800 metros, requer clima temperado, realiza cruzamentos apenas com a mesma espécie e apresenta porte de 2 a 6 metros de altura. Por outro lado, a espécie *Coffea canephora*, oriunda de regiões com climas quentes e úmidos, caracteriza-se por sua alta produtividade e pela resistência a doenças (pragas), e pode atingir 12 metros de altura (DAVIS et al., 2006; ILLY, 2002). A espécie *Coffea canephora* proporciona uma bebida de sabor adstringente e amargo (CAMARGO, 2010; KWON et al., 2015). Essa espécie é utilizada como matéria-prima básica na produção de café solúvel e como componente fundamental na composição dos “*blends*” com café arábica nas indústrias de café torrado e moído, proporcionando um processo com maior rendimento industrial, por apresentar, principalmente, mais sólidos solúveis e



menor custo em sua comercialização (CARVALHO et al., 2011; IVOGLO et al., 2008).

#### 1.2.4 Constituintes químicos do café cru

Diferentes compostos químicos presentes no grão cru do café proporcionam as características de sabor, aroma e complexidade do produto final, entre eles, destacam-se a trigonelina, os ácidos clorogênicos, açúcares, proteínas, aminoácidos, entre outros (ABRAHÃO et al., 2008; PEREIRA et al., 2010).

A composição química do café (TABELA 1) não é determinada apenas geneticamente mas também por sistema de cultivo, condições ambientais (altitude, temperatura e umidade), época de colheita, preparo, armazenamento e torrefação. O processo de torrefação é fundamental para a formação de compostos que conferem as características de aroma e sabor do café, visto que, os compostos fenólicos são decompostos resultando na formação de voláteis do aroma, materiais poliméricos (melanoidinas) e liberação de CO<sub>2</sub>. O ácido clorogênico é hidrolisado à ácidos cafeicos. As altas temperaturas empregadas no processo de torrefação degradam os polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos, principalmente o ácido clorogênico, alterando a sua composição química e biológica (TOLEDO et al., 2017; MARTINEZ, 2014; BERTRAND, 2012; MENEZES, 1994).

A espécie *canephora* apresenta maiores teores de cafeína e ácidos clorogênicos e menores teores de trigonelina em relação a arábica. De acordo com Clifford (1999), os compostos fenólicos em quantidades maiores na espécie *canephora*, associam-se com a desvalorização da qualidade, sendo responsáveis pela adstringência e amargor, influenciando negativamente o seu sabor. O fato do *Coffea canephora* apresentar quase o dobro de cafeína sugere que o efeito fisiológico das bebidas preparadas a partir desta espécie sejam diferentes (TRUGO, 2003).

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS GRÃOS DE CAFÉ CRUS DE DIFERENTES ESPÉCIES

Componente (g.100g <sup>-1</sup> )	<i>Coffea arabica</i>		<i>Coffea canephora</i>	
	Cru	Torrado	Cru	Torrado
Minerais	3,0 – 4,0	3,5 – 4,5	4,0 – 4,5	4,6 – 5,0
Cafeína	0,9 – 1,2	1,0	1,6 – 2,4	2,0
Trigonelina	1,0 – 1,2	0,5 – 1,0	0,6 – 0,75	0,3 – 0,6
Lipídeos	12,0 – 18,0	14,5 – 20,0	9,0 – 13,0	11,0 – 16,0
Ácidos clorogênicos	5,5 – 8,0	1,2 – 2,3	7,0 – 10,0	3,9 – 4,6
Ácidos alifáticos	1,5 – 2,0	1,0 – 1,5	1,5 – 2,0	1,0 – 1,5
Oligossacarídeos	6,0 – 8,0	0 – 3,5	5,0 – 7,0	0 – 3,5
Polissacarídeos totais	50,0 – 55,0	24,0 – 39,0	37,0 – 47,0	-
Aminoácidos	2,0	-	2,0	-
Proteínas	11,0 – 13,0	13,0 – 15	11,0 – 13,0	13,0 – 15,0

FONTE: adaptado de SMITH, 1985.

### 1.2.5 Compostos bioativos do café

Os compostos fitoquímicos também conhecidos como compostos bioativos são elementos não nutrientes provenientes do metabolismo secundário de vegetais, onde a plasticidade genética em conjunto com fatores bióticos e abióticos asseguram a produção de certos compostos que atuam na proteção e ou sinalização da planta (BAENA, 2015; PINELLI, 2009; REZENDE et al., 2016).

Os compostos bioativos são classificados de acordo com sua estrutura química em: compostos fenólicos, alcaloides, compostos nitrogenados, compostos organosulfúricos, fitoesteróis e carotenoides. Essas substâncias são biologicamente ativas, ou seja, promovem benefícios à saúde humana, como a atividade antioxidante, anti-inflamatória e hipocolesterolêmica, por exemplo (LIU, 2012; BAENA, 2015; ABRAHÃO et al. 2008).

### 1.2.6 Atividade antioxidante

Os compostos antioxidantes são substâncias com capacidade de inibir ou retardar significativamente a degradação oxidativa de moléculas orgânicas e inorgânicas protegendo os organismos contra os efeitos prejudiciais dos radicais livres. Esses radicais são resultantes do metabolismo celular e são átomos ou moléculas altamente reativas, contendo número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Em virtude do não emparelhamento de elétrons, os radicais livres exibem alta reatividade, prejudicando macromoléculas celulares como lipídeos e proteínas em alimentos, acarretando a perda do valor nutricional e alteração sensorial. Nos seres humanos, os radicais livres podem favorecer ao surgimento de doenças degenerativas, cardiovasculares e até mesmo câncer. Diante disso, alimentos com potencial antioxidante tornam-se alvos de estudos visto que controlam a ação dos radicais livres (FRANKLIN et al, 2009; LOUREIRO; MASCIO; MEDEIROS, 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Grande parte dos radicais livres deriva-se do oxigênio, nitrogênio e enxofre, dando origem as espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e espécies reativas de enxofre (ERE). As ERO são produzidas em maior quantidade e incluem espécies radicalares, como o ânion superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), radical hidroperoxila ( $\text{HO}_2\cdot$ ) e peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ). Outras espécies intermediárias como peroxinitrito ( $\text{ONOO}\cdot$ ), oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) também formam radicais livres no organismo (FRANKLIN et al, 2009; LOUREIRO; MASCIO; MEDEIROS, 2002).

Os antioxidantes exibem dois mecanismos de defesa. O primeiro corresponde aos doadores de hidrogênio, que bloqueiam a reação na cadeia oxidativa:



Onde,  $\text{ROO}\cdot$  e  $\text{R}\cdot$  representam os radicais livres, AH os antioxidantes com um átomo de hidrogênio e  $\text{A}\cdot$  o radical inerte.

O segundo mecanismo compreende os antioxidantes que formam complexos com íons metálicos, principalmente cobre e ferro (CAROCHO, FERREIRA, 2013; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; HALLIWELL, 1997; ARAÚJO, 2004).

Os antioxidantes podem ser classificados em sintéticos e naturais. Os antioxidantes sintéticos são altamente eficientes, apresentam custo relativamente baixo e uma alta estabilidade, devido a isso seu uso é frequente nas indústrias alimentícias. O 2,3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA), 2,6-diterc-butil-p-creso (BHT) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) são os antioxidantes sintéticos mais utilizados na conservação dos alimentos. Apesar de suas vantagens, os antioxidantes sintéticos apresentam controvérsias com relação a segurança e efeitos adversos, como a produção de compostos residuais tóxicos e carcinogênicos prejudiciais à saúde. Em contra partida, os antioxidantes provenientes de fontes naturais, como as vitaminas e os compostos fenólicos, exercem papel importante na proteção contra o estresse oxidativo, agregando valor ao produto final (FENNEMA; DAMODARAN; PARKIN, 2007; ARAÚJO, 2004; LAPOINTE et al., 2006; SULAMAIN et al., 2011).

Pellegrini e seus colaboradores (2003) indicam que o café apresenta maior atividade antioxidante em relação às bebidas comumente consumidas, como chás, por exemplo, sendo que esse efeito está associado ao alto teor de compostos fenólicos em sua composição, em especial os ácidos clorogênicos (ACGs). A bebida tem sido alvo de estudos em que visam elucidar os benefícios e a atividade antioxidante da mesma. Entretanto, a atividade antioxidante, depende da presença e concentração de compostos bioativos bem como da cultivar e dos fatores ambientais e processamento pós colheita. A torrefação também é um fator importante, uma vez que forma novos compostos como a niacina (vitamina B3) e promove a degradação dos compostos fenólicos (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009; BUDRY et al., 2013; RICHELLIE et al., 2001).

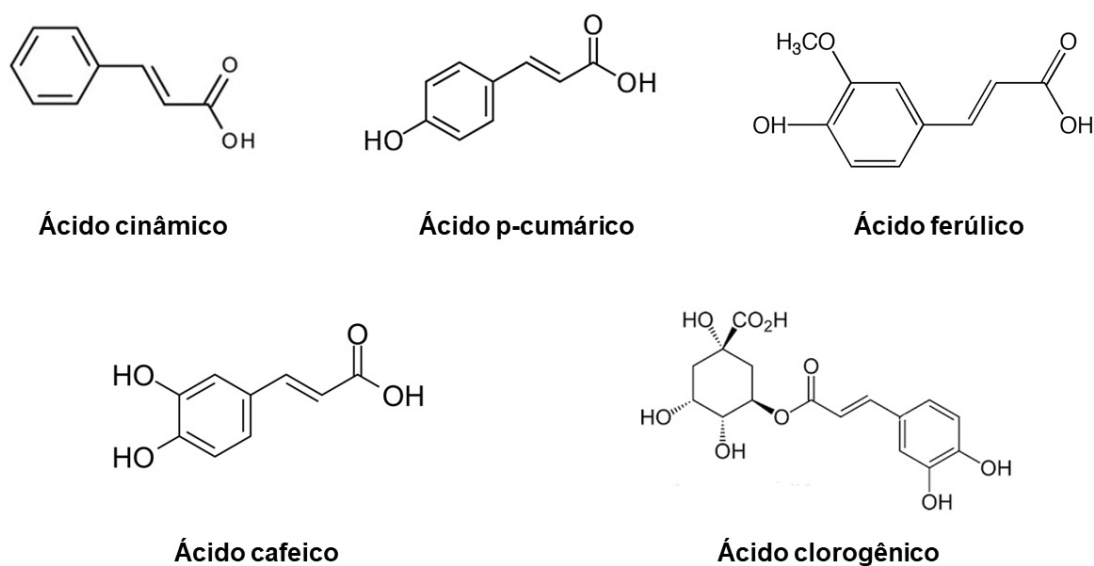
### 1.2.7 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos na natureza, representando uma das principais classes de metabólitos secundários das plantas, sendo sintetizados pela via do ácido chiquímico e/ou pela via do ácido mevalônico. Na fisiologia vegetal os compostos fenólicos atuam no crescimento e na proteção da planta contra parasitas, além de auxiliar na pigmentação. Esses compostos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula. Apesar de possuírem

um grupo característico de álcoois, os polifenóis são mais ácidos que os álcoois, sendo mais suscetíveis a oxidação (SOARES, 2002; ANGELO; JORGE, 2007).

Por apresentarem estrutura variável, são encontrados cerca de cinco mil compostos fenólicos, com destaque para os ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono em sua estrutura (ácidos salicílico, gentísico; *p*-hidroxibenzóico, protocatequínico, vanílico, gálico e siríngico) e os ácidos cinâmicos, que apresentam nove átomos de carbono em sua estrutura (ácidos cinâmico, *o*-cumárico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico), conforme ilustra a Figura 2. Apesar da quantidade abundante de compostos fenólicos encontrados na natureza destacam-se os ácidos fenólicos, taninos e flavonoides como as principais classes destes compostos (BAENA, 2015; ARCHELA, 2013 BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

FIGURA 2. ESTRUTURA DOS ÁCIDOS CINÂMICOS



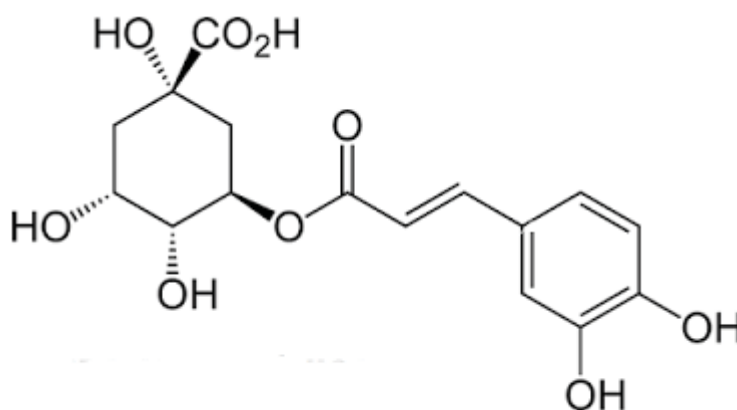
#### 1.2.7.1 Ácidos clorogênicos

Os ácidos clorogênicos (ACGs) são formados a partir da esterificação do ácido quínico com derivados do ácido cinâmico como os ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico. São subdivididos em grupos com três isômeros cada com base no número e na identidade dos resíduos de acilação, sendo os principais, os ácidos cafeoilquínicos (ACQ), feruloilquínicos (AFQ), dicafeoilquínicos (AdiCQ) e *p*-

cumaroilquínicos (*p*-ACoQ). Entre os ACGs presentes no café, o isômero ácido 5-cafeilquínico (5-ACQ) é o mais abundante (FIGURA 2) (ALMEIDA; BENASSI, 2011; TOCI; FARAH; TRUGO, 2006; NAVEED et al., 2018).

Os ácidos clorogênicos (ACGs) e seus isômeros são os principais representantes da fração fenólica do café, compreendendo cerca de 5,5% e 10% (em peso seco) nas espécies arábica e canephora, respectivamente. No processo de torrefação os ácidos clorogênicos (ACGs) geram diversos compostos fenólicos de baixa massa molecular, como fenol, 1,2,3-triidroxibenzeno (pirogallol), 1,2-diidroxibenzeno (catecol) e 4-vinilbenzeno-1,2-diol (4-vinilcatecol). Esses compostos estão relacionados com a qualidade do café, posto que são importantes na formação de pigmentos, aromas e sabor. (TOLEDO et al., 2016 FARAH; DONANGELO, 2006).

FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS (ACGS)



FONTE: Toci e colaboradores (2006)

Os ácidos clorogênicos exercem inúmeros efeitos fisiológicos benéficos à saúde humana, visto que, apresentam propriedades hepato-protetoras, antimutagênicas, antioxidante, cardio-protetoras, anti-inflamatórias, antivirais, antimicrobianas, antidiabéticas e anti-hipertensivas. Além disso, atuam no controle de peso, reduzindo a gordura visceral e o peso corporal, através da hidrólise de lipídeos, podendo ser utilizados em suplementos alimentares (GAWLIK-DZIKI et al., 2014; SHIMODA et al., 2006; GETACHEW; CHUN, 2016).

Shimoda e colaboradores (2006) revelaram que o extrato de café verde é um potencial inibidor da absorção de gordura, contribuindo para a redução de peso

corporal. Segundo os autores, tal efeito pode estar associado aos ACGs presentes nos grãos de café.

Azuma e colaboradores (2000) constaram que os ACGs exibem efeitos inibitórios da carcinogênese no intestino grosso, fígado e língua, além do efeito antioxidante *in vivo*.

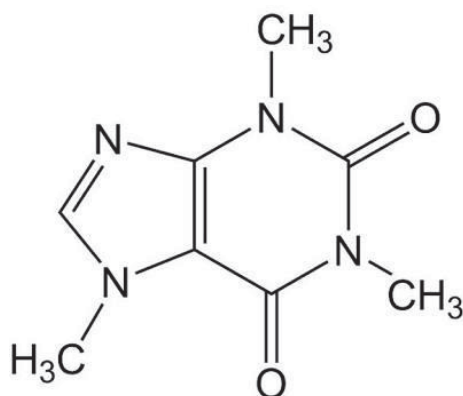
Em estudo realizado por Zhu e colaboradores (1999) os autores observaram que o ácido 3,5-dicafeoilquínico, um dos isômeros do ACG é capaz de inibir a integrase do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), uma enzima necessária para a infecção das células.

O processo de torrefação influencia diretamente o teor dos ACGs nos grãos de café, uma vez que sofrem degradação, formando pigmentos, componentes voláteis do aroma e melanoidinas (CLIFORD, 1999; FERNANDES, 2001). Vignoli e colaboradores (2014) observaram perdas nos teores de 5-ACQ após a torrefação do café arábica de 5,96 para 0,22% e de 6,19 para 0,13% para o café canephora. A perda excessiva de ACGs durante a torrefação compromete seus efeitos fisiológicos, portanto, o emprego dos grãos crus é preferível quando o objetivo é a obtenção dos polifenóis (GETACHEW; CHUN, 2016).

#### 1.2.7.2 Cafeína

A cafeína (FIGURA 4), quimicamente conhecida por 1,3,7-trimetilxantina ou trimetildioxipurina, foi descoberta e isolada do café em 1820 pelo químico Ferdinand Runge na Alemanha. Em razão das suas propriedades fisiológicas e farmacológicas é o composto que apresenta maior estabilidade durante o processo de torrefação. A cafeína constitui cerca de 1 a 2 % do total das bebidas preparadas a partir de café arábica e canephora, respectivamente (TRUGO; MORAES, 2001; MONTEIRO; TRUGO, 2005).

FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DA CAFEÍNA



Classificada como um alcalóide farmacologicamente ativo, a cafeína apresenta oxigênio, hidrogênio, um ou mais nitrogênios em seu esqueleto carbônico e sua estrutura molecular pertence a um grupo de xantinas trimetiladas (SOARES; FONSCA, 2005; TAVARES; SAKATA, 2012).

Derivada da purina, a cafeína é um estimulante do sistema nervoso central, é capaz de bloquear os receptores de adenosina nos neurônios e na medula espinhal e possui inúmeras propriedades benéficas, dentre as quais destacam-se: redução do sono (NOGUEIRA; TRUGO, 2003), estimulação dos batimentos cardíacos e da respiração (TEIXEIRA et al., 2015; YISAK; REDI-ABSHIRO; CHANDRAVANSI, 2018) leve relaxamento muscular, além de diminuir a sensação de fadiga (YISAK; REDI-ABSHIRO; CHANDRAVANSI, 2018). Devido à atividade farmacológica atribuída à cafeína, ela é utilizada em uma variedade de produtos farmacêuticos e alimentares, no entanto, seu consumo deve ser consciente, pois o excesso pode causar alguns efeitos adversos à saúde (CAI et al., 2019; MUSILOVA; KUBICKOVA, 2018; ALVES; BRAGOGNOLO; ALTIMARI et al., 2000).

Nawrot e seus colaboradores (2003) constataram que o consumo moderado de cafeína (máximo de 4,6 mg/kg de peso) por adultos saudáveis em idade reprodutiva não está relacionado a efeitos adversos. No entanto, o consumo superior a 300 mg diários associa-se com o aumento do risco de aborto em mulheres grávidas, além de agravar doenças como gastrite, úlcera e a esofagite (URIJATAN et al., 2006).

Em virtude dos efeitos provocados pela cafeína no sistema nervoso central ou simplesmente pela busca por um estilo de vida mais saudável, alguns

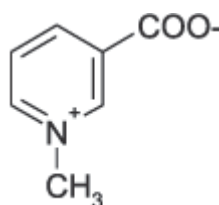


consumidores optam pelo consumo do café descafeinado, onde o conteúdo de cafeína é reduzido para aproximadamente 0,03% (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006; ALTIMARI et al., 2001).

### 1.2.7.3 Trigonelina

A trigonelina (FIGURA 5) é um alcalóide cujo precursor é o ácido nicotínico. Conforme a espécie, a trigonelina está presente em pequenas quantidades nos grãos de café, representando cerca menos de 1,0 e 0,7% do peso seco do café arábica e canephora, respectivamente (DURÁN et al., 2017).

FIGURA 5 - ESTRUTURA QUÍMICA DA TRIGONELINA



Ainda que em pequenas quantidades, a trigonelina desperta interesse devido às suas propriedades sensoriais e nutricionais, posto que, durante o processo de torrefação a trigonelina sofre desmetilação, desempenhando papel importante na formação da niacina (vitamina B3) que atua principalmente no sistema nervoso central, no intestino e na secreção da bile. Tornando o café, um dos únicos alimentos que quando processado tem o seu teor de vitamina aumentado. Assim como a cafeína, a trigonelina também afeta o sistema nervoso central e tem efeitos na mobilidade intestinal, como sedativo, anti-enxaqueca, antibacteriano, agente antiviral e antitumoral (ARAI et al., 2015; CLARKE; MACRAE, 1985).

### 1.2.8 Química verde

O aumento da preocupação com o meio ambiente e conscientização de que alguns problemas ambientais foram originados a partir de processos químicos fez com que, em meados da década de 1990 a indústria Química demonstrou interesse

em minimizar os impactos ambientais gerados. Nesse contexto, a Química Verde foi introduzida, a fim de reduzir ou eliminar a geração de resíduos decorrentes de processos químicos, principalmente por meio da promoção de pesquisas inovadoras com ênfase no desenvolvimento de tecnologias sustentáveis (COSTA, 2018; RUESGAS-RAMÓN et al., 2017).

Entre os problemas ambientais gerados pela indústria química, destacam-se: geração de efluentes e subprodutos tóxicos e a produção de compostos não biodegradáveis, que comprometem o meio ambiente, alteração as condições climáticas, prejudicando todo o ecossistema no geral (COSTA, 2018) . Segundo Anastas e Warner (1998) a Química Verde consiste em criar e desenvolver processos químicos com o intuito de eliminar ou minimizar a geração de substâncias tóxicas e nocivas ao meio ambiente e à saúde humana.

A Química Verde está cada vez mais introduzida no meio acadêmico, o que levou a comunidade científica a investigar o uso novos solventes e técnicas na extração de compostos bioativos de matrizes vegetais como alternativas aos solventes orgânicos, que são tóxicos e podem comprometer a saúde humana e o meio ambiente, além das técnicas de extração convencionais, que representam elevado gasto energético e alto consumo de solvente (RUESGAS-RAMÓN et al., 2017). Sendo assim, foram propostos “solventes verdes” por serem menos perigosos quando comparados a outros solventes comumente utilizados.

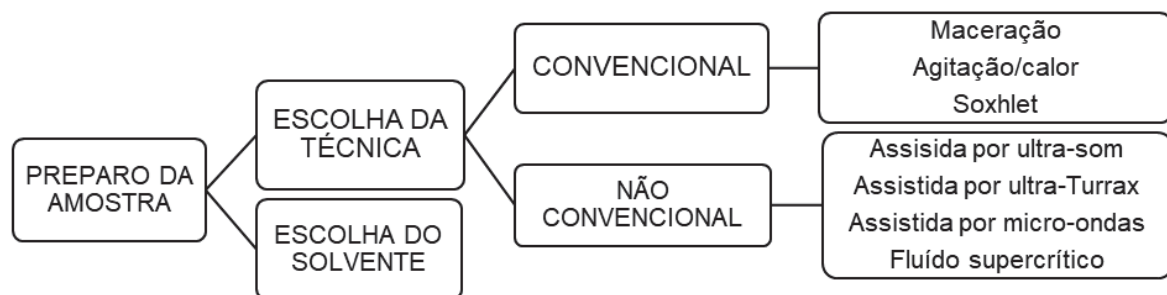
#### 1.2.9 Métodos de extração sólido-líquido de compostos bioativos

A extração sólido-líquido (ESL) é o processo mais frequente na obtenção de extratos ricos em compostos antioxidantes (ANWAR et al., 2015). A ESL é um processo de separação físico-químico que envolve a remoção preferencial de um ou mais componentes de um sólido mediante a aplicação de um solvente líquido, como metanol, etanol, clorofórmio e os solventes verdes (THEODORE; RICCI, 2010). Esse processo é de suma importância em diversos tipos de separações industriais, como por exemplo: recuperação do café solúvel da borra para obtenção de café solúvel, remoção da cafeína no café descafeinado, extração do óleo de soja e do açúcar presente na cana de açúcar (TZIA; LIADAKIS, 2003; CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012).

O rendimento da ESL é afetado por uma série de variáveis independentes, dentre elas: temperatura, concentração de solvente, tamanho de partícula, porosidade, agitação e seleção do solvente. O método de extração utilizado na obtenção de extratos de matrizes vegetais influencia diretamente a qualidade e a composição do produto final. Portanto, a técnica de extração deve ser selecionada de acordo com a estrutura e a composição da matriz, logo, torna-se necessário o conhecimento das propriedades do composto alvo que deseja-se extrair (TZIA; LIADAKIS, 2003; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Os métodos de extração dividem-se em convencionais e não convencionais. Os processos convencionais de ESL compreendem as técnicas de prensagem, maceração e Soxhlet, enquanto os não convencionais englobam extração assistida por micro-ondas, ultrassom, Ultra-Turrax e também a extração empregando fluido supercrítico. Os duas classes de métodos apresentadas variam em função dos custos e do seu nível de complexidade. As etapas envolvidas no processo de extração estão representadas na Figura 6.

FIGURA 6 - ETAPAS QUE COMPREENDEM O PROCESSO DE EXTRAÇÃO



FONTE: A autora (2021)

Os processos de extração convencionais baseiam-se na seleção do solvente associado ao emprego de calor e/ou agitação e são amplamente utilizadas na recuperação de compostos fenólicos a partir de matrizes vegetais (BIESAGA, 2011; WANG; WELLER, 2006). Em contrapartida, os processos de extração não convencionais caracterizam-se por sua alta eficiência. Por esse motivo, os métodos

não convencionais de extração vêm ganhando espaço na comunidade científica na extração de compostos fenólicos de matrizes vegetais.

Deng e seus colaboradores (2017) avaliaram o efeito de um método convencional, representado por maceração, frente a um método não convencional, representado pela extração assistida por ultrassom, na extração de compostos fenólicos presentes nas folhas de oliveira. Os autores concluíram que o método não convencional, resultou em altos rendimentos de extrato, utilizando menores quantidades de solvente, menor tempo e temperatura de extração.

Syakifanaya e seus colaboradores (2019) avaliaram o uso de solventes eutéticos profundos (DES) (betaína:sorbitol (0.5:1.2; 1:1.2; 2:1.2) e betaína:sorbitol:ureia (0.5:1.2:1; 1:1.2:1; 2:1.2:1) com um método de extração não convencional (extração assistida por ultrassom) na extração simultânea de cafeína e ACGs em grãos crus de *C. canephora*. Os autores concluíram que a extração ultrassônica associada a um DES constituído por betaína:sorbitol (1:1.2 m/m) resultou no enriquecimento de cafeína e ACGs nos extratos. Representando um método eficiente, cujo preparo foi relativamente simples, biodegradável e de baixo custo.

Em estudo análogo, Ahmad e colaboradores (2018) utilizaram o método de extração assistida por ultrassom à base de solvente eutético profundo (DES) constituído por ácido láctico:sacarose na extração de polifenóis e cafeína presentes em grãos de café crus de *C. arábica*. Os autores concluíram que a combinação das ondas ultrassônicas com os solventes verdes proporciona altos rendimentos de extrato (87,01 mg GAE. g<sup>-1</sup> e 4,45 mg. g<sup>-1</sup> de cafeína) em um curto período (5 minutos para os polifenóis e 35 minutos para a cafeína).

Bilgin e colaboradores (2013) extraíram compostos antioxidantes de folhas de sálvia empregando diferentes métodos (sohxlet, extração assistida por micro-ondas e ultrassom). Os maiores rendimentos foram obtidos no método convencional, (extração com sohxlet), no entanto, os autores afirmaram que a comparação entre os métodos não pode ser estabelecida, visto que, os métodos não convencionais apresentaram menor tempo de processo e baixo consumo de solvente, visto que no método não convencional os autores utilizaram 10 mL de solvente, em contrapartida, no método não convencional, foram necessários 250 mL de solvente. Os autores ainda ressaltam que o método convencional pode ter desvantagens do ponto de vista da qualidade do extrato, levando a compostos alvo com aromas desagradáveis devido ao longo tempo de extração e altas temperaturas.

Cao e colaboradores (2018) compararam diferentes métodos de ESL (extração assistida por ultrassom e agitação convencional) na obtenção de extratos provenientes de folhas de Ginkgo biloba. Os métodos foram baseados no aquecimento de forma indireta (célula encamisada com banho termostático), além de extração assistida por ultrassom. As diferenças entre os métodos foram pequenas, indicando que técnicas consideradas mais simples podem apresentar eficiência igual ou superior a técnicas convencionais, em um menor período.

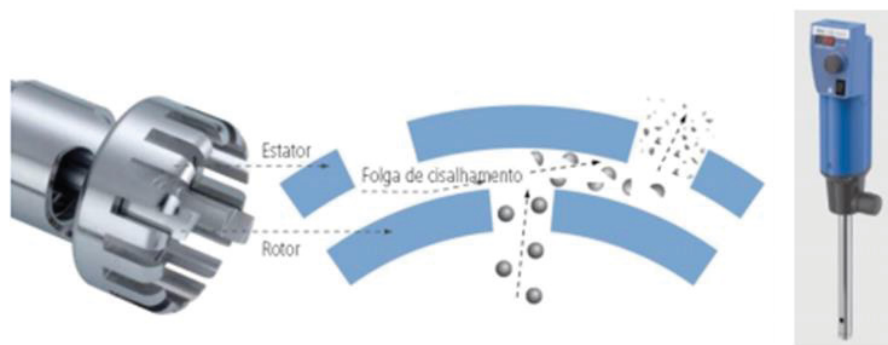
#### 1.2.10 Extração assistida por Ultra-Turrax

O Ultra-Turrax (UT) também pode ser chamado de ultra homogeneizador. Este equipamento é utilizado, principalmente, na produção de emulsões e suspensões, e tem como vantagem a distribuição precisa do tamanho das partículas e uma estabilidade duradoura das emulsões produzidas. A redução no tamanho das partículas é um dos maiores benefícios, visto que muitas reações são limitadas pela área superficial exposta aos reagentes. (IKA, 2016; KRUG, F. J., 2003)

A elevada taxa de cisalhamento em um curto período de tempo é capaz de promover a ruptura do material vegetal, liberando os compostos de interesse para o meio. O tempo necessário para a extração destes compostos é extremamente curto em vista de outros métodos de extração, em decorrência de sua elevada taxa de cisalhamento (XU et al. 2016).

A dispersão da amostra com Ultra-Turrax baseia-se no princípio de rotor-estator conforme ilustra a Figura 7. Neste caso, o motor move-se com uma elevada velocidade perimetral. Conseqüentemente, a rotação produz uma sucção que puxa o meio para dentro do rotor e depois o empurra para fora com auxílio dos dentes presentes no estator. Esse processo leva à pulverização intensiva e momentânea de gotículas de líquido e/ou partículas sólidas (SANTOS, 2016; IKA, 2016).

FIGURA 7 - PRINCÍPIO DE DISPERSÃO DO ULTRA TURRAX



FONTE: IKA (2016)

Pereira e colaboradores (2016) empregaram extração assistida por Ultra-Turrax recuperação de compostos fenólicos da casca de banana. Os autores observaram que este método de extração foi eficiente na obtenção de compostos antioxidantes, uma vez que, com apenas 30 segundos de extração obteve-se um extrato hidroalcolólico com alta atividade antioxidante. Em relação aos métodos tradicionais de extração de biocompostos de matrizes vegetais, o uso do UT promove maior eficiência devido à grande redução do tempo de extração e ao baixo gasto energético.

Bilgin e colaboradores (2013) relataram que a extração assistida por Ultra-Turrax com 50% de etanol (v/v) demonstrou-se eficiente na obtenção de compostos antioxidantes presentes nas folhas de sálvia (*Salvia coccinea*), posto que, este método apresentou menor tempo de extração e baixo consumo de solvente, apenas 10 mL de solvente, frente a 250 mL utilizados na técnica de Soxhlet, representando uma alternativa ecológica e econômica frente aos métodos de extração convencionais. Os autores ainda sugerem que a extração convencional empregando o método de Soxhlet pode apresentar desvantagens em relação a qualidade do extrato, levando a formação de compostos com aromas desagradáveis devido ao longo tempo de extração.

Xu e colaboradores (2016) investigaram a ultrassonografia assistida por Ultra-Turrax (UT-EAU) na extração de cinco ácidos orgânicos (ácido clorogênico (CA), ácido cafeico (CFA), ácido 3,4-dicafeoilquinóico (3,4-DCA), ácido 3,5-dicafeioquinico (3,5-DCA) e ácido 4,5-dicafeioquinico (4,5-DCA)) presentes na flor de *Lonicera japonica* Thunb. Os autores observaram alta eficiência na extração

destes ácidos com o emprego da UT-EAU que pode ser justificada através da cinética de transferência de massa e da distribuição de tamanho de partícula. Os resultados mostraram que a UT-UAE proporciona uma alta velocidade de extração e distribuição uniforme de partículas, apresentando-se com um método rápido, eficiente e ecológico na extração de compostos de interesse de matrizes vegetais.

Teixeira e colaboradores (2015) quantificaram os compostos antioxidantes em extratos de grumixama (*Eugenia brasiliensis* Lam.) das variedades roxa e amarela, obtidos através de seus frutos e sementes, utilizando o Ultra-Turrax. Os autores obtiveram extratos com altos níveis de antocianinas e flavonóides, logo, a extração demonstrou-se eficiente na obtenção destes compostos.

Neste contexto, optou-se pelo emprego do extração não convencional assistida por Ultra-Turrax na obtenção dos compostos bioativos do café por se tratar de um método simples, eficiente, com tempo reduzido de extração e baixo requerimento instrumental.

Além do método, a escolha do solvente adequado também está interligada com a eficiência do processo extração. Propriedades como solubilidade do composto alvo no solvente, tensão interfacial e viscosidade, capacidade de recuperação e toxicidade devem ser levadas em consideração durante a seleção do solvente.

Os solventes orgânicos convencionais como propano, butano, acetato de propila, acetato de etila, etanol, dióxido de carbono, acetona, caracterizam-se por sua eficiência e facilidade de uso, logo, são amplamente aplicados em processos de ESL. No entanto, o seu uso também está associado com uma série de desvantagens, entre elas: alta toxicidade, formação de compostos residuais tóxicos, necessidade de grandes quantidades de solvente, maior resistência à transferência de massa, além de originar possíveis degradações na matriz. Esses efeitos negativos reduzem a qualidade do extrato, limitando sua aplicação em alimentos e fármacos, além de não serem biodegradáveis (SAFDAR et al., 2017; AZMIR et al., 2013; BARBIERI et al., 2020).

Há uma crescente preocupação dos pesquisadores e da comunidade científica em geral com o meio ambiente, bem como a geração de resíduos e o consumo de energia. Portanto, a “extração verde” introduziu-se no meio científico como uma opção sustentável, com o intuito de amenizar a geração de resíduos tóxicos no meio ambiente (BUBALO et al., 2016; TSUKUI; REZENDE, 2014). Nesse

contexto a busca pela substituição dos solventes orgânicos pelos solventes verdes ocorre em virtude da demanda por substâncias atóxicas, seguras, recicláveis e biodegradáveis (CVJETKO BUBALO et al., 2014).

A água é um dos solventes verdes mais utilizados na ESL de biomoléculas. Este solvente é acessível, apresenta baixo custo, boa seletividade além da influência das ligações de hidrogênio durante a transferência de massa. Todavia, o uso da água como solvente extrator limita-se a determinadas faixas de temperatura e sua capacidade calorífica pode resultar em um processo de elevado gasto energético (DOBLE et al., 2017).

A fim de contornar a desvantagens dos solventes orgânicos e voláteis e atender à crescente demanda por solventes ecológicos e biodegradáveis, os líquidos iônicos (ILs) foram desenvolvidos. Os ILs são sais orgânicos cujos cátions e ânions apresentam diferentes características químicas e físicas e ponto de fusão abaixo de 100°C. Entre as vantagens dos ILs destacam-se: baixa pressão de vapor, excelente estabilidade térmica e química e solubilidade de substâncias orgânicas (ZHOU, 2018). Contudo, alguns ILs apresentam custo elevado, síntese complexa e necessidade de processos de purificação para posterior aplicação.

Neste contexto o uso dos DES como solventes na ESL pode solucionar as adversidades impostas pelos solventes orgânicos e pelos solventes verdes citados acima, em virtude de sua síntese relativamente simples, baixa toxicidade e biodegradabilidade.

#### 1.2.11 Solventes eutéticos profundos (DES)

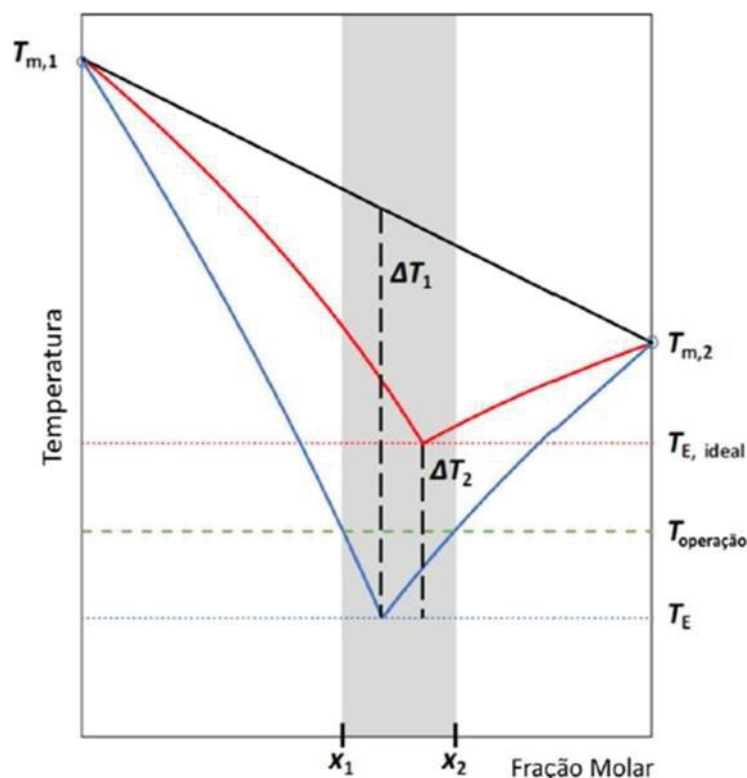
O termo solventes eutéticos profundos ou DES (do inglês, *deep eutectic solvents*) foi mencionado na literatura pela primeira vez no ano de 2003 por Abbott e colaboradores, a fim de intitular a associação de moléculas receptoras de hidrogênio, principalmente sais quaternários de amônio, através de ligações de hidrogênio com diferentes moléculas doadoras de hidrogênio com capacidade de formar complexo com o ânion disponível no sal quaternário. Abbott e colaboradores (2003) sintetizaram um DES a partir da mistura de cloreto de colina e ureia na razão molar 1:2. A mistura dessas duas substâncias resulta em um ponto de fusão de 12 °C, muito inferior quando comparado ao ponto de fusão da colina (302 °C) e da uréia



(133 °C), tornando-se líquido à temperatura ambiente. Desde então a aplicação dos DES tem se difundindo, principalmente como substitutos dos solventes orgânicos convencionais, devido à facilidade de preparo, baixo custo e baixa toxicidade. Coutinho *et al.* (2018) elucidam que essas características associadas aos DES de solventes verdes, dependem dos compostos utilizados para a sua síntese.

Martins e colaboradores (2019) definem uma mistura eutética como associação de dois ou três compostos por meio de ligações de hidrogênio, resultando em uma significativa redução no ponto de fusão. O termo “profundo” relaciona-se ao abaixamento da temperatura de fusão em relação ao comportamento previsto pela hipótese de solução ideal, sendo assim, esse abaixamento da temperatura é definido como a diferença entre a temperatura de fusão da solução ideal e a temperatura de fusão da solução real do ponto eutético, conforme ilustrado pela Figura 8 (MARTINS; PINHO; COUTINHO, 2019).

FIGURA 8 - DIAGRAMA DE FASE SÓLIDO-LÍQUIDO DE UMA MISTURA EUTÉTICA ENTRE DOIS COMPONENTES



FONTE: Adaptado de Martins, Pinho e Coutinho (2016)

Diversos biocompostos, tais como ácidos orgânicos, açúcares, poli-álcoois, aminas e aminoácidos, têm sido utilizados como complexos doadores de hidrogênio (HDB) para a síntese dos DES, uma vez que são compostos seguros e de baixo custo. Para o receptor de hidrogênio (HDA) o cloreto de colina (ChCl) é o principal sal quaternário utilizado em virtude de sua biodegradabilidade, baixo custo e toxicidade, sendo extraído de biomassas ou sintetizado mediante reservas fósseis (ZHANG; VIGIER; JEROME, 2012).

As características físico-químicas dos DES dependem da proporção de HBD e HBA presentes na mistura e de sua natureza química. Os DES são sintetizados através de métodos relativamente simples, visto que envolvem apenas agitação mecânica à temperatura ambiente ou aquecimento. Entretanto, parâmetros como densidade e viscosidade são de extrema importância para sua aplicação.

Os DES demonstram-se promissores em diversas áreas, dentre elas a extração de compostos bioativos de matrizes vegetais, separação e concentração de moléculas como fármacos, constituintes de alimentos, proteínas, entre outras. Além disso, da alta capacidade de extração, os DES também apresentam grande capacidade em estabilizar biomoléculas quando comparados aos solventes orgânicos convencionais. Barbieri e colaboradores (2020) concluíram que os DES à base de cloreto de colina utilizando diferentes HBDs (glicerol, ácido láctico, ácido oxálico e 1,2-propanodiol), apresentaram maior capacidade de estabilização dos compostos fenólicos presentes em alecrim em relação ao etanol. Os autores atribuíram essa capacidade de estabilização as interações intermoleculares, principalmente devido às ligações de hidrogênio entre os compostos fenólicos ácidos encontrados nos extratos.

Sendo assim, nota-se que diversos trabalhos têm como foco o uso de DES em matrizes com alto teor de compostos fenólicos, flavonoides, atividade medicinal e bactericida, devido ao potencial de aplicação dos extratos. Extração de compostos fenólicos de diversas matrizes como *Coffea Canephora* (SYAKFANAYA et al., 2019), *Olea europea* (ATHANASIADIS et al., 2017), *Rosmarinus officinalis L* (BARBIERI et al., 2020), *Chlorella vulgaris* (WAN et al., 2019), Flavonóides em *Flos sophorae* (NAM et al., 2015), isoflavonóides extraídos de subprodutos da soja (BAJKACZ; ADAMEK, 2017), extração de proteínas a partir de resíduo do processamento de óleo de milho (FERREIRA, 2019), entre outras são observadas em inúmeras pesquisas.

### 1.3 Estado da arte

Yuniarti e colaboradores (2019) extraíram cafeína e polifenóis de grãos crus de *C. canephora* utilizando DES. A extração foi realizada com dois diferentes DES constituídos de colina-sorbitol e cloreto de colina-sorbitol-uréia (2: 1, 4: 1 e 6: 1). Os autores avaliaram o efeito da adição da água e o tempo de extração. A maior eficiência foi alcançada com o DES composto por cloreto de colina-sorbitol na proporção de 4: 1 no tempo de 30 minutos. Os autores concluíram que o uso do DES representa uma alternativa na extração de cafeína e ácidos clorogênicos de compostos bioativos presentes nos grãos crus de café.

Syakfanaya e colaboradores (2019) avaliaram diferentes composições de DES associados a extração assistida por ultrassom na extração simultânea de cafeína e ACGs de grãos crus de *C. canephora*. Os autores avaliaram as condições de extração: tempo, adição de água e composição dos DES (betaína:sorbitol e betaína:sorbitol:uréia). Os maiores rendimentos foram obtidos utilizando o DES composto por betaína:sorbitol na proporção 1:1,2, adição de água na proporção de 1:2 durante 30 minutos. Os autores concluíram que a composição do DES, o tempo de extração e a adição de água são parâmetros importantes na extração de cafeína e ACGs em grãos de café crus.

Ahmad e colaboradores (2019) investigaram a extração assistida por ultrassom de cafeína e polifenóis de grãos de café crus de *C. arábica*. Os autores avaliaram diferentes DES, incluindo tempo de extração, razão molar dos DES e razão líquido-sólido. Com base nos resultados, os autores verificaram que o uso de diferentes componentes nos DES (ou seja, ácido láctico-sacarose e ácido cítrico-glicose) resulta em diferentes teores de compostos bioativos. Os maiores conteúdos polifenólicos e de cafeína foram alcançados com DES de ácido láctico:sacarose durante 15 minutos. Os autores concluíram que esses resultados foram obtidos a partir do método alternativo de extração verde rápido, fácil, barato e ecologicamente correto.

Yoo et al. (2018) avaliaram uma série de solventes eutéticos profundos à base de cloreto de colina na extração assistida por ultrassom de compostos bioativos presentes em borra do café. Os autores avaliaram a eficiência de extração

foi avaliada com base no conteúdo fenólico total, conteúdo total de flavonóides, ácidos clorogênicos totais e atividade antioxidante. A maior eficiência foi obtida utilizando um DES composto por 1,6-hexanodiol: cloreto de colina (razão molar 7:1). Além disso, as variáveis: água adicionada ao solvente de extração, a temperatura de extração e o volume do solvente, afetaram a eficiência de extração. As condições ótimas foram: 67,5% p / p do DES com 32,5% p / p de água, temperatura de 60 °C e 2,6 mL de solvente por 100 mg de amostra. Essas condições renderam eficiência de extração significativamente mais alta do que métodos convencionais usando água ou solventes orgânicos aquosos como solvente de extração.

#### 1.4 Considerações finais sobre o estado da arte

Através das informações expostas na revisão bibliográfica observa-se que ambas as variedades de café, *Coffea arábica* e *Coffea canephora* apresentam altos teores de compostos bioativos em sua composição, principalmente ácidos clorogênicos, com elevado potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo*, todavia, o processo de torrefação provoca variações na composição química e na atividade biológica do café. A literatura aponta uma redução da atividade antioxidante dos grãos de café à medida que o grau de torrefação aumenta, o que se associa à degradação dos ácidos clorogênicos, logo, optou-se pelo emprego dos cafés crus para obtenção de extratos com alta atividade antioxidante.

Usualmente os compostos bioativos presentes em matrizes vegetais são extraídos com o uso de solventes orgânicos voláteis (metanol, etanol, acetona, clorofórmio, entre outros). Estes solventes apresentam toxicidade e não são biodegradáveis. Sendo assim, alguns solventes alternativos foram desenvolvidos para obtenção destes compostos, entre eles, os solventes eutéticos profundos (DES) que se caracterizam pela biodegradabilidade e maior biocompatibilidade com as biomoléculas de interesse. Com base nessas características e na necessidade de desenvolver processos de extração com o menor impacto ambiental, o presente estudo buscou explorar o uso de solventes verdes (diferentes DES, água e uma solução de cloreto de colina 50% (m/v)) na extração dos biocompostos presentes nos cafés verdes.

Na busca pelas melhores condições de extração, bem como, avaliação das variáveis do processo entre elas: solvente, técnica e temperatura de extração, optou-se por utilizar um planejamento experimental do tipo delineamento inteiramente casualizado (DIC) com a finalidade de obter um extrato com alto teor de compostos bioativos. Esta ferramenta demonstra-se vantajosa na gama da pesquisa, posto que, proporciona menor número de análises em comparação a outros métodos e ainda sim é capaz de explorar todo o espaço experimental.

## **CAPÍTULO 2 – Objetivos e Escopo**

---

### **2.1 OBJETIVOS**

#### **2.1.1 Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial extrativo de diferentes solventes verdes à base de cloreto de colina e produtos naturais renováveis na extração e preservação da atividade antioxidante de compostos bioativos de duas espécies de café crus, *Coffea arábica* e *Coffea canephora*.

#### **2.1.2 Objetivos específicos**

Quanto a extração dos compostos bioativos presentes nos grãos de café crus de diferentes espécies, este trabalho apresenta os seguintes objetivos específicos:

- Sintetizar DES utilizando cloreto de colina como receptor de hidrogênio (HBA) e diferentes e doadores de hidrogênio (HBDs), entre eles: açúcares, álcoois e ácidos;
- Através de um planejamento experimental do tipo delineamento inteiramente casualizado (DIC) selecionar os

solventes, temperaturas e a técnica com a melhor capacidade de extração de biocompostos;

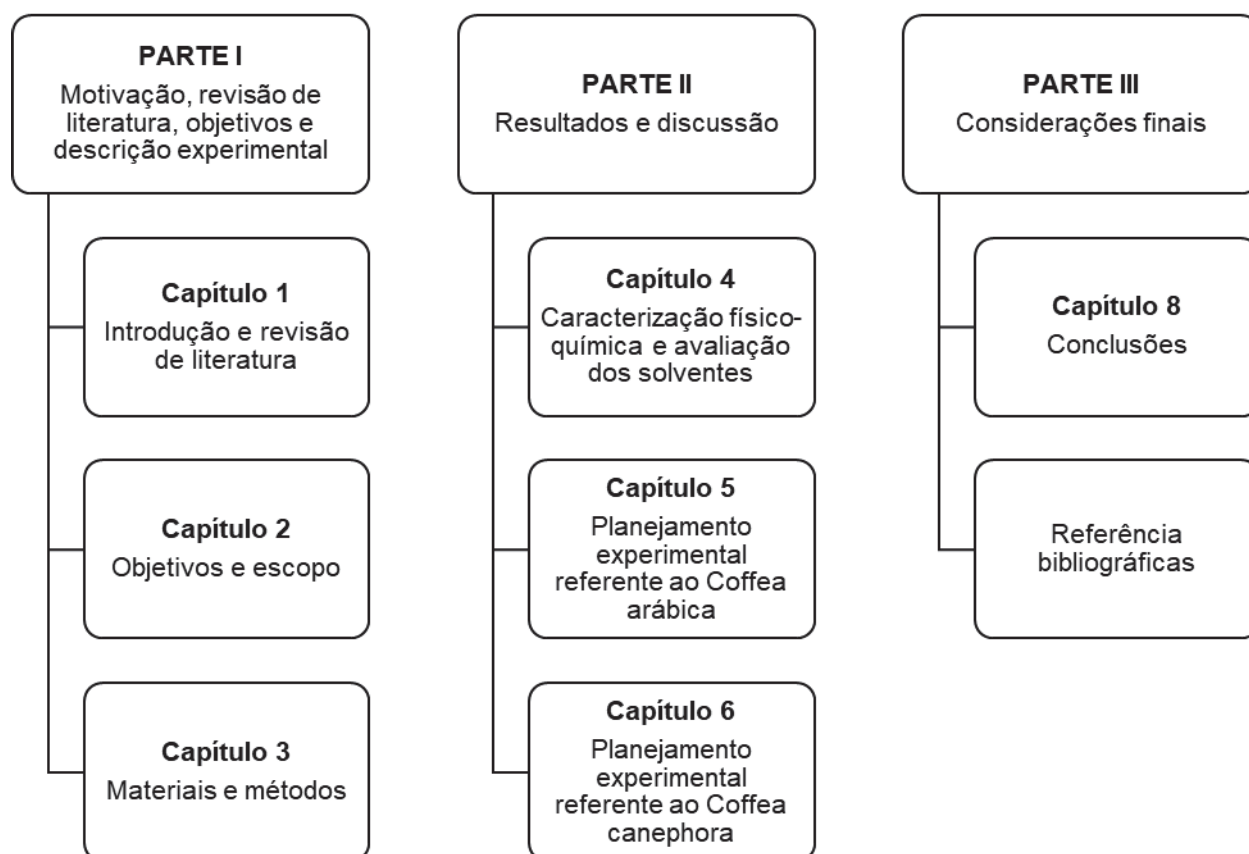
- Estabelecer as condições ótimas de extração (tempo e temperatura) dos compostos antioxidantes;
- Comparar o potencial de extração dos DES frente a outros solventes verdes como: água e uma solução de cloreto de colina 50% (m/v) (ChCl 50%).
- Comparar as duas espécies de café, *Coffea arábica* e *Coffea canephora* em relação ao teor de biocompostos obtidos na extração;
- Caracterizar o perfil de compostos fenólicos dos extratos e quantificá-los utilizando a técnica CLAE-DAD, ou seja, quantificar os principais compostos fenólicos presentes nos extratos através da técnica cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);

## **2.2 Delineamento da dissertação**

Com base nos objetivos propostos e a fim de facilitar o entendimento do trabalho, é apresentado na FIGURA 9 um esquema de organização dessa dissertação.

Na Parte I foi apresentada uma breve revisão de literatura sobre os principais temas abordados neste trabalho, sendo eles: composição química do café considerando as diferentes espécies, métodos de extração sólido líquido e solventes eutéticos profundos (DES). Posteriormente, serão descritas as metodologias utilizadas no trabalho, bem como os resultados obtidos.

FIGURA 9 - ESQUEMA DE ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO



FONTE: A autora (2020)

Na Parte II serão apresentados os resultados. Conforme relatado anteriormente, o presente trabalho engloba as duas principais espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*), logo, optou-se por dividir a apresentação dos resultados (Parte II) em 4 capítulos, como ilustrado pela FIGURA 8, separando os resultados, a partir do planejamento de experimento, para cada uma das espécies estudadas. Os Capítulos 3 e 4 foram integralmente desenvolvidos na Universidade Federal do Paraná (UFPR) enquanto que os Capítulos 5 e 6 foram desenvolvidos parte na UFPR e parte na Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA).

Primeiramente, a fim de conhecer a matéria prima utilizada, bem como as suas propriedades, realizou-se uma caracterização físico-química dos cafés moídos e desidratados (Capítulo 4).

No Capítulo 4 são apresentados os resultados dos processos de ESL empregados na etapa de seleção dos melhores solventes com base nas análises de

compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e FRAP). É importante ressaltar que para a seleção dos solventes mais adequados optou-se por utilizar apenas a espécie arábica, baseando-se no princípio de que os melhores solventes para esta espécie seriam também os mais eficientes para a espécie canephora. Essa etapa é fundamental para as etapas seguintes, uma vez que, apenas os melhores solventes são selecionados para próxima etapa, o planejamento de experimento.

Após selecionar os solventes com base na capacidade de extração, realizou-se a otimização do processo por meio de um planejamento de experimento. Com o intuito de avaliar os parâmetros envolvidos na extração, de modo a selecionar as melhores condições de obtenção dos compostos bioativos do café, em termos de solvente, técnica e temperatura de extração. Após obter as melhores condições, avaliou-se a cinética do processo de extração para definir o tempo ótimo do processo, bem como avaliar a manutenção da atividade antioxidante, que corresponde aos Capítulos 5 e 6, referentes a espécie arábica e canephora, respectivamente. Todas as análises empregadas foram realizadas em triplicata. Após a determinar os melhores parâmetros de extração e os melhores solventes com base na presença de biocompostos de interesse, as amostras foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a fim de quantificar os principais compostos fenólicos presentes nos extratos (perfil fenólico).

Por fim, na Parte III serão apresentadas todas as considerações finais referentes a este trabalho.

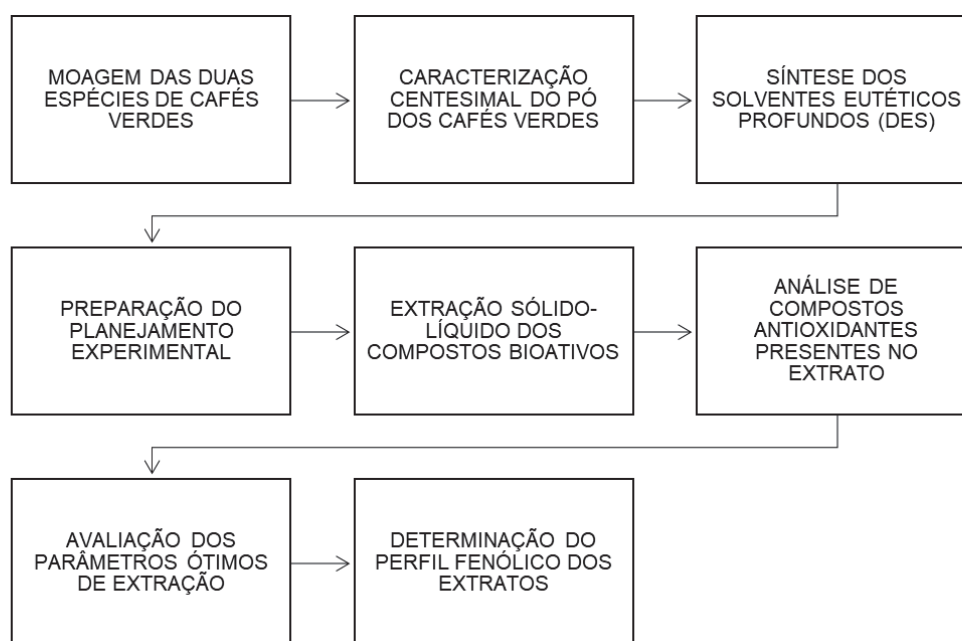


## CAPÍTULO 3 – Material e Métodos

### 3. Material e métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS) do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e em parte no laboratório de cromatografia da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA). A FIGURA 10 representa um fluxograma esquemático do desenvolvimento do presente trabalho.

FIGURA 10 - FLUXOGRAMA GERAL DA METODOLOGIA EXPERIMENTAL UTILIZADA NO PRESENTE TRABALHO



FONTE: A autora (2020)

#### 3.1 Preparo da amostra

Os grãos de café cru da espécie *Coffea arábica* foram doados pela empresa Café do Mercado, localizada no município de Curitiba, Paraná, Brasil e os grãos verdes da espécie *Coffea canephora* foram cedidos pela Cooperativa Cooxupé, localizada no município de Guaxupé, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram

selecionadas e secas em estufa com circulação de ar FABBE a 40 °C durante 24 horas.

Após a secagem, os grãos foram imersos em nitrogênio líquido a fim de facilitar a sua moagem e em seguida foram triturados em liquidificador industrial e tamisados em peneiras de malha de 20 mesh. O pó foi acondicionado em sacos de polietileno de baixa densidade (PEBD), à vácuo em local isento de luz e umidade em temperatura ambiente, a fim de preservar as propriedades dos cafés até a realização das análises.

### 3.2 Caracterização físico-química

A caracterização físico-química da matéria prima foi realizada de acordo com o exposto na Tabela 2.

TABELA 2 - METODOLOGIAS PARA CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DA AMOSTRA

<b>Componente</b>	<b>Método de determinação</b>	<b>Referência</b>
Umidade	Estufa à 105 °C	Adolfo Lutz (2008)
Lipídeos	Extração direta em aparelho Soxhlet utilizando éter de petróleo como solvente	AOAC (2005)
Proteínas	Metodologia de Kjeldahl	Adolfo Lutz (1985)
Fibras	Método enzimático-gravimétrico	AOAC (2005)
Cinzas	Destruição da matéria orgânica em forno mufla 550 °C	Adolfo Lutz (1985)

### 3.3 Preparo dos DES

O preparo dos solventes eutéticos profundos foi realizado conforme a metodologia proposta por DAI e colaboradores (2013) que consiste na pesagem do HBD e HBA em balança analítica (Mettler Toledo, modelo AL204) em proporções molares pré-estabelecidas de acordo com os estudos disponíveis na literatura.

Após a pesagem, as misturas foram aquecidas em banho-maria com agitação orbital *Dubnoff* (Ethik Technology), sendo a temperatura fixada de acordo com as propriedades dos solventes utilizados (60 a 80 °C) até a formação de um líquido homogêneo e transparente. O tempo de síntese variou de 30 minutos a 24 horas, sendo que o DES contendo açúcar em sua composição demandou um maior tempo de formação. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em frascos fechados ao abrigo da luz e armazenadas em estufa à 35 °C até o momento da extração.

O cloreto de colina (ChCl) foi utilizado como HBA fixo e diferentes compostos foram testados como HBD açúcares, álcoois e ácidos orgânicos em diferentes razões moleculares, estabelecidas de acordo com estudos prévios do grupo de pesquisa, a fim de selecionar os DES com os melhores rendimentos de extração para as próximas etapas (TABELA 3). Além dos DESs utilizou-se outros solventes verdes, água e ChCl 50% (m/v), para fins de comparação.

Nesta etapa os solventes foram avaliados com relação a atividade antioxidante (DPPH e FRAP) e teor de compostos fenólicos totais (CFT), deste modo, os solventes que apresentaram os melhores resultados foram selecionados para a etapa seguinte, o planejamento de experimento.

TABELA 3 - HBDs, RAZÃO MOLAR, LOG  $K_{(ow)}$  UTILIZADAS DURANTE A SÍNTESE DOS DES

HDB	Razão Molar HBA: HBD	Log $K_{(ow)}$ HBD	Abreviação
1,2-Propanodiol	1:2	-0,79	CCP
Ácido Lático	1:2	-0.72	CCLA
Ácido Acético	1:2		CCAA
Glicerol	1:2	-1.76	CCGY
Etilenoglicol	1:2	-1.36	CCET
Ureia	2:1	-2.11	CCU
Xilose	2:1	-1.98	CCXY

FONTE: A autora (2021)

### 3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO (ESL)

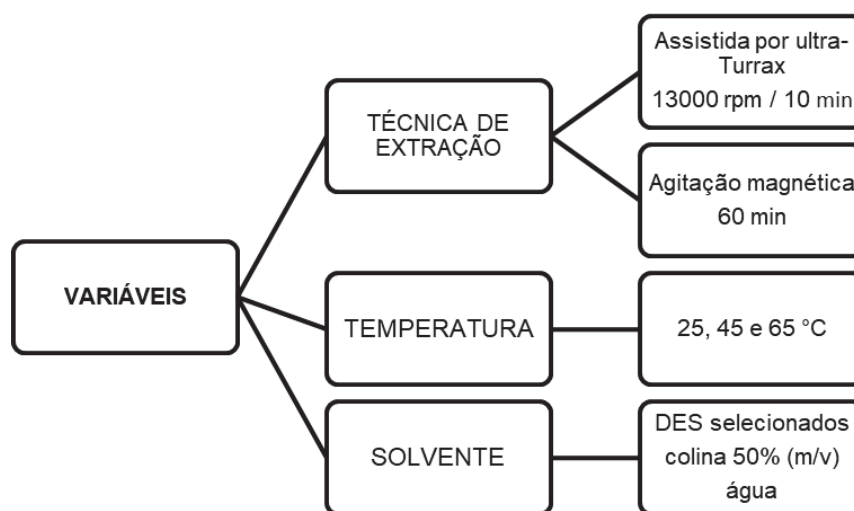
Após a definição dos melhores solventes a serem empregados aplicou-se um planejamento experimental do tipo delineamento inteiramente casualizado (DIC) visando a otimização do processo de extração de compostos bioativos das duas espécies de café.

O planejamento de experimento escolhido foi o planejamento fatorial completo, que se caracteriza por ser um delineamento experimental simples cujo objetivo é qualificar os tratamentos aos ensaios experimentais por um simples sorteio, é comumente utilizado em situações de homogeneidade (PADOVANI, 2014; CUNHA, 2018). Este planejamento apresenta algumas vantagens quando comparado aos demais, dentre elas destacam-se: é um delineamento flexível, uma vez que o número de tratamentos e de repetições depende apenas do número de parcelas disponíveis; a análise estatística é relativamente simples; e o número de graus de liberdade para estimar o erro experimental é o maior possível (CUNHA, 2018).

O planejamento foi composto por 3 variáveis (FIGURA 11), os níveis de cada uma das variáveis estão dispostos na TABELAS 4 e 5. Neste delineamento os tratamentos foram realizados em duplicata totalizando 72 ensaios para a espécie arábica e 32 ensaios para a espécie canephora.

O primeiro planejamento foi realizado com a espécie *Coffea arabica*, logo, mais níveis foram incluídos neste planejamento, dentre eles: a temperatura ambiente de 25 °C e outros dois tipos de DES (CCGY e CCXY). No entanto, esses parâmetros não apresentaram resultados satisfatórios nas análises de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante (DPPH e FRAP) e CLAE. Logo, esses solventes e a temperatura de 25 °C foram eliminados do planejamento experimental com a espécie *Coffea canephora*, de modo a reduzir os níveis das variáveis, economizando reagentes bem como tempo de análise.

FIGURA 11 - VARIÁVEIS UTILIZADAS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL COMPLETO



FONTE: A autora (2021)

TABELA 4 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS APLICADAS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A ESPÉCIE ARÁBICA

Solventes	Temperatura	Extração
CCP (1)	25 (-1)	Agitação (-1)
CCLA (-1)	45 (0)	Turrax (+1)
CCGY (-3)	65 (1)	
CCXY (3)		
ÁGUA (5)		
ChCl 50% (-5)		

TABELA 5 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS APLICADAS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A ESPÉCIE CANEPHORA

Solventes	Temperatura	Extração
CCP (3)	65 (1)	Agitação (-1)
CCLA (1)	45 (-1)	Turrax (+1)
ÁGUA (-3)		
ChCl 50% (-1)		

Com a finalidade de verificar o efeito de cada um dos parâmetros no processo de extração, realizou-se uma regressão linear bem como análise do gráfico de efeitos com o intuito de definir as condições ótimas de extração dos compostos bioativos presentes nos cafés. Avaliou-se o modelo obtido com base no teste F (Fisher-Snedecor), realizado por meio da análise de variância (ANOVA, p valor <0,05 foi considerado significativo) seguida do teste de Tukey para comparação das médias, ao nível de 5% de significância. Todo o planejamento experimental e a análise estatística foram executados com o auxílio do sistema estatístico *Action Stat*. A fórmula geral do modelo de efeitos para o DIC é representada pela equação:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij} \quad (1)$$

Em que:

$Y_{ij}$  = variável dependente (resposta),  $\mu$  = média das médias de cada ensaio,  $\tau_i$  = efeito do ensaio na resposta e  $\epsilon_{ij}$  = o erro experimental associado à resposta.

### 3.5 Extração sólido-líquido dos compostos bioativos

A extração sólido-líquido (ESL) convencional foi realizada em células de vidro encamisadas para controle de temperatura com agitação constante durante 60 minutos em diferentes temperaturas (25, 45 e 65 °C) (FIGURA 11). Foram pesados cerca de 0,250 g de amostra de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, juntamente com 5 mL do solvente. Após a extração, os extratos foram centrifugados a 3500 rpm por 20 minutos (Thermo Scientific – Heraeus fresco 21). O sobrenadante foi coletado e armazenado sob refrigeração, mantidos ao abrigo de luz até o momento das análises. Nesta técnica as amostras foram submetidas a 60 minutos de extração.

FIGURA 12 - SISTEMA EMPREGADO NA EXTRAÇÃO CONVENCIONAL DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDES



FONTE: A autora (2021)

Um método não convencional de ESL foi empregado para fins de comparação. A extração assistida por Ultra-Turrax (IKA T25, Alemanha) foi realizada seguindo os mesmos procedimentos da ESL com agitação magnética em termos de preparo da amostra, razão sólido líquido, centrifugação, coleta e armazenamento do sobrenadante. Nesta técnica as amostras foram submetidas a uma rotação de 13.000 rpm, e o tempo de extração empregado foi reduzido para 10 minutos.

FIGURA 13 - SISTEMA NÃO CONVENCIONAL EMPREGADO NA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE



FONTE: A autora (2021)

Primeiramente, testes preliminares foram realizados, onde avaliou-se o potencial de extração com base nas análises de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante (DPPH). A extração empregando água, ChCl 50% e os DES listados na TABELA 2 foram realizadas nas temperaturas de 25, 45 e 65 °C. Nesta etapa, o tempo de extração foi de 120 minutos. Os solventes que apresentaram os melhores resultados foram submetidos ao planejamento experimental do tipo delineamento inteiramente casualizado (DIC), onde avaliou-se o efeito do solvente, temperatura e da técnica na eficiência do processo de extração.

### 3.6 Avaliação dos extratos

#### 3.6.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais por Folin Ciocalteu

A determinação dos fenólicos totais foi realizada por meio da metodologia proposta por Singleton e Rossi (1995) e modificada por Bakirtzi, Trianta e Makris (2016) empregando o reagente Folin Ciocalteu, solução composta por íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos, fosfomolibdicos e



fosfotungsticos (NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009). Foi construída uma curva de calibração com ácido gálico variando as concentrações de 0,1 a 0,8 mg.mL<sup>-1</sup>.

Inicialmente adicionou-se em tubos de ensaio 1,68 mL de água, 20 µL de extrato de café diluído em água (1:5 v/v) e 100 µL de reagente Folin Ciocalteu. Em seguida a amostra foi mantida em repouso durante 3 minutos. Posteriormente adicionou-se 200 µL de carbonato de sódio a fim de interromper a reação. Por fim, agitou-se em vórtice (Gomixer, MX-S), sendo na sequência mantida sob repouso ao abrigo de luz durante 1 hora. O branco foi preparado através de uma mistura nas mesmas quantidades empregadas de água, reagente Folin Ciocalteu e carbonato de sódio. Após a incubação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro de UV-Vis (Shimadzu UV-1700) em um comprimento de onda de 720 nm. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por mL do extrato (mgAG/mL).

### 3.6.2 Determinação da atividade antioxidante

O alto potencial antioxidante de matrizes vegetais é associado a diversos benefícios para a saúde humana. Existem inúmeras metodologias empregadas para a determinação da atividade antioxidante. Nesse trabalho dois métodos foram selecionados para mensurar o potencial antioxidante dos extratos (DPPH e FRAP), posto que, uma metodologia complementa a outra, ou seja, enquanto que o método de DPPH baseia-se na captura do radical orgânico, o método FRAP é fundamentado no poder de redução do metal.

#### 3.6.2.1 Método DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazila)

Esse método consiste em determinar a atividade antioxidante a partir da capacidade da amostra de sequestrar o radical DPPH. A estabilização do radical livre DPPH• através da ação do antioxidante acarreta em uma mudança de coloração da amostra de violeta escuro para violeta claro indicando a atividade antioxidante do composto (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

O método consiste primeiramente na elaboração de uma curva padrão utilizando diferentes soluções contendo metanol e concentrações crescentes do padrão Trolox (0,2 a 0,9 mmol.mL<sup>-1</sup>). Em seguida, 1,95 mL de solução metanólica de DPPH (0,024 g.L<sup>-1</sup>) e uma alíquota de 50 µL da amostra são diluídas em água em uma proporção de 1:10 (v/v), sendo transferida para tubos. Posteriormente esses

tubos foram agitados com o auxílio de um vortex e mantidos sob repouso durante 30 minutos. Após a incubação realizava-se a leitura das amostras em um espectrofotômetro calibrado utilizando metanol como branco em um comprimento de onda de 517 nm. A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) é calculada conforme a EQUAÇÃO 2. Os resultados foram expressos em mg trolox/ g amostra.

$$(2) \quad A\% = 100 - \left\{ \frac{[(Abs amostra - Abs branco) \times 100]}{Abs DPPH} \right\}$$

### 3.6.2.2 Método FRAP

O método FRAP baseia-se na redução do Fe (III) a Fe (II) (BENZIE, STRAIN, 1996). A solução FRAP é formada a partir de uma mistura de acetato de 300 mM<sup>-1</sup> de solução pH 3,6 e 10 mM<sup>-1</sup> de TPTZ (2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina) com 40 mM<sup>-1</sup> de HCl e 20 mM<sup>-1</sup> de solução de cloreto férrico. Em seguida o extrato do café diluído em água é adicionado que por sua vez deverá reagir com a solução FRAP durante 30 minutos. A absorbância é medida no comprimento de onda de 593 nm em espectrofotômetro.

### 3.6.2.3 Avaliação do perfil de composição dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A presença de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos em extratos de grãos crus de cafés, previamente diluídos em água milli-Q (1:10), foi determinada usando um sistema de CLAE com gradiente de fase reversa. O equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é equipado com um sistema de bomba de dois pistões, um desgaseificador, um injetor automático de amostra e um detector de diodos (DAD - Thermo Scientific, Alemanha, modelo Dionex UltiMate 3000). Para ambas as quantificações, 100 µL da amostra foram injetados na coluna Ace 5 C18 (250 mm x 4,6 mm id; 2,6 µm), mantendo-se a 25 ° C.

Para a determinação de cafeína e trigonelina por CLAE, foi utilizada a metodologia proposto por Toci, Farah e Trugo (2006) com adaptações. Cafeína e trigonelina são detectadas por absorção em um comprimento de onda de 272 nm e 265 nm, respectivamente. A fase móvel aplicada na análise consiste em metanol e

água com vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>. O gradiente de eluição foi de: 5% de metanol (3 min) até 15% de metanol (3 min), a 25% (3 min), a 35% (3 min) a 40% (3min).

Os ácidos clorogênicos são detectados por absorção em um comprimento de onda de 360 nm. A fase móvel utilizada consiste em solução tampão de citrato trissódico, concentração de 0,01 mol L<sup>-1</sup> e pH ajustado para 2,5, e metanol, com vazão de 1,0 mL. min<sup>-1</sup>. O gradiente de eluição foi: é 100% da solução de citrato (19 min) a 80% durante 10 min, a 60% durante 10 min, a 100% durante 25 min. Ao comparar a área do pico dos componentes de interesse com a curva de calibração do ácido 5-cafeoilquínico padrão externo (5-CQA), a quantificação dos ácidos clorogênicos é realizada. É possível quantificar cada isômero individualmente de acordo com os coeficientes de extinção molar ( $\epsilon$ ), obtidos na literatura, de acordo com a Equação 3 descrita por Trugo e Macrae (1984). Portanto, foram quantificados os seguintes grupos de isômeros de CGAs: três isômeros de cafeoilquínico nas posições 3, 4 e 5; três isômeros dicafeoilquínicos, nas posições 3,4-, 3,5- e 4,5; e um isômero feruloilquínico.

$$C = \frac{RF \times \epsilon_1 \times M_{r_2} \times A}{\epsilon_2 \times M_{r_1}} \quad \text{Equação (3)}$$

Onde: RF = fator de resposta estabelecido para 5-CQA,  $\epsilon_1$  = absortividade molar de 5-CQA (1,95),  $\epsilon_2$  = absortividade molar do isômero em questão,  $M_{r_1}$  = massa molecular relativa de 5-CQA (354,32  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ),  $M_{r_2}$  = massa molecular relativa do isômero em questão e A = área do isômero alvo.

## PARTE II

### Resultados e Discussão

---

*Nesta parte serão apresentados os resultados obtidos nesta dissertação. Estes resultados foram divididos em 4 Capítulos conforme exposto no Capítulo 2.*

## CAPÍTULO 4 – Caracterização físico-química e avaliação e seleção dos solventes

### 4.1 Composição centesimal dos grãos de café crus

A caracterização físico-química dos grãos crus de café arábica e canephora em termos de teor de umidade em base seca, proteínas, cinzas, fibra alimentar e lipídeos estão descritos na TABELA 6.

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO CENTESIAL DAS AMOSTRAS DE COFFEA ARÁBICA E COFFEA CANEPHORA EM BASE SECA

Componentes (g.100g <sup>-1</sup> )*	<i>Coffea arábica</i>		<i>Coffea canephora</i>	
	<i>Este trabalho</i>	<i>Literatura</i>	<i>Este trabalho</i>	<i>Literatura</i>
Umidade	11,23±0,21	9,33 <sup>(2)</sup> /12,14 <sup>(3)</sup> ,	11,68±0,37	11,72 <sup>(1)</sup>
Proteína	17,06±3,34	14,54 <sup>(2)</sup> /15,11 <sup>(3)</sup> ,	18,03±1,25	19,81 <sup>(1)</sup>
Lipídeos	21,00±1,20	20,00 <sup>(4)</sup> ,	14,87±2,98	13,94 <sup>(1)</sup>
Cinzas	4,58±0,05	5,58 <sup>(2)</sup> /3,77 <sup>(3)</sup> ,	5,92±1,77	5,43 <sup>(1)</sup>
Fibra alimentar	47,42±4,54	51,50 <sup>(4)</sup> ,	50,74±2,23	59,10 <sup>(1)</sup>

\*Média de três repetições ± desvio padrão

<sup>(1)</sup> Do Carmo (2019).

<sup>(2)</sup> Vasconcelo et al., (2004)

<sup>(3)</sup> Lago et al., (2001)

<sup>(4)</sup> Farah (2012)

FONTE: A autora (2021)

Do Carmo (2019) apresenta o valor de umidade de 11,72 g.100g<sup>-1</sup> para *Coffea canephora* e o teor de cinzas, lipídeos e proteínas de 5,43, 3,94 e 19,81 g.100g<sup>-1</sup>, respectivamente. E para carboidratos, a autora encontrou o valor de 59,10 g.100g<sup>-1</sup>, segundo ela, a fração de polissacarídeos nos grãos dessa espécie representa cerca de 50% do peso seco dos grãos, o teor de proteínas pode variar de 11 a 19% enquanto o teor de lipídeos representa de 8 a 14% da composição centesimal (do CARMO, 2019; PEREIRA, VILELA, LOPES, 2000).

Para a espécie *Coffea arábica*, Vasconcelos e colaboradores (2004) encontram o valor de umidade de 9,31 g.100g<sup>-1</sup> e teor de cinzas e proteínas de 5,58 e 14,54 g.100g<sup>-1</sup>, respectivamente. Lago e colaboradores (2001) caracterizam grãos crus de café arábica de diferentes produtores, os autores apresentaram valores de

umidade, cinzas e proteínas nas faixas de 11,79 – 12,49 g.100g<sup>-1</sup>, 3,58 – 3,96 g.100g<sup>-1</sup> e 14,17 – 16,06 g.100g<sup>-1</sup>, respectivamente.

De acordo com Farah (2012) o café cru do tipo arábica apresenta teor de lipídios na faixa de 18 – 22 g.100g<sup>-1</sup> e o teor de fibras pode variar entre 45,01– 58,01 g.100g<sup>-1</sup>. Para Belitz (2009) o teor de lipídios dos grãos crus de café arábica está na faixa de 15 – 18 g.100g<sup>-1</sup>.

Os resultados apresentados pelos trabalhos citados anteriormente estão condizentes com os valores obtidos no presente trabalho, todavia, a composição química dos grãos de café varia em função do genótipo, do ambiente de cultivo, do grau de maturação e das condições de armazenamento pós colheita, à vista disso, uma mesma espécie, pode apresentar variações na composição centesimal, bem como na qualidade dos grãos.

## **4.2 Avaliação e seleção dos solventes para o delineamento inteiramente casualizado (DIC)**

Os extratos de café cru foram avaliados através da determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT) e da atividade antioxidante (AA). Para isso, fez-se necessário verificar a existência de efeito de matriz nas análises colorimétricas, uma vez que, a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição, aumentando ou reduzindo o sinal, e conseqüentemente comprometendo o resultado de análises colorimétricas. A avaliação do efeito de matriz encontra-se no Apêndice 1.

Primeiramente foram selecionados os solventes com a maior capacidade de extração de biocompostos presentes em grãos crus de *Coffea arabica*. Para essa primeira etapa, foi realizada a extração convencional sob agitação magnética variando a temperatura (25 °C, 45 °C e 65 °C), mantendo constante o tempo de 60 minutos e a proporção (m·v<sup>-1</sup>) de 1:20 (Tabela 6).

TABELA 7 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH) DOS EXTRATOS DE CAFÉ ARÁBICA OBTIDOS A PARTIR DE DIFERENTES SOLVENTES E TEMPERATURAS.

HBD	Abreviação	Razão molar	25 °C		45 °C		65 °C	
			CFT <sup>a</sup>	DPPH <sup>b</sup>	CFT <sup>a</sup>	DPPH <sup>b</sup>	CFT <sup>a</sup>	DPPH <sup>b</sup>
1,2-propanodiol	CCP	1:2	29,0±1,12 <sup>ab</sup>	34,4±5,11 <sup>d</sup>	28,8±1,03 <sup>d</sup>	43,6±2,97 <sup>c</sup>	34,3±0,44 <sup>d</sup>	44,8±4,82 <sup>e</sup>
Ácido Láctico	CCLA	1:2	28,2±1,79 <sup>ab</sup>	32,5±0,28 <sup>d</sup>	33,3±1,37 <sup>c</sup>	34,0±2,62 <sup>f</sup>	30,6±2,60 <sup>e</sup>	34,3±0,28 <sup>h</sup>
Ácido acético	CCAA	1:2	23,9±0,21 <sup>ab</sup>	34,7±0,19 <sup>d</sup>	26,9±5,12 <sup>d</sup>	39,3±0,31 <sup>e</sup>	29,3±0,63 <sup>e</sup>	44,5±5,03 <sup>e</sup>
Glicerol	CCGY	1:2	23,4±0,40 <sup>ab</sup>	33,6±1,39 <sup>d</sup>	29,3±0,26 <sup>d</sup>	33,5±0,68 <sup>f</sup>	27,3±1,18 <sup>f</sup>	51,3±4,14 <sup>c</sup>
Etilenoglicol	CCET	1:2	25,3±0,21 <sup>ab</sup>	41,9±1,30 <sup>c</sup>	29,8±4,72 <sup>d</sup>	44,0±0,36 <sup>c</sup>	29,4±0,21 <sup>e</sup>	25,4±1,19 <sup>j</sup>
Uréia	CCU	1:2	22,0±0,48 <sup>c</sup>	30,7±2,71 <sup>d</sup>	18,8±0,20 <sup>f</sup>	33,7±1,34 <sup>f</sup>	32,0±1,10 <sup>d</sup>	36,0±1,56 <sup>g</sup>
Xilose	CCXY	2:1	25,3±1,15 <sup>ab</sup>	17,0±2,88 <sup>e</sup>	25,6±2,02 <sup>d</sup>	33,1±2,87 <sup>f</sup>	41,2±1,71 <sup>b</sup>	41,3±1,29 <sup>f</sup>
Água	-		32,7±0,25 <sup>b</sup>	41,1±5,17 <sup>c</sup>	37,2±0,94 <sup>b</sup>	47,1±0,08 <sup>b</sup>	39,0±0,78 <sup>c</sup>	60,3±2,01 <sup>b</sup>
Etanol	-		24,28±0,29 <sup>ab</sup>	41,2±1,71 <sup>c</sup>	28,7±3,97 <sup>d</sup>	32,0±1,10 <sup>g</sup>	25,2±0,59 <sup>g</sup>	24,2±0,82 <sup>i</sup>
Etanol75%	-		23,2±7,53 <sup>ab</sup>	59,2±3,31 <sup>b</sup>	20,1±5,12 <sup>e</sup>	41,2±1,71 <sup>d</sup>	34,6±7,98 <sup>d</sup>	49,2±0,46 <sup>d</sup>
<b>Cloreto de colina 50%</b>	<b>ChCl 50%</b>		<b>39,2±0,68<sup>a</sup></b>	<b>64,9±1,40<sup>a</sup></b>	<b>39,4±0,72<sup>a</sup></b>	<b>75,0±0,36<sup>a</sup></b>	<b>53,1±0,36<sup>a</sup></b>	<b>79,7±0,26<sup>a</sup></b>

<sup>a</sup> CFT (mg de ácido gálico/g de amostra)

<sup>b</sup> DPPH (mg de trolox/g de amostra)

valores obtidos por meio de anova *one-way*. letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras por meio do teste de tukey com  $p \leq 0,05$ .



A partir dos resultados apresentados na TABELA 6 nota-se que os DES que apresentaram melhor capacidade de extração dos compostos antioxidantes do café foram: CCP, CCLA, CCGY e CCXY. Além dos DES, os demais solventes verdes (água e a ChCl 50%) também apresentaram elevada capacidade de extração, com destaque para ChCl 50%. A maioria dos DES apresentaram eficiência de extração superiores aos extratos contendo etanol em sua composição. Isso se deve ao fato de que grande parte dos solventes orgânicos, como o etanol apresentam limitada biocompatibilidade e ação de degradação dos compostos de interesse (SAFDAR et al., 2017). Sendo assim os solventes selecionados para o delineamento inteiramente casualizado (DIC) foram: CCP, CCLA, CCGY, CCXY, água e ChCl 50%.

Pode-se observar também que a temperatura exerce grande influência na extração dos compostos de interesse, no entanto, a influência deste parâmetro será discutida posteriormente, posto que, é uma das variáveis que compõe planejamento de experimento. O teor de compostos fenólicos nos extratos obtidos à 65 °C variou de 25,25 a 53,11 mg GAE. g<sup>-1</sup> para etanol e ChCl 50 % m/v, respectivamente. Para a atividade antioxidante (DPPH) pode-se observar uma variação entre 24,24 a 79,7 mg<sub>trolox</sub>. g<sup>-1</sup> também para etanol e ChCl 50% m/v, respectivamente.

## **CAPÍTULO 5 – Planejamento fatorial completo para espécie *Coffea arabica***

---

### **5.1 Planejamento fatorial completo utilizado na ESL**

Neste capítulo serão apresentados os resultados provenientes do planejamento de experimento escolhido. O planejamento foi proposto com o intuito de evitar influências de fatores desconhecidos e proporcionar condições para que os tratamentos possam expressar seus reais efeitos (PERECIN, 2013).

Aplicando este planejamento torna-se possível avaliar os principais efeitos que influenciam na busca por um extrato rico em compostos bioativos, além de avaliar também como as interações entre as variáveis independentes irão afetar a composição final do extrato. Os resultados obtidos a partir do DIC para as análises de CFT e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) são apresentados na TABELA 8.

TABELA 8 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS DE DPPH E FRAP DOS EXTRATOS DE GRÃOS CRUS DA ESPÉCIE *COFFEA ARABICA*

Variáveis explanatórias		CFT	DPPH	FRAP	
Solvente	Temperatura (°C)	Técnica	(mg <sub>trolox</sub> ·g <sup>-1</sup> )*	(mg <sub>trolox</sub> ·g <sup>-1</sup> )*	
Água	25	Convencional	22,26±5,76 <sup>db</sup>	36,48±4,46 <sup>eb</sup>	51,71±1,13 <sup>cb</sup>
ChCl 50%	25	Convencional	36,36±2,97 <sup>aa</sup>	49,61±3,63 <sup>ba</sup>	63,92±4,38 <sup>ba</sup>
CCLA	25	Convencional	22,84±0,62 <sup>db</sup>	26,27±0,57 <sup>hc</sup>	44,17±6,27 <sup>cb</sup>
CCP	25	Convencional	18,02±1,22 <sup>eb</sup>	32,21±3,11 <sup>fc</sup>	45,03±6,95 <sup>cb</sup>
CCGY	25	Convencional	20,82±5,95 <sup>eb</sup>	27,07±3,34 <sup>hc</sup>	42,76±4,51 <sup>cb</sup>
CCXY	25	Convencional	12,21±0,60 <sup>gb</sup>	29,74±1,06 <sup>gc</sup>	31,15±4,48 <sup>cc</sup>
Água	25	Não convencional	33,87±0,55 <sup>bb</sup>	44,82±1,62 <sup>cb</sup>	70,64±2,39 <sup>bb</sup>
ChCl 50%	25	Não convencional	36,30±1,17 <sup>aa</sup>	53,57±1,67 <sup>aa</sup>	99,25±2,24 <sup>aa</sup>
CCLA	25	Não convencional	25,45±1,83 <sup>dc</sup>	41,52±2,03 <sup>dc</sup>	59,72±5,20 <sup>bb</sup>
CCP	25	Não convencional	30,82±2,22 <sup>cb</sup>	38,90±2,04 <sup>ed</sup>	66,37±6,21 <sup>bb</sup>
CCGY	25	Não convencional	28,94±2,68 <sup>cb</sup>	36,95±2,09 <sup>ed</sup>	55,42±0,88 <sup>cc</sup>
CCXY	25	Não convencional	22,78±4,52 <sup>fd</sup>	31,72±0,11 <sup>fe</sup>	35,04±0,46 <sup>c</sup>
Água	45	Convencional	31,53±5,13 <sup>cb</sup>	39,4±6,70 <sup>bb</sup>	54,59±3,96 <sup>bb</sup>
ChCl 50%	45	Convencional	45,71±6,31 <sup>ba</sup>	61,51±2,69 <sup>aa</sup>	68,57 ±0,88 <sup>ba</sup>
CCLA	45	Convencional	25,29±2,25 <sup>eb</sup>	34,34±0,15 <sup>bb</sup>	66,43±0,35 <sup>ba</sup>
CCP	45	Convencional	25,87±2,59 <sup>eb</sup>	34,56±2,19 <sup>bb</sup>	62,30±6,66 <sup>ba</sup>
CCGY	45	Convencional	29,08±1,28 <sup>eb</sup>	35,26±6,82 <sup>bb</sup>	43,20±5,85 <sup>cb</sup>

CCXY	45	Convencional	24,01±2,80 <sup>fc</sup>	25,71±1,05 <sup>cb</sup>	46,45±5,98 <sup>bb</sup>
Água	45	Não convencional	39,27±0,20 <sup>cb</sup>	47,65±4,85 <sup>bb</sup>	77,54±1,51 <sup>bb</sup>
ChCl 50%	45	Não convencional	47,52±1,33 <sup>aa</sup>	62,41±1,68 <sup>aa</sup>	101,83±5,03 <sup>aa</sup>
CCLA	45	Não convencional	35,98±2,92 <sup>cc</sup>	38,29±0,79 <sup>bb</sup>	71,69±0,77 <sup>bb</sup>
CCP	45	Não convencional	34,32±0,68 <sup>cd</sup>	44,47±6,75 <sup>bb</sup>	65,23±1,48 <sup>bb</sup>
CCGY	45	Não convencional	30,51±1,73 <sup>de</sup>	44,10±6,35 <sup>bb</sup>	61,32±4,60 <sup>bb</sup>
CCXY	45	Não convencional	26,10±0,39 <sup>ef</sup>	30,69±0,04 <sup>bc</sup>	54,30±6,98 <sup>bc</sup>
Água	65	Convencional	40,26±6,65 <sup>bb</sup>	59,69±6,76 <sup>bb</sup>	87,91±6,18 <sup>bb</sup>
ChCl 50%	65	Convencional	54,55±1,44 <sup>aa</sup>	75,35±2,21 <sup>aa</sup>	112,1±2,65 <sup>fa</sup>
CCLA	65	Convencional	22,40±2,08 <sup>dc</sup>	35,21±4,74 <sup>dd</sup>	69,93±2,40 <sup>cb</sup>
CCP	65	Convencional	27,47±2,32 <sup>bc</sup>	46,98±0,48 <sup>dc</sup>	86,97±6,59 <sup>bb</sup>
CCGY	65	Convencional	23,61±0,92 <sup>dc</sup>	37,14±0,83 <sup>dd</sup>	65,58±7,88 <sup>cb</sup>
CCXY	65	Convencional	17,27±0,32 <sup>ec</sup>	24,08±3,62 <sup>ee</sup>	53,25±3,96 <sup>cc</sup>
Água	65	Não convencional	36,94±0,04 <sup>cb</sup>	39,58±5,39 <sup>dc</sup>	75,99±5,97 <sup>bb</sup>
ChCl 50%	65	Não convencional	46,50±2,15 <sup>ba</sup>	56,32±0,82 <sup>ba</sup>	90,10±3,17 <sup>ca</sup>
CCLA	65	Não convencional	27,63±1,09 <sup>db</sup>	43,57±0,44 <sup>db</sup>	68,57±2,19 <sup>cb</sup>
CCP	65	Não convencional	37,43±6,32 <sup>cb</sup>	49,87±1,32 <sup>cb</sup>	60,11±5,71 <sup>cb</sup>
CCGY	65	Não convencional	27,73±2,93 <sup>db</sup>	49,79±0,35 <sup>cb</sup>	72,23±5,06 <sup>bb</sup>
CCXY	65	Não convencional	29,34±1,82 <sup>db</sup>	28,43±2,34 <sup>ed</sup>	50,35±1,09 <sup>cc</sup>

\*\* Os valores são obtidos a partir de duas repetições ± desvio padrão (DP). Letras sobrescritas diferentes para a mesma coluna significam diferença significativa de acordo com ANOVA e teste de Tukey (p <0,05), onde a primeira letra indica a comparação entre as técnicas na mesma temperatura, e a segunda letra indica a comparação entre os solventes na mesma técnica e temperatura. ChCl 50% representa a solução aquosa de cloreto de colina, CCP é o DES cloreto de colina:1,2-propanodiol; CCLA é o DES cloreto de colina:ácido láctico; CCGY é o DES cloreto de colina:glicerol e CCXY é o DES cloreto de colina:xilose.

### 5.1.1 Compostos fenólicos totais (CFT)

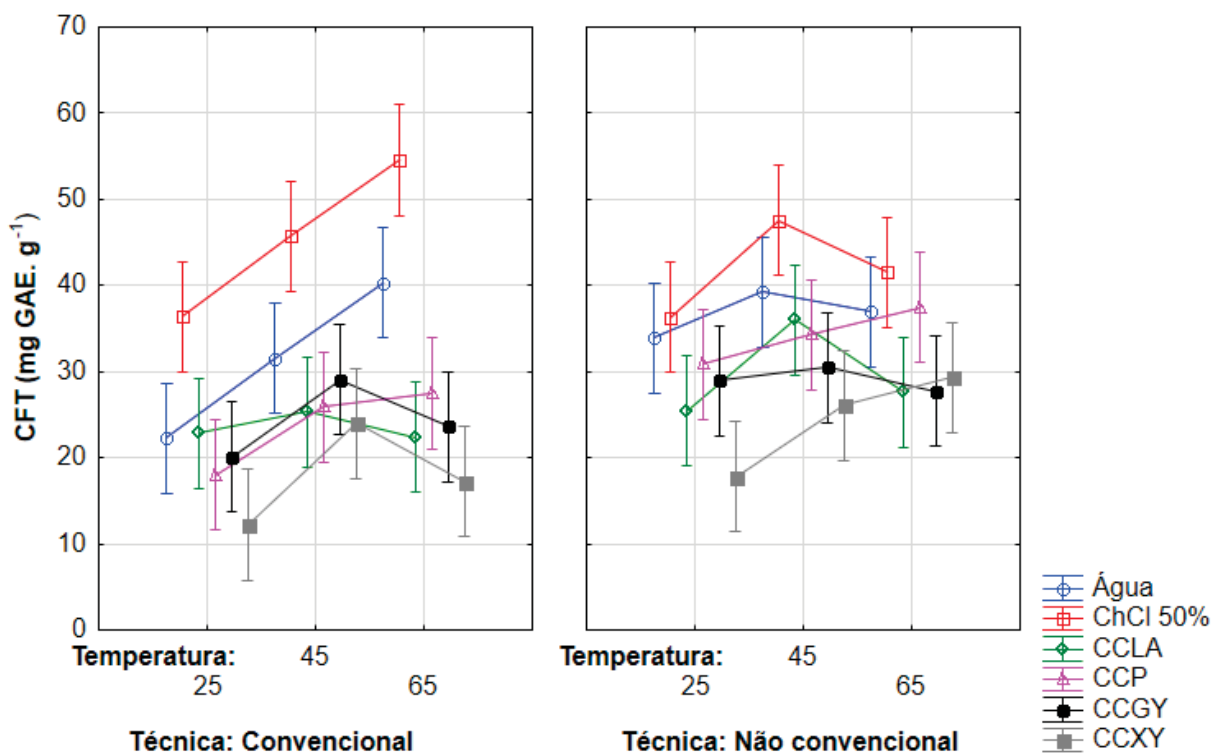
Os extratos obtidos com ChCl 50% apresentaram os maiores rendimentos em termos de CFT nas duas técnicas testadas, atingindo 54,55 mg GAE. g<sup>-1</sup> pelo método convencional e 46,55 mg GAE. g<sup>-1</sup> pela extração assistida por Ultra-Turrax, indicando que a presença do sal de cloreto de colina favorece a obtenção de polifenóis, seguido do extrato aquoso com valores de 40,26 mg GAE. g<sup>-1</sup> pelo método convencional e 39,27 mg GAE. g<sup>-1</sup> pelo método não convencional. Cheong et al. (2013) obtiveram um valor máximo de CFT de 53,76 mg GAE .g<sup>-1</sup> em grãos crus de *C. arabica* na extração por Soxhlet utilizando uma mistura ternária de acetona-metanol-água como solvente. Percebe-se, portanto, que os solventes verdes aqui propostos apresentaram maior eficiência na extração de compostos bioativos quando comparados a solventes orgânicos, os quais já possuem seu uso bem estabelecido. É importante destacar que os solventes utilizados no presente estudo apresentam maior biodegradabilidade e biocompatibilidade, representando um sistema alternativo eficiente e seguro para a recuperação de biocompostos (RUESGAS-RAMÓN et al., 2017).

Por meio do planejamento, nota-se que o processo de extração dos compostos fenólicos foi significativamente afetado principalmente pelo tipo de solvente utilizado, seguido pela temperatura e técnica de extração ( $p < 0,05$ ) (TABELA 9). Em relação à interação entre as variáveis, nota-se que apenas a interação entre os solventes com a técnica de extração é significativa na obtenção de polifenóis ( $p < 0,05$ ). As interações entre solventes e temperatura, e entre temperatura e técnica não foram significativas no processo de extração ( $p > 0,05$ ). Na FIGURA 14 são apresentados os gráficos de efeitos relativos a esse planejamento.

TABELA 9 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE AO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE EXTRATOS PROVENIENTES DE COFFEA ARÁBICA

Fatores	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Solvente	5	3661,23	732,24	27,37	1,30E-14
Temperatura	2	823,28	411,64	15,39	3,60E-06
Técnica	1	436,26	436,26	16,31	0,00
Solvente:Temperatura	10	264,15	26,41	1,17	0,32
Solvente:Técnica	5	330,13	66,02	2,94	0,02
Temperatura:Técnica	2	59,80	29,90	1,33	0,27

Figura 14 - GRÁFICO DE EFEITOS PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (COFFEA ARÁBICA)



\***Legenda:** Solventes: -5 (COLINA 50%); -3 (CCP); -1 (CCLA); 1 (CCGY); 3 (CCXY); 5 (ÁGUA).  
 Temperatura: -1 (25 °C); 0 (45 °C); 1 (65 °C). Extração: -1 (Agitação); 1 (Ultra-Turrax).

Os rendimentos de CFT aumentaram com o aumento da temperatura de extração. A influência positiva da temperatura pode estar associada ao seu efeito positivo no coeficiente de difusão do solvente, decorrente da redução da viscosidade dos solventes, e ao aumento da solubilidade das biomoléculas. Portanto, extrações conduzidas em temperaturas mais elevadas, são capazes de acelerar a liberação de metabólitos secundários da matriz da amostra, bem como aumentar a capacidade de extração do solvente (DAI, Y., WITKAMP, G. J., VERPOORTE, R., & CHOI, Y., 2013; MANSUR et al., 2019; RUESGAS-RAMÓN et al., 2017; WEI, 2015). Todavia, o aumento da temperatura deve ser controlado, uma vez que, altas temperaturas podem resultar na degradação de alguns compostos de interesse. Em estudo análogo realizado por Peng e colaboradores (2015) os autores observaram que o rendimento de extração de ácido clorogênico em *Lonicerae japonicae* Flos aumentou

com o aumento da temperatura, todavia, em temperaturas mais elevadas (65 °C) o rendimento da extração diminuiu ligeiramente.

Em geral os extratos submetidos à extração assistida por Ultra-Turrax (método não convencional) proporcionaram maiores rendimentos em termos de CFT em um curto período de tempo quando comparados ao método convencional. O Ultra-Turrax também é conhecido como um homogeneizador de alta velocidade capaz de pulverizar materiais vegetais enquanto extrai compostos de interesse (XU et al., 2016). Xu et al. (2016) constataram que uma das vantagens do Ultra-Turrax é a distribuição de uma partícula estreita e uniforme, o que favorece o processo de transferência de massa.

Em relação ao DES, há uma diferença nas quantidades de CFT extraídas. Lembrando que em todos os DES o mesmo HBA (cloreto de colina) foi utilizado, assim é possível concluir que o HBD tem forte influência no rendimento da extração. Os DES compostos por ácido láctico (CCLA) e 1,2-propanodiol (CCP) proporcionaram os maiores rendimentos, devido à polaridade dos HBDs que compõem a mistura eutética. Os extratos obtidos utilizando DES a base de xilose (CCXY) apresentaram os piores rendimentos em ambas as técnicas, o que pode estar associado à sua alta viscosidade, quando comparado com os demais DES, o que dificulta o processo de transferência de massa. A viscosidade é um dos parâmetros mais importantes e um dos maiores desafios para a aplicação de alguns DES, especialmente DES à base de açúcar (DAI et al., 2013). Yoo et al. (2018) utilizaram DES à base de ChCl na extração de compostos fenólicos de sementes de café e concluíram que os HBDs do açúcar renderam significativamente menos que os demais (aminas, ácidos orgânicos e polialcool), corroborando os resultados encontrados no presente estudo.

## **5.2 Avaliação do perfil fenólico determinado por cromatografia (CLAE-DAD)**

Os compostos bioativos (cafeína, trigonelina e, CGAs) identificados por UPLC nos extratos de sementes brutas de *Coffea arabica* são apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 - TEORES EM BASE SECA (g. 100g<sup>-1</sup>) DE ÁCIDOS CLOROGÊNICOS, CAFEÍNA E TRIGONELINA PRESENTES EM GRÃOS CRUS DE COFFEA ARABICA.

Variáveis Explanatórias		Ácidos clorogênicos (g. 100g <sup>-1</sup> )							Alcalóides (g. 100g <sup>-1</sup> )			
Solvente	T (°C)	Técnica	4,5diCQA	3,5diCQA	3,4diCQA	5-FQA	4-CQA	5-CQA	3-CQA	TOTAL CGA	Cafeína	Trigonelina
Água	25	Convencional	0,01 ± 0,01 <sup>cd</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>cd</sup>	0,01 ± 0,02 <sup>de</sup>	0,31 ± 0,19 <sup>c</sup>	0,36 ± 0,42 <sup>de</sup>	1,73 ± 0,40 <sup>cd</sup>	0,18 ± 1,52 <sup>nd</sup>	2,77 ± 0,08 <sup>h</sup>	1,23 ± 0,04 <sup>ba</sup>	1,10 ± 0,09 <sup>aa</sup>
ChCl50%	25	Convencional	0,20 ± 0,00 <sup>la</sup>	0,24 ± 0,08 <sup>ab</sup>	0,17 ± 0,04 <sup>cb</sup>	0,44 ± 0,07 <sup>cb</sup>	0,81 ± 0,11 <sup>ba</sup>	3,06 ± 0,24 <sup>ba</sup>	0,47 ± 0,12 <sup>ba</sup>	5,41 ± 0,00 <sup>ba</sup>	1,13 ± 0,25 <sup>cb</sup>	0,66 ± 2,83 <sup>bb</sup>
CCLA	25	Convencional	0,18 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,25 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>nd</sup>	0,27 ± 0,05 <sup>cd</sup>	0,33 ± 0,71 <sup>cd</sup>	2,12 ± 0,72 <sup>gb</sup>	0,20 ± 0,00 <sup>gc</sup>	3,50 ± 0,90 <sup>lb</sup>	0,61 ± 0,20 <sup>bc</sup>	0,28 ± 1,69 <sup>cc</sup>
CCP	25	Convencional	0,19 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,13 ± 0,02 <sup>bc</sup>	0,23 ± 0,06 <sup>e</sup>	0,40 ± 0,96 <sup>bc</sup>	2,03 ± 1,03 <sup>hc</sup>	0,20 ± 0,05 <sup>gc</sup>	3,45 ± 0,24 <sup>c</sup>	0,55 ± 0,09 <sup>cd</sup>	0,14 ± 0,16 <sup>dd</sup>
CCGY	25	Convencional	0,18 ± 0,15 <sup>bc</sup>	0,22 ± 0,18 <sup>gc</sup>	0,45 ± 0,12 <sup>aa</sup>	0,65 ± 0,20 <sup>aa</sup>	0,47 ± 0,85 <sup>b</sup>	2,07 ± 0,48 <sup>hb</sup>	0,29 ± 0,03 <sup>db</sup>	3,38 ± 0,02 <sup>gd</sup>	0,37 ± 0,02 <sup>de</sup>	0,31 ± 0,08 <sup>cc</sup>
CCXY	25	Convencional	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Água	25	Não convencional	0,69 ± 0,02 <sup>ff</sup>	0,15 ± 0,03 <sup>he</sup>	0,75 ± 0,00 <sup>he</sup>	0,45 ± 0,04 <sup>cb</sup>	0,67 ± 0,04 <sup>cb</sup>	3,00 ± 1,08 <sup>cb</sup>	0,37 ± 0,03 <sup>cb</sup>	4,13 ± 0,03 <sup>dc</sup>	1,27 ± 0,44 <sup>aa</sup>	1,12 ± 0,00 <sup>aa</sup>
ChCl50%	25	Não convencional	0,31 ± 0,01 <sup>aa</sup>	0,41 ± 0,00 <sup>aa</sup>	0,23 ± 0,00 <sup>ba</sup>	0,54 ± 0,00 <sup>ba</sup>	0,90 ± 0,26 <sup>aa</sup>	3,84 ± 0,85 <sup>aa</sup>	0,49 ± 0,08 <sup>aa</sup>	6,75 ± 0,01 <sup>aa</sup>	1,13 ± 0,55 <sup>bb</sup>	0,71 ± 2,86 <sup>bb</sup>
CCLA	25	Não convencional	0,23 ± 0,07 <sup>db</sup>	0,33 ± 0,10 <sup>bb</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>cb</sup>	0,36 ± 0,03 <sup>ec</sup>	0,49 ± 1,13 <sup>dc</sup>	2,68 ± 0,17 <sup>ec</sup>	0,27 ± 0,06 <sup>ec</sup>	4,54 ± 0,01 <sup>cb</sup>	0,94 ± 0,42 <sup>dc</sup>	0,27 ± 0,56 <sup>cc</sup>
CCP	25	Não convencional	0,18 ± 0,00 <sup>cd</sup>	0,23 ± 0,04 <sup>d</sup>	0,13 ± 0,00 <sup>bd</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>ff</sup>	0,39 ± 0,26 <sup>ff</sup>	2,00 ± 0,08 <sup>ff</sup>	0,22 ± 0,08 <sup>fe</sup>	3,39 ± 0,00 <sup>gd</sup>	0,83 ± 0,12 <sup>ed</sup>	0,25 ± 0,52 <sup>cd</sup>
CCGY	25	Não convencional	0,18 ± 0,03 <sup>cd</sup>	0,23 ± 0,06 <sup>d</sup>	0,14 ± 0,00 <sup>cd</sup>	0,25 ± 0,05 <sup>e</sup>	0,43 ± 0,40 <sup>ge</sup>	2,10 ± 0,31 <sup>ge</sup>	0,20 ± 0,31 <sup>gf</sup>	3,57 ± 0,03 <sup>ee</sup>	0,72 ± 0,35 <sup>ee</sup>	0,28 ± 0,09 <sup>cc</sup>
CCXY	25	Não convencional	0,22 ± 0,04 <sup>ec</sup>	0,29 ± 0,12 <sup>cc</sup>	0,15 ± 0,08 <sup>dc</sup>	0,29 ± 0,12 <sup>gd</sup>	0,48 ± 0,26 <sup>ed</sup>	2,49 ± 0,92 <sup>fd</sup>	0,26 ± 0,13 <sup>fe</sup>	4,19 ± 1,71 <sup>dc</sup>	0,64 ± 0,27 <sup>gf</sup>	0,28 ± 1,53 <sup>cc</sup>
Água	45	Convencional	0,79 ± 0,02 <sup>ff</sup>	0,18 ± 0,03 <sup>ee</sup>	0,88 ± 0,04 <sup>ff</sup>	0,48 ± 0,04 <sup>cb</sup>	0,75 ± 0,22 <sup>cb</sup>	2,87 ± 1,64 <sup>db</sup>	0,39 ± 0,31 <sup>cb</sup>	5,03 ± 0,18 <sup>cb</sup>	1,42 ± 0,09 <sup>aa</sup>	1,31 ± 1,93 <sup>aa</sup>
ChCl50%	45	Convencional	0,27 ± 0,09 <sup>ba</sup>	0,34 ± 0,18 <sup>ba</sup>	0,21 ± 0,06 <sup>ba</sup>	0,54 ± 0,11 <sup>ba</sup>	0,95 ± 0,35 <sup>aa</sup>	3,70 ± 1,64 <sup>ba</sup>	0,54 ± 0,13 <sup>aa</sup>	6,57 ± 0,02 <sup>ba</sup>	1,35 ± 0,11 <sup>cb</sup>	0,80 ± 0,22 <sup>cb</sup>
CCLA	45	Convencional	0,17 ± 0,00 <sup>gd</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>gc</sup>	0,12 ± 0,05 <sup>gd</sup>	0,28 ± 0,02 <sup>cc</sup>	0,39 ± 0,09 <sup>gd</sup>	2,10 ± 0,22 <sup>je</sup>	0,21 ± 0,03 <sup>kd</sup>	3,55 ± 0,00 <sup>le</sup>	0,70 ± 0,24 <sup>ed</sup>	0,45 ± 0,49 <sup>ed</sup>
CCP	45	Convencional	0,21 ± 0,07 <sup>eb</sup>	0,26 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,28 ± 0,05 <sup>bd</sup>	0,52 ± 0,17 <sup>c</sup>	2,29 ± 0,38 <sup>hc</sup>	0,25 ± 0,06 <sup>c</sup>	4,00 ± 0,05 <sup>hc</sup>	1,05 ± 0,10 <sup>dc</sup>	0,57 ± 0,26 <sup>dc</sup>
CCGY	45	Convencional	0,20 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,26 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>cd</sup>	0,44 ± 0,09 <sup>de</sup>	2,25 ± 0,02 <sup>id</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>c</sup>	3,83 ± 0,58 <sup>ld</sup>	0,66 ± 0,37 <sup>je</sup>	0,25 ± 0,51 <sup>je</sup>
CCXY	45	Convencional	0,16 ± 0,01 <sup>he</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>hd</sup>	0,11 ± 0,00 <sup>he</sup>	0,21 ± 0,00 <sup>ke</sup>	0,33 ± 2,58 <sup>kf</sup>	1,86 ± 0,33 <sup>kf</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>le</sup>	3,11 ± 0,29 <sup>kf</sup>	0,46 ± 0,02 <sup>kl</sup>	0,12 ± 1,09 <sup>kl</sup>
Água	45	Não convencional	0,33 ± 0,01 <sup>ie</sup>	0,10 ± 0,03 <sup>ie</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>ie</sup>	0,42 ± 0,05 <sup>db</sup>	0,58 ± 0,12 <sup>ec</sup>	2,59 ± 0,43 <sup>ld</sup>	0,31 ± 0,03 <sup>ev</sup>	4,77 ± 0,01 <sup>db</sup>	1,32 ± 0,09 <sup>bb</sup>	1,18 ± 0,53 <sup>ba</sup>
ChCl50%	45	Não convencional	0,36 ± 0,03 <sup>aa</sup>	0,49 ± 0,07 <sup>aa</sup>	0,26 ± 0,08 <sup>aa</sup>	0,56 ± 0,83 <sup>aa</sup>	0,91 ± 0,05 <sup>ba</sup>	4,15 ± 1,20 <sup>aa</sup>	0,51 ± 0,11 <sup>ba</sup>	7,27 ± 0,17 <sup>aa</sup>	1,47 ± 0,69 <sup>ba</sup>	1,17 ± 1,27 <sup>ba</sup>
CCLA	45	Não convencional	0,20 ± 0,00 <sup>fd</sup>	0,28 ± 0,09 <sup>ed</sup>	0,14 ± 0,02 <sup>fd</sup>	0,34 ± 0,04 <sup>fd</sup>	0,45 ± 1,36 <sup>hf</sup>	2,50 ± 0,41 <sup>ge</sup>	0,26 ± 0,05 <sup>le</sup>	4,19 ± 0,01 <sup>ge</sup>	0,97 ± 0,47 <sup>gc</sup>	0,27 ± 0,67 <sup>le</sup>
CCP	45	Não convencional	0,23 ± 0,06 <sup>dc</sup>	0,31 ± 0,15 <sup>dd</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>dc</sup>	0,33 ± 0,06 <sup>ge</sup>	0,51 ± 0,47 <sup>gd</sup>	2,73 ± 0,37 <sup>ec</sup>	0,29 ± 0,03 <sup>fd</sup>	4,59 ± 0,13 <sup>ec</sup>	0,98 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,34 ± 0,19 <sup>gc</sup>
CCGY	45	Não convencional	0,23 ± 0,03 <sup>dc</sup>	0,30 ± 0,07 <sup>dc</sup>	0,16 ± 0,04 <sup>dc</sup>	0,31 ± 0,07 <sup>ff</sup>	0,49 ± 0,06 <sup>fe</sup>	1,61 ± 0,65 <sup>ff</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>ge</sup>	4,40 ± 0,79 <sup>fd</sup>	0,81 ± 0,24 <sup>le</sup>	0,30 ± 0,97 <sup>hd</sup>
CCXY	45	Não convencional	0,26 ± 0,03 <sup>cb</sup>	0,33 ± 0,13 <sup>cb</sup>	0,18 ± 0,05 <sup>cb</sup>	0,36 ± 0,33 <sup>ec</sup>	0,61 ± 0,30 <sup>db</sup>	3,00 ± 0,24 <sup>cb</sup>	0,34 ± 0,09 <sup>db</sup>	5,11 ± 3,27 <sup>cd</sup>	0,87 ± 0,07 <sup>ed</sup>	0,38 ± 0,84 <sup>fb</sup>
Água	65	Convencional	0,25 ± 0,04 <sup>dc</sup>	0,40 ± 0,11 <sup>dc</sup>	0,21 ± 0,04 <sup>dc</sup>	0,78 ± 0,03 <sup>aa</sup>	1,23 ± 0,06 <sup>aa</sup>	3,82 ± 1,66 <sup>cb</sup>	0,37 ± 0,03 <sup>db</sup>	8,11 ± 0,20 <sup>ba</sup>	2,02 ± 0,12 <sup>aa</sup>	2,01 ± 1,31 <sup>aa</sup>
ChCl50%	65	Convencional	0,34 ± 0,05 <sup>aa</sup>	0,43 ± 0,17 <sup>ba</sup>	0,27 ± 0,06 <sup>ba</sup>	0,62 ± 0,10 <sup>cb</sup>	1,09 ± 0,28 <sup>bb</sup>	4,22 ± 0,72 <sup>ba</sup>	0,62 ± 0,04 <sup>aa</sup>	7,60 ± 0,00 <sup>cb</sup>	1,45 ± 0,57 <sup>bb</sup>	0,70 ± 3,36 <sup>db</sup>
CCLA	65	Convencional	0,18 ± 0,10 <sup>he</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>ie</sup>	0,12 ± 0,00 <sup>ie</sup>	0,30 ± 0,00 <sup>jd</sup>	0,39 ± 0,45 <sup>le</sup>	2,19 ± 0,45 <sup>je</sup>	0,22 ± 0,14 <sup>le</sup>	3,67 ± 0,00 <sup>le</sup>	0,73 ± 0,40 <sup>gc</sup>	0,31 ± 0,26 <sup>hc</sup>
CCP	65	Convencional	0,34 ± 0,06 <sup>bb</sup>	0,43 ± 0,14 <sup>cb</sup>	0,24 ± 0,04 <sup>cb</sup>	0,42 ± 0,06 <sup>ec</sup>	0,61 ± 0,32 <sup>c</sup>	3,65 ± 1,69 <sup>dc</sup>	0,35 ± 0,06 <sup>cc</sup>	6,06 ± 0,01 <sup>dc</sup>	0,68 ± 0,06 <sup>hd</sup>	0,22 ± 0,89 <sup>le</sup>
CCGY	65	Convencional	0,19 ± 0,05 <sup>gd</sup>	0,26 ± 0,04 <sup>gd</sup>	0,13 ± 0,04 <sup>hd</sup>	0,27 ± 0,04 <sup>ke</sup>	0,42 ± 0,12 <sup>ld</sup>	2,24 ± 0,51 <sup>ld</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>ld</sup>	3,78 ± 0,59 <sup>le</sup>	0,66 ± 0,15 <sup>le</sup>	0,24 ± 0,64 <sup>fd</sup>
CCXY	65	Convencional	0,16 ± 0,07 <sup>ff</sup>	0,22 ± 0,07 <sup>ff</sup>	0,11 ± 0,05 <sup>ff</sup>	0,21 ± 0,04 <sup>ff</sup>	0,34 ± 0,12 <sup>ff</sup>	1,18 ± 0,45 <sup>ff</sup>	0,19 ± 0,00 <sup>ff</sup>	3,11 ± 0,57 <sup>ff</sup>	0,49 ± 0,08 <sup>ff</sup>	0,18 ± 0,89 <sup>ff</sup>



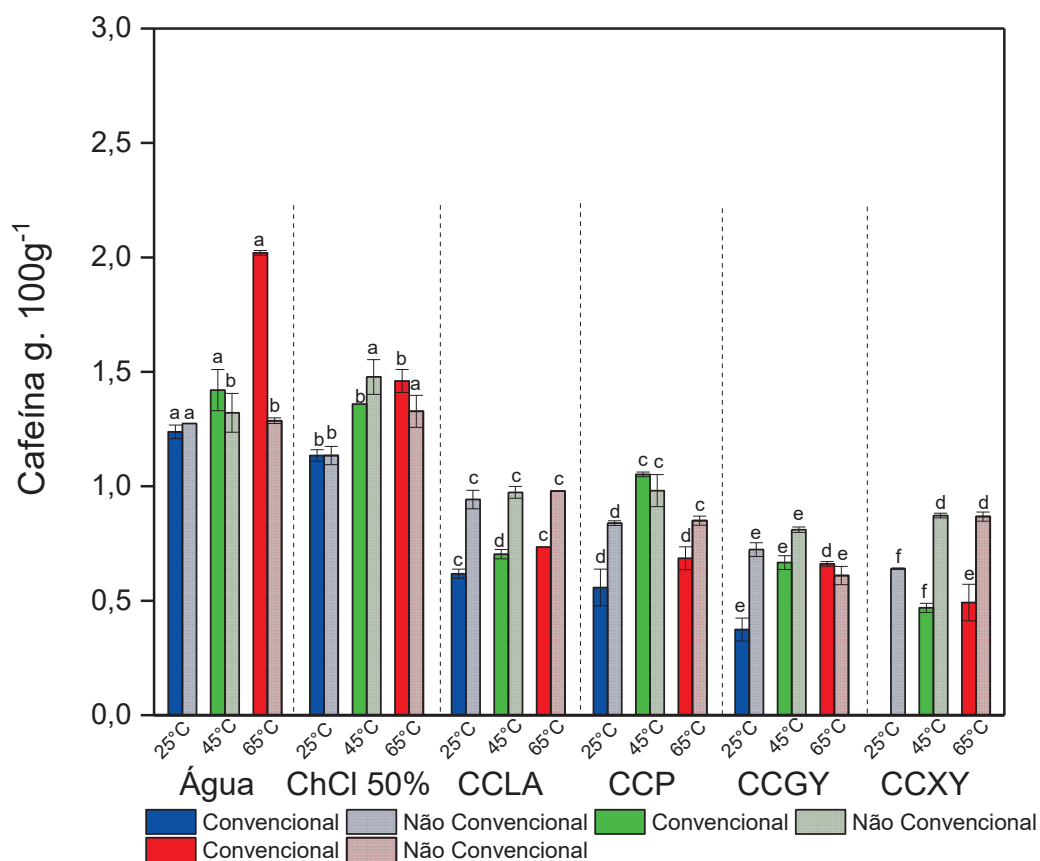
Água	65	Não convencional	0,10 ± 0,01 <sup>ff</sup>	0,19 ± 0,00 <sup>ee</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>je</sup>	0,46 ± 0,12 <sup>db</sup>	0,74 ± 0,19 <sup>db</sup>	2,93 ± 0,52 <sup>ec</sup>	0,39 ± 0,05 <sup>cb</sup>	4,86 ± 0,06 <sup>fc</sup>	1,28 ± 0,28 <sup>cb</sup>	1,14 ± 0,85 <sup>ba</sup>
ChCl50%	65	Não convencional	0,41 ± 0,08 <sup>aa</sup>	0,57 ± 0,11 <sup>aa</sup>	0,30 ± 0,06 <sup>aa</sup>	0,65 ± 0,12 <sup>ba</sup>	1,06 ± 0,30 <sup>ca</sup>	4,60 ± 1,66 <sup>aa</sup>	0,60 ± 0,03 <sup>ba</sup>	8,21 ± 0,00 <sup>aa</sup>	1,32 ± 0,69 <sup>ba</sup>	0,84 ± 3,56 <sup>cb</sup>
CCLA	65	Não convencional	0,23 ± 0,00 <sup>le</sup>	0,32 ± 0,00 <sup>gc</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>gd</sup>	0,36 ± 0,00 <sup>gd</sup>	0,49 ± 0,14 <sup>ff</sup>	2,75 ± 0,31 <sup>he</sup>	0,28 ± 0,10 <sup>gd</sup>	4,62 ± 0,00 <sup>he</sup>	0,97 ± 0,47 <sup>dc</sup>	0,40 ± 0,27 <sup>c</sup>
CCP	65	Não convencional	0,25 ± 0,00 <sup>bc</sup>	0,33 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,17 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,33 ± 0,00 <sup>le</sup>	0,50 ± 0,56 <sup>he</sup>	2,85 ± 0,09 <sup>ld</sup>	0,29 ± 0,18 <sup>fd</sup>	4,75 ± 0,98 <sup>pd</sup>	0,85 ± 0,00 <sup>dc</sup>	0,33 ± 0,70 <sup>pd</sup>
CCGY	65	Não convencional	0,24 ± 0,02 <sup>ed</sup>	0,31 ± 0,04 <sup>hd</sup>	0,17 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,34 ± 0,01 <sup>he</sup>	0,57 ± 0,55 <sup>sd</sup>	2,78 ± 0,04 <sup>gf</sup>	0,27 ± 3,30 <sup>he</sup>	4,72 ± 0,04 <sup>gc</sup>	0,60 ± 0,46 <sup>le</sup>	0,26 ± 0,12 <sup>le</sup>
CCXY	65	Não convencional	0,29 ± 0,48 <sup>cb</sup>	0,38 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>eb</sup>	0,39 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,63 ± 0,53 <sup>ec</sup>	3,19 ± 0,26 <sup>ab</sup>	0,34 ± 0,00 <sup>ec</sup>	5,44 ± 3,81 <sup>eb</sup>	0,86 ± 0,23 <sup>ed</sup>	0,42 ± 1,35 <sup>ec</sup>

\* Os valores foram obtidos a partir de duas repetições ± desvio padrão (DP). Letras sobrescritas diferentes para a mesma coluna significam diferença significativa de acordo com ANOVA e teste de Tukey (p<0,05), onde a primeira letra indica a comparação entre as técnicas (convencionais e não convencionais) na mesma temperatura, e a segunda letra indica a comparação entre solventes na mesma técnica e temperatura. ChCl 50% é a solução aquosa a 50% em peso de cloreto de colina; CCP é o solvente 1,2 propanodiol e cloreto de colina; CCLA é o solvente ácido láctico e cloreto de colina; CCGY é o solvente xilose e cloreto de colina; CCXY é o solvente glicerol e cloreto de colina. Nos diferentes métodos de extração (convencional e não convencional).

## 5.2.1 Cafeína

Para a melhor compreensão dos resultados, estes foram plotados considerando a influência das variáveis (solvente, técnica e temperatura) sobre a extração da cafeína, conforme ilustra a Figura 15.

FIGURA 15 - INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE CAFEÍNA EM EXTRATOS OBTIDOS NO MÉTODO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO (*COFFEA ARÁBICA*)



\* Os valores são obtidos a partir de três repetições  $\pm$  desvio padrão (DP). Letras sobrescritas diferentes para a mesma cor da coluna significam diferença significativa de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), a comparação foi realizada entre os solventes na mesma temperatura e técnica. ChCl 50% é solução de cloreto de colina e água 50% m/v; CCXY é o DES compostos por cloreto de colina e xilose; CCLA compostos por cloreto de colina e ácido láctico; CCP composto por cloreto de colina e 1,2-propanodiol; CCGY composto por cloreto de colina e glicerol.

O extrato aquoso possui teores de cafeína superiores aos demais, atingindo seu valor máximo de 2,02 g. 100 g<sup>-1</sup> no método convencional de extração a 65 °C. O café arábica possui concentrações de cafeína que variam de 0,9 a 1,3 g. 100 g<sup>-1</sup> (TRUGO; MORAES, 2001; MONTEIRO; TRUGO, 2005). Aqui encontramos valores duas vezes maiores, indicando que os métodos e solventes testados são altamente eficientes na obtenção desse alcalóide. Getachew e Chun (2016) realizaram a extração hidrotérmica a 180 e 220 ° C de cafeína em grãos de C. arabica do Vietnã, e obtiveram um rendimento máximo de 1,19 g. 100 g<sup>-1</sup>. A diferença de valores pode ser explicada pelas condições de extração (método e temperatura), bem como pela localização geográfica. Porém, como o presente trabalho consiste na busca de um método de extração eficiente, ecológico e econômico, optou-se por não utilizar temperaturas acima de 65 ° C, principalmente devido ao gasto energético e também para preservar a atividade antioxidante das biomoléculas.

De modo geral, principalmente no método convencional, o rendimento de cafeína nos extratos aumentou com o aumento da temperatura e isso se deve ao fato de que altas temperaturas resultam no aumento da solubilidade da molécula. A natureza das estruturas oligoméricas dos grãos influencia no processo de extração desse alcalóide, uma vez que a cafeína presente na casca do café pode ser extraída à temperatura ambiente (25 °C) devido à sua alta transferência de massa, facilitando o processo de extração. Entretanto, a cafeína presente nas paredes celulares dos grãos está fortemente ligada aos ácidos clorogênicos, formando estruturas oligoméricas insolúveis em água à temperatura ambiente. Portanto, o processo de extração realizado em maiores temperaturas com auxílio de agitação resulta em maiores rendimentos (NARITA; INOUE, 2012; SATO et al., 2018).

A extração assistida por Ultra-Turrax apresentou rendimentos diferentes quando comparada à extração convencional, indicando que a técnica de extração influencia no processo de obtenção da cafeína. No método não convencional, o extrato obtido com ChCl 50% apresentou maiores rendimentos quanto a extração de cafeína (1,47 g. 100 g<sup>-1</sup> de extrato), seguido da extração empregando água como solvente (1,32 g. 100 g<sup>-1</sup> de extrato). Além disso, o método não convencional também resulta em um melhor desempenho dos DES, principalmente devido à alta velocidade de rotação ocasionada pelo Ultra-Turrax, facilitando a transferência de massa, diminuindo os efeitos da viscosidade, resultando em uma melhora no desempenho desses solventes. Nota-se também que as diferenças entre os valores

de cafeína encontrados nos extratos diminuem nessa técnica, ou seja, o Ultra-Turrax anula os efeitos da alta viscosidade associada aos DES, fazendo com que a solubilidade governe o processo de transferência de massa. Para os extratos obtidos com água e ChCl 50%, observa-se que o Ultra-Turrax proporciona menores rendimentos quando comparado ao método convencional, isso pode ser justificado pelo curto período empregado, que possivelmente não foi suficiente para aumentar os rendimentos desses extratos.

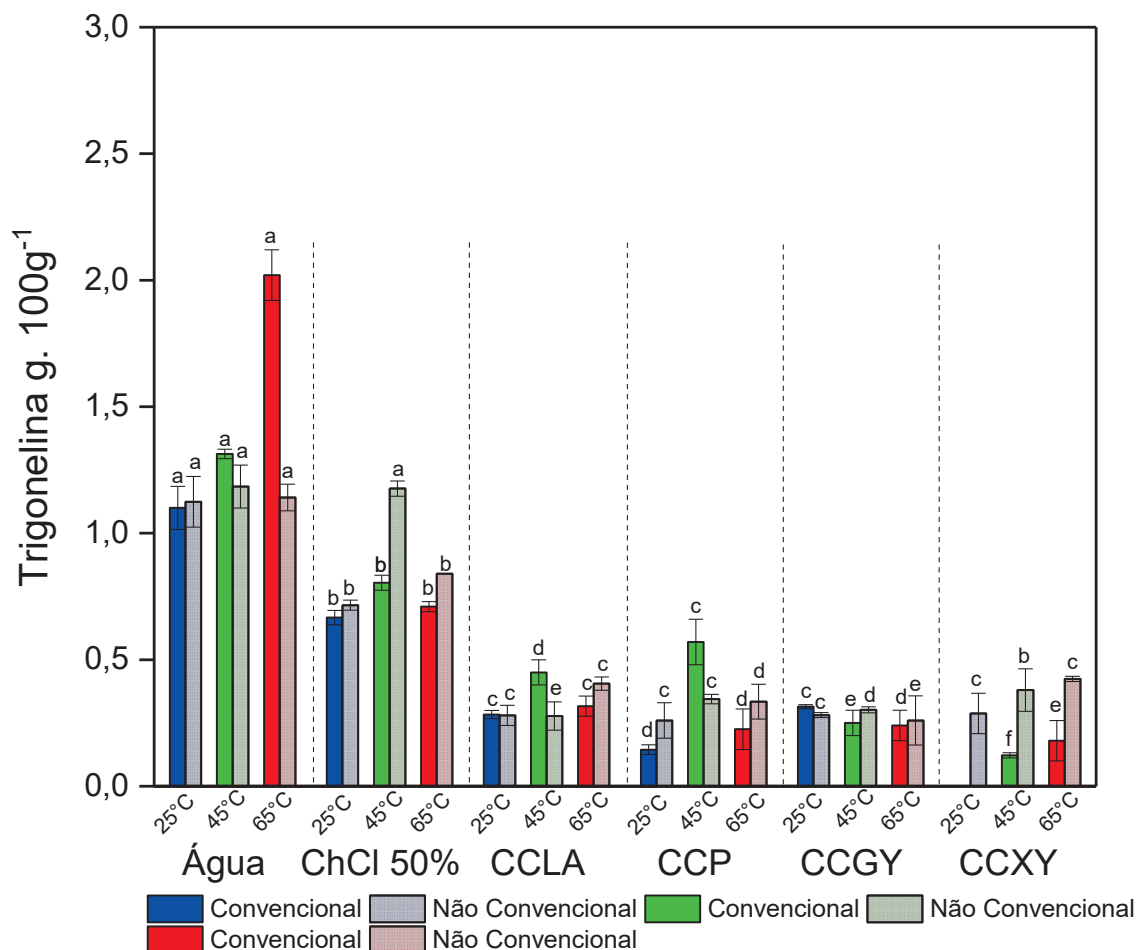
Com relação aos DES, os extratos obtidos com CCP e CCLA apresentaram maiores rendimentos de cafeína, 1,05 e 0,97 g. 100 g<sup>-1</sup>, respectivamente. O coeficiente de partição octanol-água ( $\log K_{(ow)}$ ) dos HBDs pode ser utilizado como indicativo de polaridade para avaliar o processo de extração. Logo, este efeito observado nos DES de CCP e CCLA está de acordo com os valores de  $\log K_{(ow)}$  destes doadores de hidrogênio, -0,79 e -0,72, para CCP e CCLA. Sabe-se que a cafeína apresenta valor de  $\log K_{(ow)}$  igual a -0,55. Portanto, os DES compostos por 1,2-propanodiol e ácido láctico, por apresentarem caráter mais hidrofílico e valor de  $\log K_{(ow)}$  mais próximo ao da cafeína em relação aos demais DES, favorecem a extração da molécula, elucidando o fato de os extratos obtidos com estes solventes apresentarem maiores rendimentos.

Em estudo análogo, Ahmad et al. (2018) realizaram extração assistida por ultrassom a 40 °C de cafeína de grãos de café cru usando DES composto de ácido cítrico-glicose como solvente extrator e obtiveram diferentes rendimentos de cafeína, indicando que o uso de diferentes componentes (HBA e HBD) nos DES resulta em diferentes especificidades dos compostos alvo extraídos.

### **5.2.2 Trigonelina**

Para a melhor compreensão dos resultados, estes foram plotados considerando a influência das variáveis (solvente, técnica e temperatura) sobre a extração da trigonelina, conforme ilustra a Figura 16.

FIGURA 16 - INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE TRIGONELINA EM EXTRATOS OBTIDOS NO MÉTODO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO (*COFFEA ARÁBICA*).



\* Os valores são obtidos a partir de três repetições  $\pm$  desvio padrão (DP). Letras sobrescritas diferentes para a mesma cor da coluna significam diferença significativa de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), a comparação foi realizada entre os solventes na mesma temperatura e técnica. ChCl 50% é solução de cloreto de colina e água 50% m/v; CCXY é o DES compostos por cloreto de colina e xilose; CCLA compostos por cloreto de colina e ácido láctico; CCP compostos por cloreto de colina e 1,2-propanodiol; CCGY compostos por cloreto de colina e glicerol.

A trigonelina, um alcalóide piridínico, foi encontrada em todos os extratos avaliados, indicando que todos os solventes verdes foram capazes de extrair esse alcalóide em diferentes quantidades. O extrato aquoso apresentou maiores rendimentos, atingindo valor máximo de 2,01 g. 100 g<sup>-1</sup> no método convencional a 65 °C.

A obtenção da trigonelina é favorecida com o aumento da temperatura e isso se justifica pela alta solubilidade da trigonelina em altas temperaturas, podendo ser extraída por completo (TRUGO, 2003).

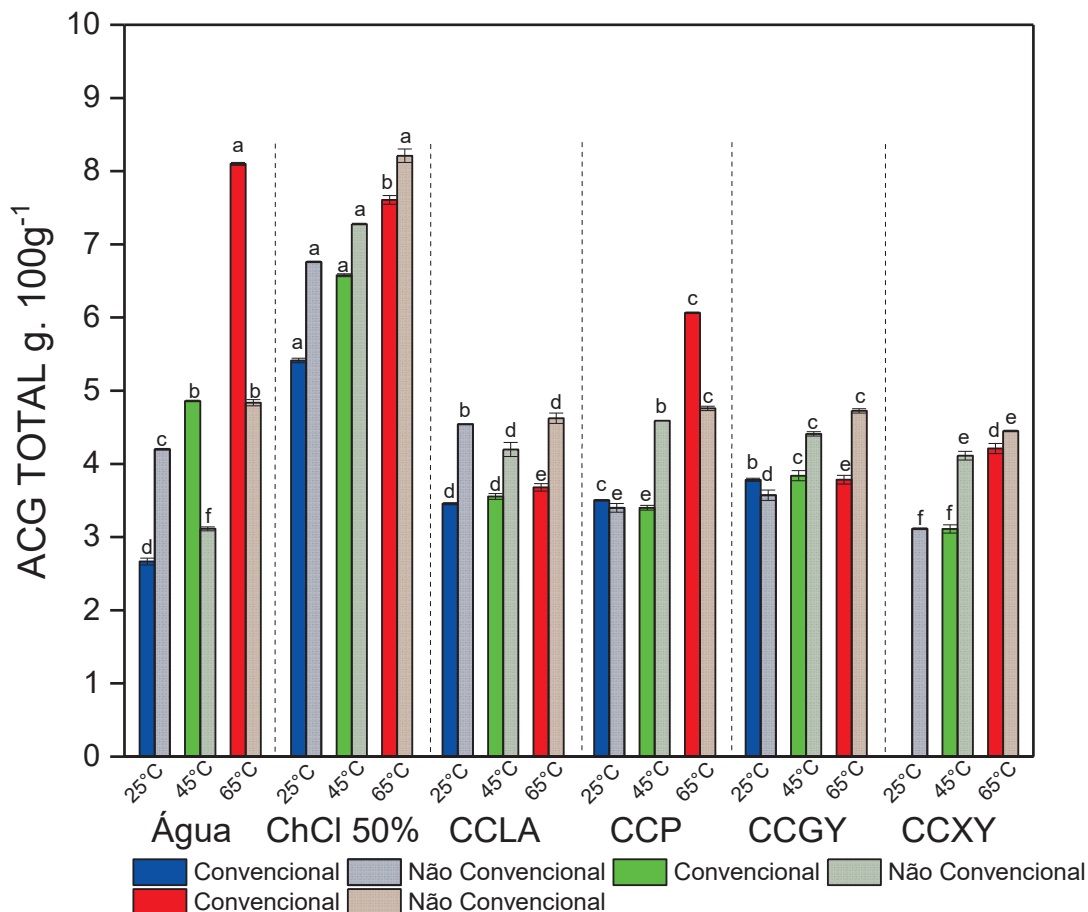
De modo geral, os rendimentos em termos de trigonelina foram menores no método não convencional quando comparados ao método convencional. Neste método, solução aquosa de cloreto de colina apresentou o maior rendimento do extrato, atingindo o valor máximo de 1,17 g. 100 g<sup>-1</sup>. Demonstrando a capacidade do Ultra-Turrax em maximizar o conteúdo de biocompostos nos solventes mais viscosos, principalmente em DES, melhorando o desempenho desses solventes.

Os DES extraíram diferentes quantidades de trigonelina, porém os solventes compostos de ácido láctico (CCLA) e 1,2-propanodiol (CCP) extraíram maiores quantidades, atingindo valores de 0,45 e 0,57 g. 100 g<sup>-1</sup>, respectivamente. Essa variação nas quantidades extraídas entre os DES deve-se principalmente ao fato de que a polaridade do solvente varia de acordo com o doador de hidrogênio utilizado.

### **5.2.3 Ácidos clorogênicos totais**

Os ácidos clorogênicos presentes nos extratos de grãos crus de *C. arábica* foram separados, identificados e quantificados pelo método CLAE-DAD estabelecido. Os resultados de ACGs totais consistem na soma dos isômeros determinados, sendo eles: 4,5 dicafeoilquínico (4,5-diCQA); 3,5 dicafeoilquínico (3,5-diCQA); 3,4 dicafeoilquínico (3,4diCQA); 5 ferrulioquínico (5-FQA); 4 cafeoilquínico (4-CQA); 5 cafeoilquínico (5-CQA); 3 cafeoilquínico (3-CQA). Os valores de ACGs foram expressos em base seca (Figura 17).

FIGURA 17 - INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE ACG EM EXTRATOS OBTIDOS NO MÉTODO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO (*COFFEA ARÁBICA*).



\* Os valores são obtidos a partir de três repetições  $\pm$  desvio padrão (DP). Letras sobrescritas diferentes para a mesma cor da coluna significam diferença significativa de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A comparação foi realizada entre os solventes na mesma temperatura e técnica. ChCl 50% é solução de cloreto de colina e água 50% m/v; CCXY é o DES compostos por cloreto de colina e xilose; CCLA compostos por cloreto de colina e ácido láctico; CCP compostos por cloreto de colina e 1,2-propanodiol; CCGY compostos por cloreto de colina e glicerol.

Os ACGs, seguido da cafeína, foram os compostos bioativos encontrados em maiores quantidades em todas as amostras. O maior rendimento do extrato em termos de ACGs foi obtido utilizando-se ChCl 50% como solvente, atingindo valores máximos de 7,76 e 8,21 g. 100 g<sup>-1</sup>, para os métodos convencional e método não convencional, respectivamente, seguido do extrato aquoso, atingindo valores de 4,86 e 8,01 g. 100 g<sup>-1</sup>, para o método não convencional e método convencional, respectivamente.

Extrações conduzidas em temperaturas mais elevadas mostraram-se mais eficientes na obtenção de ACGs. O aumento da temperatura interfere positivamente no processo de extração, principalmente em DES, devido à alta viscosidade atribuída a esses solventes (DAI et al., 2013).

A extração assistida por Ultra-Turrax aumenta a presença de ACGs em todos os extratos, exceto no extrato aquoso. Para solventes de baixa viscosidade o Ultra-Turrax não melhora o processo de extração obtido com agitação. Em contrapartida, os extratos contendo DES e ChCl 50% apresentam maior viscosidade quando comparados ao extrato aquoso. Portanto, o método não convencional tem se mostrado promissor na obtenção de ACGs quando se trata de solventes viscosos, uma vez que a agitação mecânica em alta velocidade promovida pelo equipamento resulta na ruptura de material vegetal, liberando os compostos de interesse do interior da célula para o solvente.

As diferentes composições de HBA:HBD resultam em extratos com diferentes rendimentos de ACGs. Isso deve-se às diferentes propriedades físico-químicas, como as interações de hidrogênio e polaridade, por exemplo (YUNIARTI et al., 2019). Portanto, a eficiência de extração está relacionada com o par ChCl:HBD, sendo o maior valor obtido com o par ChCl:1,2-propanodiol (CCP), atingindo valor máximo de 6,06 mg. 100 g<sup>-1</sup>.

Yoo et al. (2018) realizaram a extração de ACG da borra de café utilizando DES com HBA composto por ChCl e variando o HBD, assim como no presente estudo. Os autores observaram que as diferentes combinações de ChCl:HBD proporcionaram diferentes rendimentos de ACG, indicando que o HBD influencia fortemente o desempenho da extração de ACG, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

Em relação aos isômeros dos ácidos monocafeoilquínicos, o 5-CQA foi detectado em maiores quantidades em todos os extratos atingindo valores máximos de 4,60 g. 100 g<sup>-1</sup> (53% do total de CGAs) para o extrato obtido com ChCl 50%, 3,82 g. 100 g<sup>-1</sup> (47% do total de CGAs) para o extrato aquoso, 3,65 g. 100 g<sup>-1</sup> (60% do total de CGAs) para extrato à base de CCP, 3,19 g. 100g<sup>-1</sup> (63% do total de CGAs) para extrato à base de CCXY, 2,78 g. 100 g<sup>-1</sup> (58% do total de CGAs) para extrato à base de CCGY e 2,75 g. 100 g<sup>-1</sup> (59% do total de CGAs) para o extrato à base de CCLA. Esses resultados representam uma variabilidade de 47 a 63% do total, o que



está de acordo com Farah e Donangelo (2006), que relata variabilidade deste isômero em torno de 56-62 % do CGA total em grãos de café crus.

Os isômeros 3-CQA e 4-CQA foram encontrados em menor quantidade quando comparados ao 5-CQA. Para o isômero 3-CQA, os valores variaram de 0,12 g. 100 g<sup>-1</sup> para o extrato aquoso, a 0,62 g. 100 g<sup>-1</sup> para o extrato encontrado com 50% de ChCl, representando cerca de 6,5 e 8% do total de CGAs, respectivamente. Em relação ao 4-CQA, os valores variam entre 0,33 e 0,91 g. 100 g<sup>-1</sup> também para o extrato aquoso e 50% de ChCl, respectivamente, correspondendo a aproximadamente 9,5 e 12% do total de CGAs relatados nos extratos. De acordo com Badmos et al. (2019) apresentam valores médios de 3,79 g. 100 g<sup>-1</sup> de 5-ACQ em extratos metanólicos de *C. arabica*, valores inferiores aos relatados no presente estudo. O isômero 5-CQA exibe alguns efeitos farmacológicos, com ênfase na atividade antimutagênica, antitumoral, anti-obesidade, anti-hipertensiva, antiinflamatória e antioxidante, tornando o extrato de café cru um potente suplemento para produtos alimentícios (FARAH E DONANGELO, 2006; TOŠOVIĆ ET AL., 2017).

Com relação aos ácidos dicafeoilquínicos, 3,5-diCQA foi encontrado em maiores quantidades, seguido de 4,5-diCQA e 3,4-diCQA, atingindo valores máximos de 0,57, 0,41 e 0,30 g. 100 g<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses valores foram reportados em extratos obtidos com 50% de ChCl no método não convencional a 65 ° C. Os valores encontrados no presente estudo foram superiores aos de Badmos et al. (2019) que encontrou valores de 0,0019 g. 100 g<sup>-1</sup> para 3,4-diCQA, 0,0020 g. 100 g<sup>-1</sup> para 3,5-diCQA e 0,0023 g. 100 g<sup>-1</sup> para 4,5-DiCQA em extratos metanólicos de café.

### **5.3 Atividade antioxidante**

Para a atividade antioxidante, como apresentado pelas Tabelas 11 e 12, tanto no teste DPPH quanto no teste FRAP, nota-se que todas as variáveis tiveram influência significativa no processo de extração ( $p < 0,05$ ), sendo o solvente o mais significativo seguido pela temperatura e técnica de extração. Para ambos os ensaios, apenas o efeito da interação entre as variáveis temperatura e técnica apresentaram dependência significativa ( $p < 0,05$ ). As interações entre solvente e técnica e solvente e temperatura não foram significativas no processo de extração ( $p > 0,05$ ).

Para o ensaio DPPH, a Tabela 8 indica que os extratos obtidos com ChCl 50% compartilharam a maior capacidade antioxidante, atingindo valores máximos de 75,35 mg<sub>trolox.</sub> g<sup>-1</sup> para o método convencional e 62,41 mg<sub>trolox.</sub> g<sup>-1</sup> para o método não convencional, seguido do extrato aquoso com valores de 59,69 mg<sub>trolox.</sub> g<sup>-1</sup> pelo método convencional e 47,65 mg<sub>trolox.</sub> g<sup>-1</sup> pelo método não convencional.

Semelhante à inibição dos radicais DPPH, os extratos obtidos com ChCl 50% compartilharam a maior capacidade de redução do ferro (FRAP). Atingindo os valores de 112,1 e 101,83 mg<sub>trolox.</sub> g<sup>-1</sup> para a técnica convencional e não convencional, respectivamente, seguido do extrato aquoso que atingiu os valores de 87,91 e 77,54 mg<sub>trolox.</sub> g<sup>-1</sup> para o método convencional e não convencional, respectivamente (TABELA 8). Isso pode ser atribuído ao maior conteúdo polifenólico total presente nos extratos, uma vez que se espera uma boa correlação entre a TPC e a atividade antioxidante (DUDONNÉ et al., 2009).

TABELA 11 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH DE EXTRATOS DE COFFEA ARÁBICA

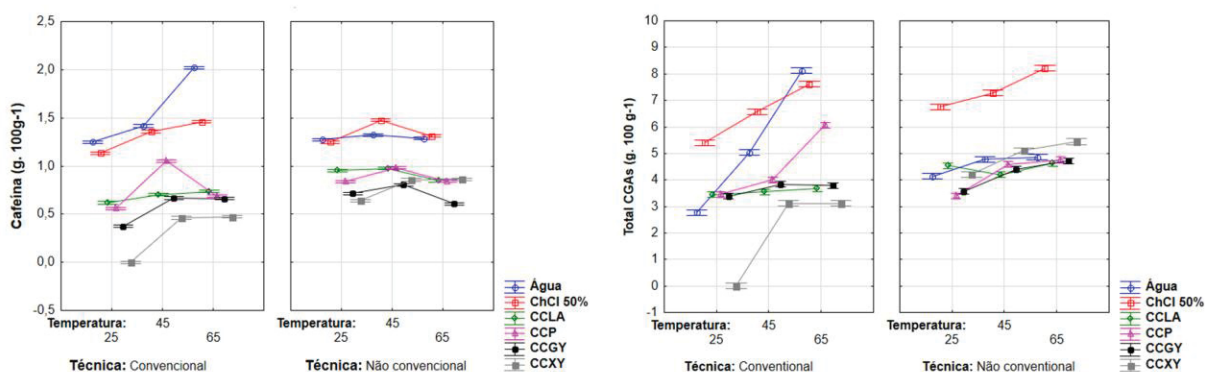
Fatores	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Solvente	5	6604,67	1320,93	23,60	2,75E-13
Temperatura	2	786,98	393,49	7,03	0,00
Técnica	1	287,38	287,38	5,13	0,01
Solvente:Temperatura	10	536,89	53,68	1,15	0,34
Solvente:Técnica	5	532,91	106,58	2,28	0,06
Temperatura:Técnica	2	312,08	156,04	3,34	0,04
Resíduos	46	2143,11	46,58		

TABELA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP DE EXTRATOS DE COFFEA ARÁBICA

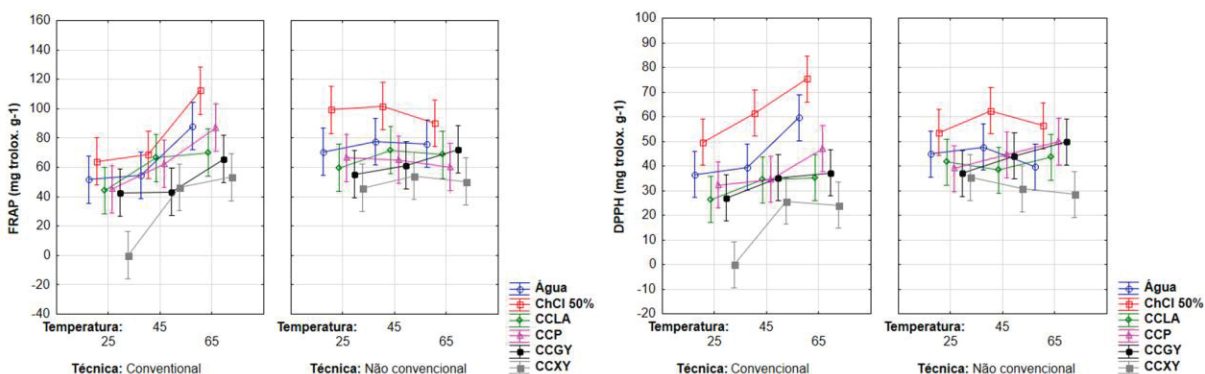
Fatores	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Solvente	5	12990,08	2598,01	16,32	2,65E-10
Temperatura	2	4348,30	2174,15	13,66	1,18E-05
Técnica	1	1078,22	1078,22	6,77	0,01
Solvente:Temperatura	10	678,35	67,83	0,51	0,86
Solvente:Técnica	5	555,34	111,06	0,85	0,52
Temperatura:Técnica	2	2792,47	1396,23	10,70	0,00
Resíduos	46	6000,98	130,45		

FIGURA 18 - EFEITO DAS VARIÁVEIS SOBRE O CONTEÚDO DE CAFÉINA, ACGS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS DE COFFEA ARÁBICA

### Compostos bioativos



### Atividade antioxidante



A Figura 18 mostra uma diferença clara entre os métodos convencionais e não convencionais. Em ambos os casos se nota que o perfil do DPPH e do FRAP acompanham o perfil de extração. No método convencional para os solventes água e ChCl 50%, uma extração máxima para CGAs e cafeína foi alcançada a uma temperatura de 65 ° C e, conseqüentemente, os mesmos níveis elevados de DPPH e FRAP são obtidos. No entanto, no método não convencional, geralmente observa-se que para todos os solventes a quantidade máxima de extração e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) é atingida a uma temperatura de 45 ° C. Uma hipótese para esse fato é que a combinação entre altas temperaturas com a brusca agitação promovida pelo Ultra-Turrax pode comprometer a atividade antioxidante dos extratos, uma vez que polifenóis, como os CGAs, possuem estrutura instável, sendo suscetíveis à degradação (Amodio, Derossi e Colelli, 2013).

Para o ensaio DPPH, conforme ilustra a Figura 17, nota-se que para o método não convencional, apesar dos extratos contendo ChCl 50% e água apresentarem maiores rendimentos em termos de CGAs e cafeína. Observa-se que na temperatura

de 65 °C, a atividade antioxidante desses extratos diminui, o inverso é observado nos extratos contendo DES, que apesar de não apresentarem os maiores rendimentos, nota-se que foram capazes de preservar a atividade antioxidante em altas temperaturas e sob forte agitação mecânica., ou seja, extratos à base de água e ChCl 50%, apresentam capacidade reduzida de preservar a atividade das biomoléculas em comparação ao DES. Portanto, os DES foram mais adequados em manter a atividade antioxidante dos extratos, isto se deve ao fato de que as ligações de hidrogênio entre o HBA e o HBD são capazes de reduzir a movimentação do soluto, diminuindo a exposição ao oxigênio, prevenindo ou retardando a oxidação reação (DAI et al., 2016)

Para o ensaio FRAP, a Figura 18 indica que no método convencional, todos os solventes verdes foram capazes de aumentar a atividade antioxidante dos extratos com o aumento de temperatura. No entanto, no método não convencional, à medida que a temperatura aumenta, os níveis de compostos antioxidantes, tendem a diminuir. Embora haja uma degradação desses biocompostos com o aumento da temperatura, o extrato à base de CCGY demonstrou-se capaz de garantir a manutenção da atividade antioxidante, sendo o único extrato que teve a capacidade antioxidante intensificada com o aumento. da temperatura. A capacidade do DES à base de CCGY em estabilizar compostos antioxidantes pode ser explicada por suas interações intermoleculares, principalmente devido às ligações de hidrogênio entre os polifenóis encontrados nos extratos de café e o solvente (WOJEICCHOWSKI et al. 2020).

Os dois testes utilizados para determinar a capacidade antioxidante revelam que o uso de DES representa uma forma ambientalmente amigável e eficiente de sistemas solventes não tóxicos e ajustáveis para a extração de compostos antioxidantes (ABBOTT et al., 2011).

## **CAPÍTULO 6 – Planejamento fatorial completo para espécie *Coffea canephora***

---

### **6.1 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO UTILIZADO NA ESL**

Neste capítulo serão apresentados os resultados provenientes do planejamento de experimento realizado para a espécie *C. canephora*. O planejamento foi proposto conforme exposto anteriormente (Capítulo 5, Item 5.1). O delineamento realizado para o presente estudo foi o planejamento fatorial completo. Os resultados obtidos a partir do planejamento para as análises de CFT e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) são apresentadas na TABELA 13.

O primeiro planejamento foi realizado empregando a espécie *Coffea arábica* (Capítulo 5), no qual diferentes níveis foram avaliados. A partir dos resultados apresentados nesse primeiro planejamento, os níveis que apresentaram os piores rendimentos para *C. arábica* foram excluídos do dessa etapa do trabalho dedicado a avaliar a espécie *C. canephora*. Portanto, para esta etapa, foram avaliadas apenas as temperaturas de 45 e 65 °C. Os solventes CCXY e CCGY foram retiradas do DIC, permanecendo: água, ChCl 50%, CCLA e CCP. As técnicas de extração foram mantidas as mesmas.

Tabela 13 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS DE DPPH E FRAP DOS EXTRATOS DE GRÃOS CRUS DA ESPÉCIE *COFFEA CANEPHORA*

Variáveis explanatórias		CFT	DPPH	FRAP	
Solvente	Temperatura (°C)	Técnica	(mg <sub>trolox</sub> ·g <sup>-1</sup> )*	(mg <sub>trolox</sub> ·g <sup>-1</sup> )*	
Água	45	Convencional	49,69±2,09 <sup>db</sup>	75,71±0,12 <sup>aa</sup>	106,90±0,46 <sup>db</sup>
ChCl 50%	45	Convencional	58,14±1,29 <sup>ba</sup>	72,15±2,40 <sup>ba</sup>	115,37±1,98 <sup>ba</sup>
CCLA	45	Convencional	31,09±2,56 <sup>gc</sup>	44,99±0,05 <sup>fb</sup>	55,99±2,42 <sup>gc</sup>
CCP	45	Convencional	22,78±2,17 <sup>hd</sup>	30,55±4,03 <sup>gc</sup>	48,31±1,16 <sup>hd</sup>
Água	45	Não convencional	52,39±1,22 <sup>cb</sup>	71,85±1,15 <sup>bcb</sup>	122,58±3,05 <sup>bb</sup>
ChCl 50%	45	Não convencional	61,98±0,36 <sup>aa</sup>	73,17±0,17 <sup>ba</sup>	128,67±2,11 <sup>aa</sup>
CCLA	45	Não convencional	36,18±0,37 <sup>ec</sup>	51,26±0,40 <sup>dc</sup>	69,72±2,85 <sup>fd</sup>
CCP	45	Não convencional	32,44±3,14 <sup>fd</sup>	58,88±0,18 <sup>ed</sup>	52,50±0,20 <sup>ec</sup>
Água	65	Convencional	61,45±0,54 <sup>ca</sup>	73,17±0,17 <sup>aa</sup>	104,91±0,17 <sup>cb</sup>
ChCl 50%	65	Convencional	57,75±0,19 <sup>db</sup>	72,41±1,65 <sup>bb</sup>	118,03±0,57 <sup>ca</sup>
CCLA	65	Convencional	34,61±3,34 <sup>gc</sup>	54,73±0,87 <sup>fc</sup>	68,55±2,08 <sup>hd</sup>
CCP	65	Convencional	33,11±0,75 <sup>gc</sup>	48,85±1,55 <sup>gd</sup>	94,65±0,45 <sup>ec</sup>
Água	65	Não convencional	62,39±0,44 <sup>bb</sup>	73,68±2,67 <sup>aa</sup>	98,48±3,71 <sup>db</sup>
ChCl 50%	65	Não convencional	68,93±0,86 <sup>aa</sup>	71,66±0,12 <sup>ca</sup>	142,56±1,11 <sup>aa</sup>
CCLA	65	Não convencional	47,78±1,37 <sup>ec</sup>	59,30±0,40 <sup>db</sup>	77,71±2,85 <sup>gd</sup>
CCP	65	Não convencional	43,13±2,97 <sup>fd</sup>	58,14±0,18 <sup>ec</sup>	79,20±0,20 <sup>fc</sup>

\*\* Os valores são obtidos a partir de duas repetições  $\pm$  desvio padrão (DP). Letras sobrescritas diferentes para a mesma coluna significam diferença significativa de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), onde a primeira letra indica a comparação entre as técnicas na mesma temperatura, e a segunda letra indica a comparação entre os solventes na mesma técnica e temperatura. ChCl 50% representa a solução aquosa de cloreto de colina, CCP é o DES cloreto de colina:1,2-propanodiol; CCLA é o DES cloreto de colina:ácido láctico.

### 6.1.1 Compostos fenólicos totais (CFT)

Com base nos resultados da TABELA 13, o maior conteúdo polifenólico total foi obtido usando a combinação de água e cloreto de colina como solvente na extração assistida por Ultra-Turrax a 65 °C, atingindo um valor máximo de 68,93 mg GAE. g<sup>-1</sup>. O resultado tem um conteúdo polifenólico total mais alto do que o relatado por Hečimović et al. (2011) (42,37 mg GAE. g<sup>-1</sup>) em extratos de *C. canephora* obtidos com água como solvente extrator em um método convencional de agitação com temperatura controlada 100 °C. Um estudo análogo conduzido por Xu et al. (2015) revela que a extração empregando água subcrítica (170 °C em 30 minutos a 5 MPa) apresentou um rendimento de 47,25 mg GAE. g<sup>-1</sup>. Na comparação com a literatura, é possível associar o maior rendimento obtido no presente estudo com a presença do sal de cloreto de colina e com a técnica de extração utilizada. Portanto, as condições utilizadas neste trabalho proporcionaram extratos com maiores rendimentos em termos de CFT em um curto período (10 minutos) e menores temperaturas, o que configura um processo eficiente e econômico quando comparado com os demais.

Cheong et al. (2013) realizaram a extração de cafés crus da espécie arábica provenientes da Indonésia, Tailândia e China, utilizando uma mistura de acetona-metanol-água como solvente. Os autores obtiveram extratos com valores entre 43.07–53.76 mg GAE. g<sup>-1</sup>, sendo próximos aos resultados encontrados no presente trabalho. Observa-se que a solução de colina e água 50% (m/v) foi mais eficiente na extração de compostos fenólicos quando comparada a mistura de solventes convencionais (etanol, metanol e diclorometano) utilizados por Cheong et al. (2013), evidenciando a eficiência do uso de solventes verdes.

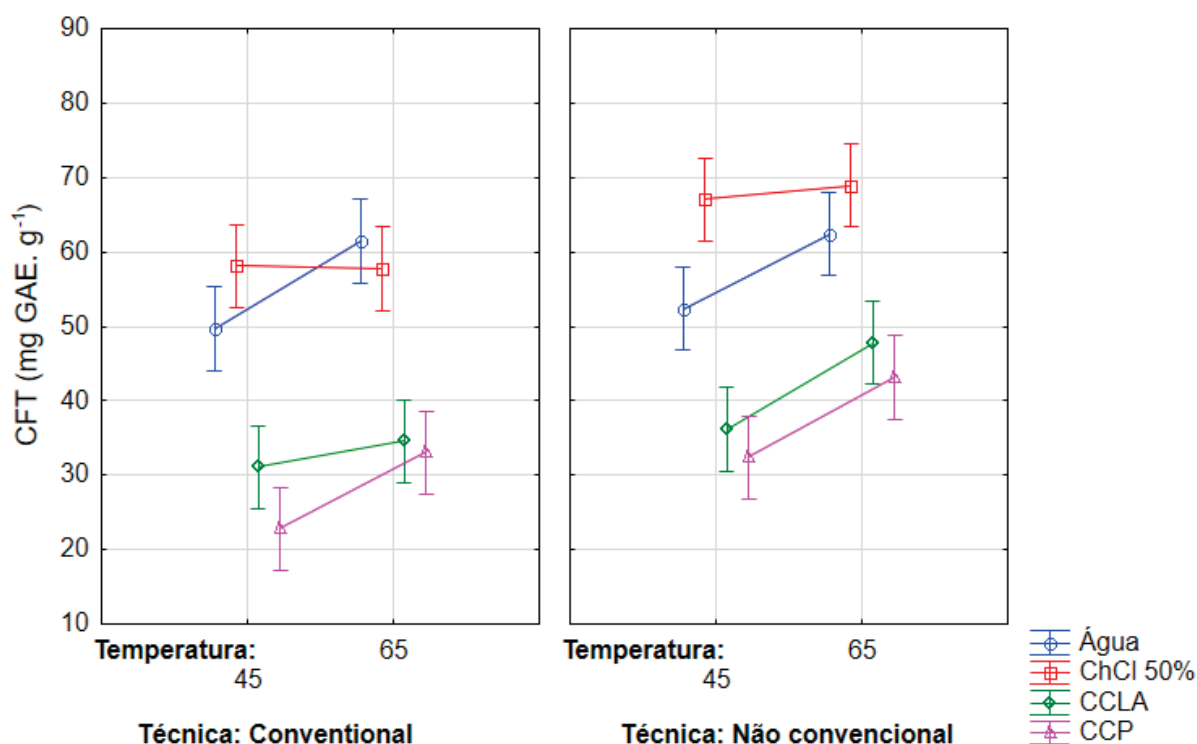
Ao comparar os resultados para as duas espécies de café, nota-se, que a espécie *canephora* apresenta maiores teores de CFT. Tais variações no conteúdo fenólico podem ser justificadas pelas diferenças fisiológicas das espécies, origem geográfica e à forma de cultivo (DO CARMO, 2019). Maiores quantidades de compostos fenólicos na espécie *canéfora* contribuem para a sua menor valorização frente ao arábica, em razão da adstringência e amargor provocados por esses compostos (CLIFFORD, 1999). Para ambas espécies, a água e ChCl 50% foram os solventes mais eficientes em na extração dos polifenóis.



TABELA 14 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE AO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE EXTRATOS PROVENIENTES DE *COFFEA CANEPHORA*

Fatores	G.L.	Soma de quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Solvente	3	5085,8	1695,26	130,08	7,64E-13
Técnica	1	475,35	475,35	36,47	8,25E-06
Temperatura	1	440,91	440,91	33,83	1,32E-05
Solvente:Temperatura	3	132,34	44,11	3,85	0,03
Solvente:Técnica	3	93,48	31,16	2,39	0,10
Temperatura:Técnica	1	10,01	10,01	0,76	0,39
Resíduos	19	247,60	13,03	-	-

FIGURA 19 - GRÁFICO DE EFEITOS PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (*COFFEA CANEPHORA*)



\***Legenda:** Solventes: -1 (COLINA 50%); 3 (CCP); 1 (CCLA); -3 (ÁGUA). Técnica: -1 (Agitação); 1 (Ultra-Turrax). Temperatura: -1 (45 °C); 1 (65 °C); 1 (65 °C).

A partir da análise de variância, ANOVA, (TABELA 14) observa-se que o solvente é o fator que exerce maior influência no rendimento de CFT ( $p < 0,05$ ), seguido da técnica de extração. Nota-se que o método não convencional apresenta

melhor desempenho, o que pode ser explicado pela forte agitação promovida pelo Ultra-Turrax, auxiliando a transferência de massa. Segundo Sari e colaboradores (2011) a eficiência e a seletividade do processo de extração além de serem afetadas pela técnica, tempo e temperatura de extração, também são afetadas pelo tamanho das partículas da matriz. Durante o processo de extração, uma força de adsorção entre os orifícios é gerada para absorver os compostos bioativos. Assim, o Ultra-Turrax configura um equipamento altamente eficaz na distribuição de partículas, visto que fornece tamanhos de partículas apropriados, principalmente devido a sua alta agitação (XU et al., 2016). Com relação à interação entre as variáveis, nota-se que apenas a interação entre os solventes com a temperatura de extração é significativa na obtenção de polifenóis ( $p < 0,05$ ) (TABELA 14). Esse efeito pode ser visualizado no gráfico de efeitos (FIGURA 19), onde os extratos de maior viscosidade tiveram sua capacidade de extração intensificada em 65 °C.

A temperatura também exerce influência significativa no processo. O aumento desta variável favorece a extração dos polifenóis, pois promove um aumento no coeficiente de difusão do solvente e conseqüentemente na taxa de difusão dos analitos, principalmente nos DES, que apresentam alta viscosidade (DAI et al., 2013).

Em relação ao DES, os dois DES à base de cloreto de colina avaliados (CCLA e CCP) foram capazes de extrair polifenóis. Além disso, a variação nas quantidades de CFT extraídas, demonstra que a eficiência de extração é diretamente depende do doador de hidrogênio (HBD) empregado na formação dos DES (BARBIERI et al., 2020).

## **6.2 Avaliação do perfil fenólico determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)**

Os compostos bioativos (cafeína, trigonelina e, CGAs) identificados nos extratos de sementes brutas de *Coffea canephora* e estão disponíveis na Tabela 15.

TABELA 15 - TEORES EM BASE SECA (g. 100g<sup>-1</sup>) DE ÁCIDOS CLOROGÊNICOS, CAFEÍNA E TRIGONELINA PRESENTES EM GRÃOS CRUS DE COFFEA CANEPHORA

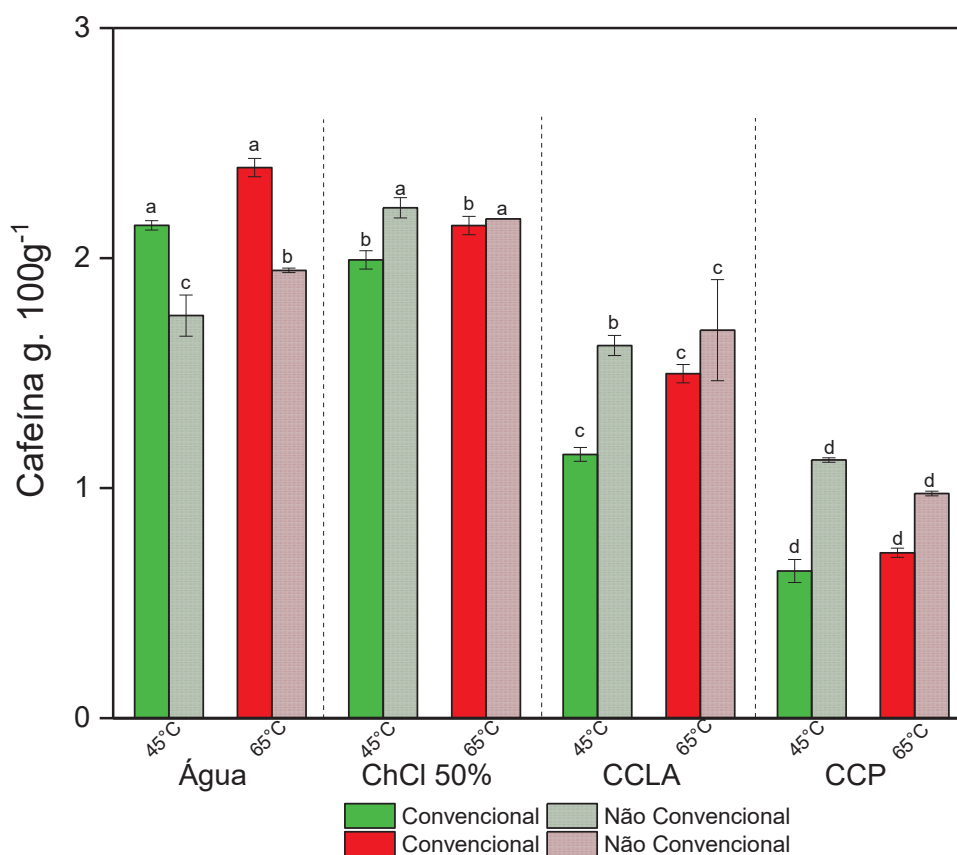
Solvente	T (°C)	Variáveis Explanatórias		Ácidos clorogênicos (g. 100g <sup>-1</sup> )					Alcalóides (g. 100g <sup>-1</sup> )			
		4,5diCQA	Técnica	3,5diCQA	3,4diCQA	5-FQA	4-CQA	5-CQA	3-CQA	ACG TOTAIS	Cafeína	Trigonelina
Água	45	0,36 ± 1,76 <sup>cb</sup>	Convencional	0,41 ± 3,98 <sup>cb</sup>	0,24 ± 3,25 <sup>ec</sup>	0,93 ± 2,64 <sup>db</sup>	1,28 ± 2,42 <sup>dc</sup>	2,67 ± 2,86 <sup>db</sup>	1,17 ± 6,61 <sup>aa</sup>	7,10 ± 0,30 <sup>bb</sup>	2,14 ± 2,01 <sup>bs</sup>	0,41 ± 0,26 <sup>cb</sup>
ChCl50%	45	0,48 ± 5,36 <sup>ba</sup>	Convencional	0,46 ± 2,26 <sup>ba</sup>	0,48 ± 5,22 <sup>ba</sup>	1,29 ± 4,18 <sup>ba</sup>	0,79 ± 2,40 <sup>ed</sup>	4,23 ± 3,83 <sup>aa</sup>	1,07 ± 0,50 <sup>bb</sup>	8,82 ± 0,01 <sup>ba</sup>	1,99 ± 4,28 <sup>cb</sup>	0,54 ± 1,29 <sup>aa</sup>
CCLA	45	0,31 ± 4,18 <sup>dc</sup>	Convencional	0,24 ± 3,62 <sup>ec</sup>	0,28 ± 3,83 <sup>db</sup>	0,63 ± 1,00 <sup>c</sup>	1,47 ± 2,24 <sup>ba</sup>	2,12 ± 3,85 <sup>ec</sup>	0,51 ± 4,84 <sup>ec</sup>	5,58 ± 0,09 <sup>c</sup>	1,14 ± 3,46 <sup>ec</sup>	0,23 ± 1,99 <sup>ec</sup>
CCP	45	0,22 ± 0,29 <sup>ld</sup>	Convencional	0,17 ± 0,15 <sup>gd</sup>	0,18 ± 0,10 <sup>ld</sup>	0,39 ± 0,11 <sup>hd</sup>	1,37 ± 0,24 <sup>cb</sup>	1,08 ± 3,75 <sup>gd</sup>	0,26 ± 0,08 <sup>gd</sup>	3,70 ± 0,09 <sup>ed</sup>	0,64 ± 0,57 <sup>gd</sup>	0,15 ± 0,34 <sup>ld</sup>
Água	45	0,30 ± 0,96 <sup>dc</sup>	Não Convencional	0,28 ± 0,45 <sup>ec</sup>	0,35 ± 1,29 <sup>cb</sup>	1,23 ± 1,76 <sup>cb</sup>	0,50 ± 2,00 <sup>b</sup>	3,59 ± 5,57 <sup>cb</sup>	1,03 ± 1,59 <sup>cb</sup>	7,29 ± 0,09 <sup>cb</sup>	1,17 ± 0,89 <sup>ec</sup>	0,34 ± 0,26 <sup>db</sup>
ChCl50%	45	0,56 ± 0,57 <sup>aa</sup>	Não Convencional	0,49 ± 0,26 <sup>aa</sup>	0,53 ± 0,38 <sup>aa</sup>	1,36 ± 1,41 <sup>aa</sup>	1,57 ± 0,32 <sup>aa</sup>	4,07 ± 1,07 <sup>ba</sup>	1,12 ± 3,77 <sup>ba</sup>	9,71 ± 0,03 <sup>aa</sup>	2,21 ± 0,44 <sup>aa</sup>	0,47 ± 0,59 <sup>ba</sup>
CCLA	45	0,35 ± 0,80 <sup>cb</sup>	Não Convencional	0,31 ± 0,37 <sup>db</sup>	0,35 ± 0,91 <sup>cb</sup>	0,81 ± 2,30 <sup>ec</sup>	0,31 ± 2,03 <sup>gc</sup>	2,98 ± 6,05 <sup>dc</sup>	0,74 ± 1,66 <sup>dc</sup>	5,86 ± 0,21 <sup>ec</sup>	1,62 ± 0,43 <sup>db</sup>	0,31 ± 0,11 <sup>db</sup>
CCP	45	0,25 ± 1,62 <sup>ed</sup>	Não Convencional	0,22 ± 1,64 <sup>ld</sup>	0,24 ± 2,03 <sup>ec</sup>	0,51 ± 4,01 <sup>gd</sup>	0,21 ± 1,42 <sup>hd</sup>	1,72 ± 4,55 <sup>ld</sup>	0,40 ± 5,49 <sup>ld</sup>	3,58 ± 0,06 <sup>gd</sup>	1,12 ± 1,90 <sup>ld</sup>	0,24 ± 0,97 <sup>ec</sup>
Água	65	0,47 ± 0,03 <sup>cb</sup>	Convencional	0,46 ± 0,09 <sup>ba</sup>	0,50 ± 0,03 <sup>ba</sup>	1,6 ± 0,11 <sup>aa</sup>	0,86 ± 1,21 <sup>db</sup>	4,10 ± 0,66 <sup>cb</sup>	1,22 ± 6,24 <sup>bb</sup>	9,23 ± 0,20	2,39 ± 4,06 <sup>aa</sup>	0,52 ± 0,30 <sup>ba</sup>
ChCl50%	65	0,78 ± 2,58 <sup>aa</sup>	Convencional	0,44 ± 2,97 <sup>cb</sup>	0,48 ± 4,20 <sup>ba</sup>	1,21 ± 1,52 <sup>cb</sup>	0,40 ± 2,42 <sup>gd</sup>	4,66 ± 1,03 <sup>aa</sup>	1,33 ± 2,26 <sup>aa</sup>	9,34 ± 0,31	2,14 ± 4,54 <sup>bb</sup>	0,54 ± 0,03 <sup>as</sup>
CCLA	65	0,36 ± 0,63 <sup>dc</sup>	Convencional	0,30 ± 0,60 <sup>c</sup>	0,34 ± 0,73 <sup>bb</sup>	0,79 ± 1,97 <sup>c</sup>	1,08 ± 2,04 <sup>ba</sup>	2,79 ± 5,71 <sup>fc</sup>	0,69 ± 1,60 <sup>ec</sup>	6,38 ± 0,01	1,49 ± 4,02 <sup>ec</sup>	0,32 ± 0,96 <sup>db</sup>
CCP	65	0,23 ± 0,45 <sup>gd</sup>	Convencional	0,18 ± 0,27 <sup>hd</sup>	0,21 ± 0,15 <sup>gc</sup>	0,44 ± 0,11 <sup>hd</sup>	0,99 ± 0,24 <sup>ec</sup>	1,35 ± 4,28 <sup>ld</sup>	0,34 ± 0,78 <sup>gd</sup>	3,75 ± 0,06	0,71 ± 0,20 <sup>gd</sup>	0,16 ± 0,03 <sup>ec</sup>
Água	65	0,34 ± 0,28 <sup>ec</sup>	Não Convencional	0,33 ± 1,62 <sup>db</sup>	0,38 ± 0,28 <sup>ec</sup>	1,15 ± 2,41 <sup>db</sup>	0,11 ± 0,31 <sup>hd</sup>	3,93 ± 1,23 <sup>db</sup>	1,04 ± 1,64 <sup>cb</sup>	7,33 ± 0,19	1,94 ± 0,10 <sup>cb</sup>	0,34 ± 0,23 <sup>bb</sup>
ChCl50%	65	0,62 ± 3,75 <sup>ba</sup>	Não Convencional	0,56 ± 4,13 <sup>aa</sup>	0,60 ± 3,61 <sup>aa</sup>	1,47 ± 0,89 <sup>ba</sup>	1,18 ± 2,43 <sup>aa</sup>	4,30 ± 3,75 <sup>ba</sup>	1,19 ± 5,26 <sup>ba</sup>	9,96 ± 0,32	2,17 ± 0,19 <sup>ba</sup>	0,43 ± 0,52 <sup>ea</sup>
CCLA	65	0,45 ± 5,79 <sup>cb</sup>	Não Convencional	0,38 ± 5,06 <sup>db</sup>	0,42 ± 4,19 <sup>cb</sup>	1,00 ± 1,92 <sup>ec</sup>	0,70 ± 0,23 <sup>eb</sup>	3,26 ± 4,62 <sup>ec</sup>	0,80 ± 2,54 <sup>dc</sup>	7,02 ± 0,52	1,68 ± 2,87 <sup>dc</sup>	0,35 ± 1,98 <sup>db</sup>
CCP	65	0,32 ± 3,92 <sup>ld</sup>	Não Convencional	0,27 ± 3,32 <sup>gc</sup>	0,30 ± 4,05 <sup>ld</sup>	0,68 ± 0,39 <sup>gd</sup>	0,60 ± 0,04 <sup>c</sup>	2,28 ± 3,95 <sup>gd</sup>	0,52 ± 4,68 <sup>ld</sup>	5,00 ± 0,49	0,97 ± 1,41 <sup>ld</sup>	0,33 ± 0,13 <sup>bb</sup>

\* Os valores foram obtidos a partir de duas repetições ± desvio padrão (DP). Letras sobrescritas diferentes para a mesma coluna significam diferença significativa de acordo com ANOVA e teste de Tukey (p<0,05), onde a primeira letra indica a comparação entre as técnicas (convencionais e não convencionais) na mesma temperatura, e a segunda letra indica a comparação entre solventes na mesma técnica e temperatura. ChCl 50% é a solução aquosa a 50% em peso de cloreto de colina; CCP é o solvente 1,2 propanodiol e cloreto de colina; CCLA é o solvente ácido láctico e cloreto de colina.

### 6.2.1 Cafeína

Para a melhor compreensão dos resultados, estes foram plotados considerando a influência das variáveis (solvente, técnica e temperatura) sobre a extração da cafeína, conforme ilustra a Figura 20.

FIGURA 20 - INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE CAFEÍNA EM EXTRATOS OBTIDOS NO MÉTODO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO (*COFFEA CANEPHORA*)



\* Os valores são obtidos a partir de três repetições  $\pm$  desvio padrão (DP). Letras sobrescritas diferentes para a mesma cor da coluna significam diferença significativa de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ChCl 50% é solução de cloreto de colina e água 50% m/v; CCLA compostos por cloreto de colina e ácido láctico; CCP compostos por cloreto de colina e 1,2-propanodiol.

A cafeína foi o segundo composto mais abundante em todos os extratos analisados. Como esperado, a espécie *C. canephora* exibe altos níveis de cafeína em sua composição (BABOVA et al., 2016). Em relação ao método convencional, o maior teor de cafeína foi obtido nos extratos utilizando água como solvente extrator,

atingindo valor máximo de 2,39 g. 100 g<sup>-1</sup>, seguido dos extratos obtidos com ChCl 50% cujo valor máximo foi 2,14 g. 100 g<sup>-1</sup>. O método não convencional apresentou comportamento oposto, onde os extratos obtidos com ChCl 50% como solvente extrator atingiram o valor máximo de 2,21 g. 100 g<sup>-1</sup>, seguido do extrato aquoso cujo maior valor foi de 1,94 g. 100 g<sup>-1</sup>. Além disso, conforme discutido anteriormente, a extração assistida por Ultra-Turrax aumenta o rendimento dos extratos obtidos com DES, pois minimiza os efeitos da viscosidade, o que é benéfico para a extração (RUESGAS-RAMÓN et al., 2017). Hečimović et al. (2011) obtiveram rendimentos de 1,92 e 2,07 mg. g<sup>-1</sup> em termos de cafeína em extratos aquosos de *C. canephora* usando um método de agitação convencional. Tewabe et al. (2015) encontraram níveis de cafeína variando de 0,97 a 1,53 mg. g<sup>-1</sup> em grãos de café cultivados em diferentes localizações geográficas usando diclorometano como solvente em um método de extração convencional. Os resultados dos estudos análogos indicam que as condições de extração utilizadas no presente trabalho proporcionam melhores rendimentos de extrato, tanto para o método convencional quanto para o não convencional. Pode-se afirmar também que os solventes verdes desenvolvidos neste trabalho foram mais eficientes quando comparado a solventes convencionais, como o diclorometano utilizado pelos autores.

Nota-se que o Ultra-Turrax não favorece a obtenção das biomoléculas em extratos com água quando comparado ao método convencional. Esse efeito é observado apenas em extratos com maior viscosidade, reforçando a importância de associar a intensa agitação com os DES, por exemplo.

De modo geral, os rendimentos de cafeína aumentam com o aumento da temperatura de extração. Isso ser justificado pelo fato de que temperaturas mais elevadas acarretam no aumento da solubilidade das biomoléculas de interesse, facilitando sua obtenção (SATO et al., 2018).

Em relação aos DES, os extratos obtidos com CCLA apresentaram os melhores resultados, atingindo rendimento máximo de 1,68 g. 100 g<sup>-1</sup>, enquanto os extratos obtidos com CCP atingiram valor máximo de 1,12 g. 100 g<sup>-1</sup>, ambos no método não convencional. Cai et al. (2019) também obtiveram rendimento máximo de extração de cafeína em chá preto chinês utilizando o DES composto por CCLA como solvente extrator. Os autores atribuíram o alto rendimento de solvente à suposição de que a interação da ligação de hidrogênio entre ChCl-LA e café, foi o

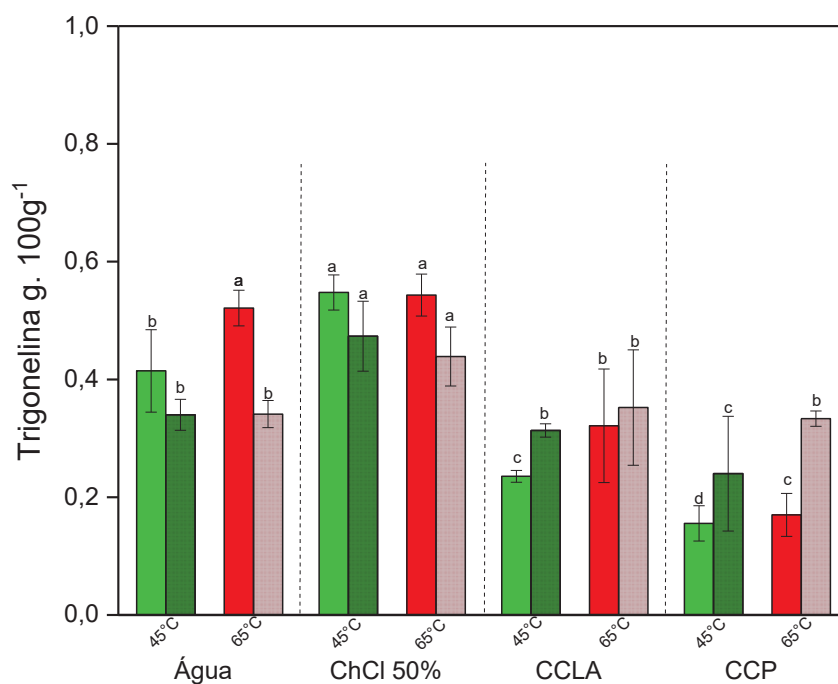
principal fator de influência na extração, desempenhando um papel fundamental na obtenção de cafeína. Além disso, existem vários fatores relacionados à capacidade de extração de DES, entre eles: interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas e forças de van der Waals (Cai et al., 2019; Tang et al., 2015).

Ao comparar as duas espécies de café, nota-se que a espécie *Coffea canephora* apresenta maiores teores de cafeína em relação ao *Coffea arábica*. Além dos ácidos clorogênicos, a atividade antioxidante dos grãos de café também é atribuída à presença da cafeína. Portanto, maiores teores de cafeína são associados a um maior potencial antioxidante. Para ambas espécies, o extrato aquoso apresentou os maiores rendimentos em termos de cafeína.

### 6.2.2 Trigonelina

Para a melhor compreensão dos resultados, estes foram plotados considerando a influência das variáveis (solvente, técnica e temperatura) sobre a extração da trigonelina, conforme ilustra a Figura 21.

FIGURA 21 - INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE TRIGONELINA EM EXTRATOS OBTIDOS NO MÉTODO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO (*COFFEA CANEPHORA*).



\* Os valores são obtidos a partir de três repetições  $\pm$  desvio padrão (DP). Letras sobrescritas diferentes para a mesma cor da coluna significam diferença significativa de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ChCl 50% é solução de cloreto de colina e água 50% m/v; CCLA compostos por cloreto de colina e ácido láctico; CCP compostos por cloreto de colina e 1,2-propanodiol.

Na extração da trigonelina houve uma diferença de comportamento para espécie *C. canephora* quando comparada a *C. arábica*. Para ambos os métodos avaliados os maiores rendimentos foram obtidos utilizando ChCl 50% como solvente, atingindo valores máximos de 0,54 e 0,47 g. 100g<sup>-1</sup>, para o método convencional e não convencional, respectivamente.

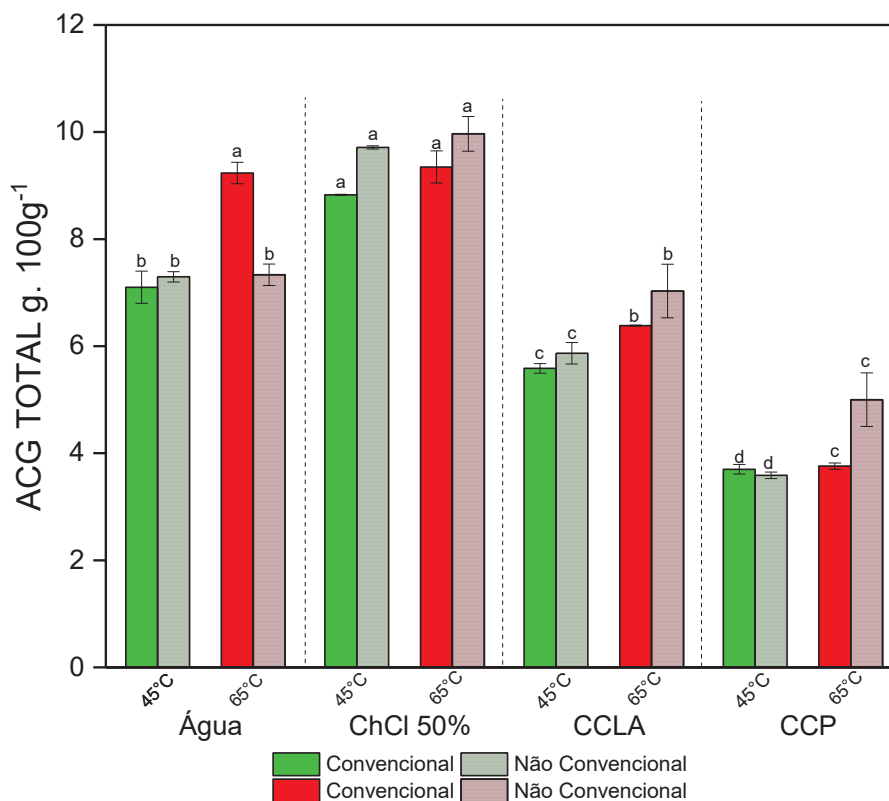
Dong et al. (2015) encontraram valores de trigonelina variando de 0,75 a 0,87 mg. g<sup>-1</sup>, para *C. arabica* e *C. canephora*, respectivamente. Agnoletti (2015) encontrou valores de trigonelina variando de 0,096 a 0,17 g. 100 g<sup>-1</sup> para diferentes amostras de sementes cruas de *C. canephora*. Essa variação pode ser explicada porque o teor de trigonelina dos extratos de sementes de café verde cru depende de vários fatores, incluindo: espécies, fatores genéticos e ambientais, maturidade dos grãos na colheita, condições de processamento pós-colheita, técnica de extração, temperatura e solvente (ALVES et al., 2000; MEHARI et al., 2016).

Nota-se que o método de extração convencional permite maiores rendimentos de trigonelina em relação ao método não convencional e isso pode ser atribuído ao fato de a trigonelina não apresentar estabilidade térmica, sendo suscetível ao estresse térmico e mecânico (Trugo, 2003). Portanto, a agitação promovida pelo Ultra-Turrax, associada à altas temperaturas afetaram a estabilidade da molécula. Em contrapartida, esse efeito não é observado para DES, quando se trata de solventes viscosos, o método não convencional promove maiores rendimentos de extrato e a preservação do alcalóide.

### 6.2.3 Ácidos clorogênicos totais

Os ácidos clorogênicos presentes nos extratos de grãos crus de *C. canephora* foram identificados por cromatografia. Os resultados consistem na soma dos isômeros determinados, sendo eles: 4,5-diCQA; 3,5-diCQA; 3,4diCQA; 5-FQA; 4-CQA; 5-CQA; 3-CQA e foram expressos em base seca conforme a Figura 21.

FIGURA 22 – INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA TEMPERATURA NA CONCENTRAÇÃO DE ACG EM EXTRATOS OBTIDOS NO MÉTODO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL DE EXTRAÇÃO (*COFFEA CANEPHORA*).



\* Os valores são obtidos a partir de três repetições  $\pm$  desvio padrão (DP). Letras sobrescritas diferentes para a mesma cor da coluna significam diferença significativa de acordo com ANOVA e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ChCl 50% é solução de cloreto de colina e água 50% m/v; CCLA composto por cloreto de colina e ácido láctico; CCP compostos por cloreto de colina e 1,2-propanodiol.

Sabe-se que as sementes cruas de *C. canephora* apresentam altos níveis de ACGs em sua composição (CLIFFORD, 1999). Dentre os biocompostos, o ACG foi o composto mais abundante em todos os extratos. Os extratos obtidos empregando ChCl 50% como solvente apresentaram os maiores rendimentos de extrato, atingindo o valor máximo de 9,96 g. 100 g<sup>-1</sup>, no método não convencional (65 °C); seguido do extrato aquoso, 9,23 g. 100 g<sup>-1</sup> pelo método convencional (65 °C); extrato obtido com CCLA, 7,02 g. 100 g<sup>-1</sup>, no método não convencional (65 °C); e extrato obtido com CCP, 5,00 g. 100 g<sup>-1</sup>, no método não convencional (65 °C).

Com exceção do extrato aquoso, o método não convencional potencializou o rendimento dos extratos. O que pode ser justificado pelo fato de que quanto maior o tamanho da partícula da matriz, mais difícil é a passagem do ACG presente na



parede celular do grão para o solvente de extração, diminuindo a acessibilidade para biocompostos e conseqüentemente, o rendimento de extração (ZHANG et al., 2013). Nesse contexto, sabe-se que o Ultra-Turrax apresenta a vantagem de produzir uma distribuição de partícula uniforme. De acordo com Xu e colaboradores (2016) o tamanho de partícula uniforme durante a extração é propício para melhorar o rendimento final dos compostos bioativos. Assim, o método não convencional associado a temperaturas mais altas facilita o processo de uma transferência de massa, visto que, os maiores rendimentos foram obtidos a uma temperatura de 65 °C. Esse efeito é evidenciando principalmente nos solventes de maior viscosidade, como é o caso dos DES.

Sabe-se que a eficiência de extração de um determinado composto é afetada pela polaridade, solubilidade, viscosidade, interação físico-química com o solvente de extração, entre outros. Sendo assim, diferentes composições de DES resultam em diferentes rendimentos de polifenóis. O DES constituído por CCLA apresentou maiores rendimentos de extração, atingindo valor máximo de 7,02 g. 100 g<sup>-1</sup>, no método não convencional (65 °C). Esse comportamento se deve a maior capacidade desse solvente em formar ligações de hidrogênio como os ACGs.

Syakfanaya et al. (2019) avaliaram o rendimento de diferentes proporções de HBA (betaína) e HBD (sorbitol e ureia) e obtiveram um resultado ótimo de 13,46 mg. g<sup>-1</sup> de ACG em grãos verdes de *C. canephora* com DES composto de betaína: sorbitol (1: 1,2). Yuniarti et al. (2019) obtiveram maiores rendimentos de ACG em grãos de café utilizando DES composto por ChCl: sorbitol (4: 1), atingindo valor máximo de 11,53 mg. g<sup>-1</sup>. Portanto, diferentes combinações de HBA e HBD para formar DES podem extrair compostos com diferentes propriedades devido às suas diferentes propriedades físico-químicas (DAI et al., 2013; YUNIARTI et al., 2019). Dessa forma, o estudo do efeito de diferentes compostos utilizados como HBD e HBA pode servir de base para o desenvolvimento de DES para diferentes aplicações com elevados rendimentos.

Dos sete isômeros de ACGs, o 5-ACQ foi detectado em maior quantidade em todos os extratos, de acordo com a Tabela 15. O maior rendimento de 5-ACQ foi alcançado pelo extrato obtido com ChCl 50% (4,66 g. 100g<sup>-1</sup>), extrato aquoso (4,10 g. 100g<sup>-1</sup>), CCLA (3,26 g. 100g<sup>-1</sup>) e CCP (2,28 g. 100g<sup>-1</sup>). Os isômeros 3-ACQ e 4-ACQ foram encontrados em menores quantidades quando comparados ao 5-ACQ.

Com relação aos ácidos dicafeoilquínicos, 3,5diCQA foi encontrado em maiores quantidades, seguido de 4,5diCQA e 3,4diCQA, atingindo valores máximos de 0,56; 0,78 e 0,60 g. 100g<sup>-1</sup>, respectivamente, esses valores foram reportados em extratos obtidos com ChCl 50% no método não convencional a 65 °C.

Os níveis de ácidos feruloilquínicos também foram quantificados. O extrato aquoso apresentou o maior valor de 5-FQA (1,60 g. 100g<sup>-1</sup>), seguido do extrato composto por ChCl 50% (1,47 g. 100g<sup>-1</sup>), ambos na extração conduzida a 65 °C.

Através da análise cromatográfica nota-se que a extração dos isômeros de ACGs é fortemente afetada pelas condições de extração. Como esperado, diferentes teores de isômeros foram observados nas duas espécies estudadas. O isomerismo rege a química estrutural do CGA. No total, *Coffea arabica* produz entre 45-50 derivados CGA diferentes, enquanto *Coffea canephora* produz derivados 80-90 (Badmos et al., 2019).

### 6.3 Atividade antioxidante

Com relação ao método FRAP, os extratos obtidos com ChCl 50% exibiram maior poder redutor quando comparados aos demais extratos, atingindo um valor máximo de 142,56 mg<sub>Trolox.</sub> g<sup>-1</sup> no método não convencional, seguido do extrato aquoso que atingiu valor máximo de 122,58 mg<sub>Trolox.</sub> g<sup>-1</sup> também no método não convencional. Cheong et al. (2013) avaliaram a extração de compostos antioxidantes de cafés crus usando uma mistura de acetona-metanol-água como solvente extrator e obtiveram um valor máximo de 147,46 mg<sub>Trolox.</sub> g<sup>-1</sup>, semelhante ao obtido no presente estudo. Entretanto, vale ressaltar que os autores utilizaram solventes convencionais, que apesar de possuírem boa capacidade de extração e dissolução, são tóxicos e podem apresentar riscos à saúde humana. Portanto, o uso de solventes verdes, fornece extratos com alta capacidade antioxidante, minimizando os efeitos ao meio ambiente e a saúde. Ao comparar os resultados com os obtidos para a espécie arábica (Capítulo 6), observa-se que os extratos provenientes de *Coffea canephora* apresentam maior potencial antioxidante (análise FRAP), principalmente em virtude do maior teor de ácidos clorogênicos e cafeína que essa espécie apresenta.

Os extratos foram mais ativos como antioxidantes quando testados pelo teste de poder redutor (análise DPPH). Conforme apresentado na Tabela 13, considerando a inibição do radical DPPH, a capacidade antioxidante dos extratos atingiu até 75,51 mg<sub>Trolox.</sub> g<sup>-1</sup> para o extrato aquoso. Isso pode ser explicado pelo alto teor de compostos antioxidantes solúveis em água presentes no café, como ACGs e alcalóides, por exemplo. O extrato obtido com ChCl 50% atingiu valor máximo de 72,41 mg<sub>Trolox.</sub> g<sup>-1</sup>. De modo geral, os extratos obtidos a partir de *Coffea canephora* apresentaram maior potencial antioxidante quando comparados com os extratos obtidos a partir de *Coffea arabica*. A partir do gráfico de efeitos (Figura 22) e da ANOVA (Tabela 16 e 17) foi possível observar a influência de cada uma das variáveis independentes (solvente, técnica e temperatura) sobre a atividade antioxidante (DPPH e FRAP).

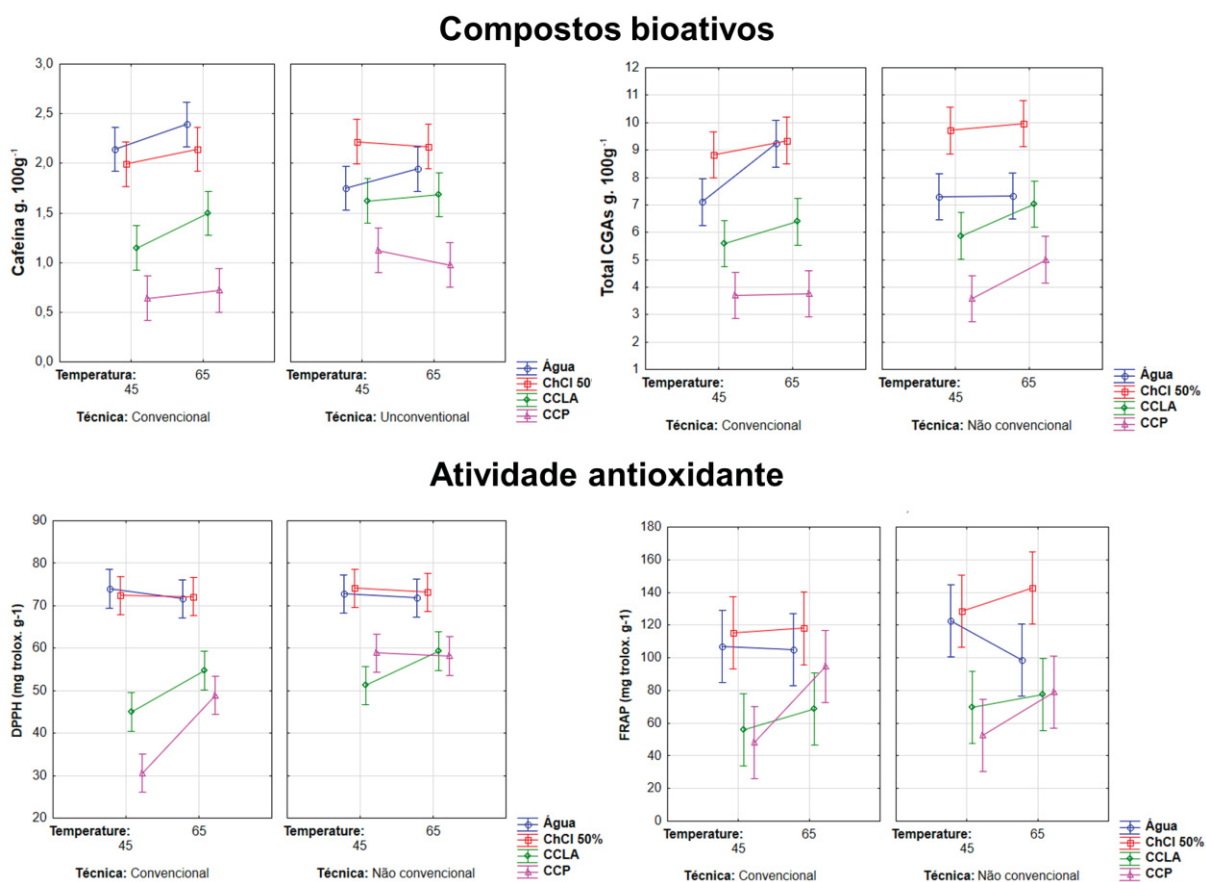
TABELA 16 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP DE EXTRATOS DE *COFFEA CANEPHORA*

Fatores	G.L.	Soma de quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Solvente	3	20398,56	6799,52	32,48	1,11E-07
Técnica	1	427,58	427,58	2,04	0,17
Temperatura	1	2326,36	2326,36	11,11	0,00
Solvente:Temperatura	3	1033,93	344,64	1,64	0,21
Solvente:Técnica	3	653,91	217,97	1,04	0,39
Temperatura:Técnica	1	10,03	10,03	0,04	0,82
Resíduos	19	3977,96	209,36		

TABELA 17 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) REFERENTE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH DE EXTRATOS DE *COFFEA CANEPHORA*

Fatores	G.L.	Soma de quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Solvente	3	4002,51	1334,17	98,97	8,86E-12
Técnica	1	306,65	306,65	22,74	1,33E-4
Temperatura	1	203,70	203,70	15,11	9,91E-4
Solvente:Temperatura	3	125,14	41,71	3,09	0,05
Solvente:Técnica	3	464,75	154,91	11,49	0,00
Temperatura:Técnica	1	71,84	71,84	5,32	0,03

FIGURA 23 – EFEITO DAS VARIÁVEIS SOBRE O CONTEÚDO DE CAFÉINA, ACGS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS DE *COFFEA CANEPHORA*



Para os dois ensaios de atividade antioxidante (TABELAS 16 e 17) é possível observar que solvente é o fator mais significativo na extração de compostos antioxidantes, seguido pela temperatura. No entanto, para o ensaio FRAP, a técnica não foi significativa no processo de extração. No que diz respeito a interação entre as variáveis, pode-se observar algumas diferenças entre os dois métodos empregados para mensurar a atividade antioxidante dos extratos. No método FRAP, nenhuma das interações entre variáveis foi significativa no processo ( $p > 0,05$ ). Em contrapartida, no método DPPH, o efeito da interação entre solvente e técnica, e temperatura e técnica apresentaram dependência significativa no processo de extração dos compostos antioxidantes ( $p < 0,05$ ). A interação entre solvente e técnica pode estar relacionada principalmente a melhora do desempenho dos DES e de ChCl 50% na extração de biomoléculas no método não convencional, o que pode

ser facilmente observado na Figura 23. Como o Ultra-Turrax fornece uma força de cisalhamento extremamente forte no material vegetal, surge a hipótese de que a agitação em alta velocidade pode ser benéfica na extração de compostos alvo devido à alta velocidade e forças de transferência de massa (XU et al., 2016). Essa mesma hipótese pode explicar a interação entre temperatura e técnica. Nesse caso, a combinação de altas temperaturas e forte agitação mecânica provocou um efeito negativo. Isso se deve a uma provável degradação das biomoléculas da matriz, principalmente os ACGs (FIGURA 23). Nesse caso, esse efeito negativo foi menor que o efeito positivo decorrente da redução da viscosidade dos DES, principalmente na obtenção dos ACGs, os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos. De modo geral, os maiores rendimentos desses polifenóis foram obtidos no método não convencional a 65 °C.

No ensaio DPPH, conforme ilustra a Figura 24, nota-se para o método convencional, com exceção do extrato aquoso, todos os demais solventes tiveram sua capacidade antioxidante intensificada com o aumento da temperatura de 45 para 65 °C. Em contrapartida, no método não convencional, apenas o DES composto por CCLA foi capaz de intensificar a capacidade antioxidante do extrato na temperatura de 65 °C. Os dois componentes que formam o DES de CCLA, podem apresentar interações intermoleculares, principalmente ligações de hidrogênio com os grupos carboxila e hidroxila dos ACGs e seus isômeros. Essa interação é capaz de reduzir o movimento das moléculas que constituem o soluto, diminuindo seu tempo de contato com o oxigênio na interface do DES com o ar e com o oxigênio dissolvido em solução, conseqüentemente, minimizando a degradação oxidativa, principal mecanismo de degradação (DAI et al., 2016).

No ensaio FRAP, para o método convencional, observa-se a mesma tendência do ensaio DPPH, onde, com exceção do extrato aquoso, os demais extratos tiveram a sua capacidade antioxidante intensificada em 65 °C. O mesmo comportamento é observado no método não convencional. Portanto, apesar de não fornecerem os maiores rendimentos de alcalóides e ACGs, os DES garantem a preservação das biomoléculas sob estresse térmico e mecânico, o que reforça a capacidade de estabilização das biomoléculas do DES. Esse comportamento é decorrente das interações moleculares entre o DES e os polifenóis, preservando as

características funcionais da biomolécula, entre elas a capacidade antioxidante (BARBIERI, 2019).

## PARTE III

### Considerações Finais

---

*Nesta parte serão apresentadas as conclusões e referências bibliográficas deste trabalho.*

## CAPÍTULO 8 – Conclusões

---

Neste trabalho foi avaliado o efeito de diferentes solventes, técnica, temperatura e tempo de extração, na recuperação e preservação de cafeína, trigonelina e ACGs em extratos de grãos crus de *C. arábica* e *C. canephora*. A diversidade de variáveis testadas corroborou para que as melhores condições pudessem ser selecionadas.

Entre os solventes verdes analisados, os DES compostos por CCLA e CCP, água e ChCl 50% foram selecionados como os solventes mais eficientes. Foram analisadas três temperaturas diferentes de extração (25, 45 e 65 °C), sendo que, de modo geral, temperaturas mais altas favorecem a extração de compostos bioativos, principalmente dos ácidos clorogênicos. Quanto à técnica de extração, o método não convencional mostrou-se rápido e eficiente na recuperação dos compostos bioativos presentes nos grãos crus de café, principalmente em extratos obtidos com DES. Todos os parâmetros foram avaliados de acordo com a otimização DIC, através de análises de CFT, atividade antioxidante e CLAE.

O emprego do Ultra-Turrax representa uma alternativa na redução do gasto energético, bem como na otimização do processo, pois resultou na economia de 50 minutos na extração e melhora no teor de ACGs, em relação ao método convencional por agitação magnética. Além disso, observou-se que a extração de ACGs foi impulsionada pela presença de cloreto de colina, ou seja, a solução aquosa de cloreto de colina associada à homogeneização promovida pelo equipamento destacou-se por seu efeito positivo na extração de polifenóis. Apesar de obter altos rendimentos em termos de alcalóides e ACGs, o extrato aquoso apresentou capacidade limitada na manutenção da atividade antioxidante quando comparado aos DES. Os DES possuem uma grande capacidade para estabilizar biomoléculas quando comparados a solventes convencionais.

Com base no conteúdo de ACGs, trigonelina e cafeína total, nota-se que todos os solventes verdes foram capazes de extrair esses compostos simultaneamente, em diferentes quantidades. A eficiência de extração foi afetada pela polaridade, solubilidade, viscosidade, interação físico-química com o solvente de extração, entre outros. Portanto, os diferentes HBDs testados nos DES resultaram em diferentes rendimentos de polifenóis e alcalóides, principalmente,



devido às suas diferentes propriedades físico-químicas, sendo que os DES constituídos por ácido láctico e 1,2-propanodiol foram os DES que apresentaram os melhores rendimentos de extrato.

A partir deste trabalho é possível verificar a eficiência do uso de solventes verdes e um método alternativo na obtenção de compostos bioativos presentes nos grãos crus de café de diferentes espécies. A extração assistida por Ultra-Turrax combinada com solventes verdes oferece rapidez, economia de energia, facilidade de extração, além de representar um processo ecologicamente correto.

Além disso, nota-se que uma variedade da composição dos grãos de café entre as espécies. Como esperado, os grãos de *C. canephora* apresentaram o maior teor total de ACGs e cafeína, logo, os extratos provenientes desta espécie apresentam maior capacidade antioxidante. No entanto, os extratos obtidos dos grãos de *C. arábica* apresentam maiores níveis de trigonelina.

Os grãos de café crus (*C. arábica* e *C. canephora*) apresentam polifenóis e alcalóides que exercem efeitos farmacológicos benéficos a saúde humana, justificando seu uso na obtenção de extratos ricos nesses compostos. Além disso, o emprego de solventes verdes, em especial os DES, associados a um método não convencional, promovem uma extração ecologicamente correta e segura, além de realizar a manutenção da atividade antioxidante dos extratos. Tendo em vista o conhecimento das propriedades benéficas dos grãos, como possível sugestão para trabalhos futuros seria o uso de diferentes combinações e concentrações de HBA e HBD para os DES. Além disso, o emprego de diferentes temperaturas e tempos de extração também poderiam ser avaliados. Podendo assim, direcionar a continuidade da pesquisa.

#### *Sugestões para trabalhos futuros*

- Explorar outras combinações de HBA e HBD nos DES para extração de compostos bioativos em grãos crus de cafés;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos aplicando metodologias *in vivo*;
- Analisar a atividade antimicrobiana dos extratos;
- Avaliar a aplicabilidade dos extratos obtidos a partir dos DES em produtos alimentícios;

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical communications (Cambridge, England)**, n. 1, p. 70–71, 2003.
- ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1790-1804, 2008.
- ADAMS, A. N, BORRELLI, R.C, FOGLIANO, V., DE KIMPE, N. Thermal Degradation studies of food melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4136-4142, 2005.
- AGNOLETTI, B. Z. *Avaliação das propriedades físico-químicas de café arábica e conilon classificados quanto à qualidade da bebida*. 2015. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- AHMAD, Islamudin e colab. Application of natural deep eutectic solvent-based ultrasonic assisted extraction of total polyphenolic and caffeine content from coffee beans (*Coffea Beans L.*) for instant food products. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 8, p. 138–143, 2018.
- ALBERTSSON, P. A. A. Erratum: Partition of proteins in liquid polymer-polymer twophase systems (Nature (1958) 182, 4640). **Nature**, v. 182, n. 4640, p. 918, 1958.
- ALBERTSSON, P.-A.; CAJARVILLE, A.; BROOKS, D. E.; TJERNELD, F. ALMEIDA, M. B.; BENASSI, M. T. Atividade antioxidante e estimativa do teor de melanoidinas em cafés torrados comerciais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 1893-1900.
- ALMEIDA, T. D.; MAI, B. F.; PUGET, F. P. Extração de tanino da casca do café. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 15268-15274, 2015.
- ALTIMARI, L. R.; CYRINO, E. S.; ZUCAS, S. M.; OKANO, A. H; BURINI, R. C. Efeitos ergogênicos da cafeína sobre o desempenho físico. **Revista Paulista de Educação Física**. São Paulo, v. 14, n. 2, p. 141-58, 2000.
- ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 1, 2002.

ALVES, R. C., et al. Antiradical activity, phenolics profile and hydroxymethylfurfural in expresso coffee: influence of technological factors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, pp. 12221-12229, 2010.

ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade. **Química Nova**, v. 32, n. 2169, p. e80, 2009.

AMAMO, A. A. Coffee Production and Marketing in Ethiopia. **European Journal of Business and Management**, v. 6, n. 37, p. 109-122, 2014.

Aminoácidos De Café Verde, Torrado e de Borra de Café Solúvel. In: **II Simpósio de analysis of sensory characteristics of coffee grains (*Coffea arabica* L.) in the region of upper Paranaíba. **Acta Scientiarum Agronomy** v. 32, n. 4, 2010.**

ANDRADE, K. S. *Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir de casca e de borra de café (Coffea arabica L.)*. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Phenolic compounds in foods – a brief review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n.1, p. 01-09, 2007.

ARAI, K. *et al.* Simultaneous determination of trigonelline, caffeine, chlorogenic acid and their related compounds in instant coffee samples by HPLC using an acidic mobile phase containing octanesulfonate, **Analytical Sciences**, v. 31(8), pp. 831–835, 2015.

ARAÚJO, A. F. *Café (Coffea arabica L.) submetido a diferentes condições de torrefação: caracterização química e avaliação da atividade antioxidante e sensorial*. 2007. Dissertação (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

ARAÚJO, J. M. A. *Química de Alimentos: Teoria e Prática*. 4.ed. Belo Horizonte. Editora UFV - Universidade Federal de Viçosa, 2004. 415p.

ARCHELA, E. et al., Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão Determination of Phenolic Compounds in Wine: A Review, **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 193-210, 2013.

ARRUDA, N. P.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Correlação entre precursores e voláteis em café arábica brasileiro processado pelas vias seca, semi úmida e discriminação através da análise por componentes principais. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2044-2051, 2012.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. esp. 49, p. 8826-8835. 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC). Disponível em: <http://www.abic.com.br>. Acesso em 24 de julho de 2019.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis. 17th Ed, Washington, DC, 2002, VII.

AZMIR, J. e colab. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BABOVA, O.; OCCHIPINTI, A.; MASSIMO, E. M. Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. **Phytochemistry**, v. 123, p. 33-39, 2016.

BAENA, R. C. Muito além dos nutrientes: o papel dos fitoquímicos nos alimentos integrais. **Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo, v. 20, n.1, p. 17-21, 2015.

BAJKACZ, S.; ADAMEK, J. Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. **Talanta**, 2017.

BAKIRTZI, C; TRIANTA, F. K.; MAKRIS, D. P. Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants, **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, 2016.

BALASUBASHINI, M.S.; RUKKUMANI, R.; VISWANATHAN, P.; MENON, V.P. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 310-314, 2004.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99(1), p. 191-203, 2006.

BARBIERI, Júlia B. e colab. **Deep eutectic solvents applied in the extraction and stabilization of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) phenolic compounds**. Industrial Crops and Products, v. 144, n. December 2018, p. 112049, 2020.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e Aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004. Beans, 2004.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4 ed. Berlin: Springer, 2009, pp. 938 - 950.

BENZIE, I. F.F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 239, n. 1, p.70-76, 1996.

BERTRAND, B.; BOULANGER, R.; DUSSERT, S.; RIBEYRE, F.; BERTHIOT, L.; BIESAGA, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **J. Chromatogr. A** 2011, 1218, 2505–2512.

BILGIN, M. et al. Obtaining scarlet sage (*salvia coccinea*) extract through homogenizer- and ultrasound-assisted extraction methods. **Chemical Engineering Communications**, v. 200, n. 9, p. 1197–1209, 2013.

BORÉM, F. M.; NOBRE, G. W.; FERNANDES, S. M.; PEREIRA, R. G. F. A.; **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 4, p. 823-831, dez. 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 8**, de 11 de junho de 2003. Dispõe de Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade para a Classificação do Café Beneficiado Grão Cru. Brasília, DF, 2003. 12p.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica Y de Farmacognosia**. Espanha: Acribia S.A, 1991.

BUBALO, M. C. et al., Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents, **Food Chemistry**, University of Zagreb, Croatia, v. 200, p. 159-166, 2016.

BUDRYN, G., et al. Influence of addition of green tea and green coffee extracts on the properties of fine yeast pastry fried products. **Food Research International**, 50, pp. 149-160, 2013.

BUDRYN, G.; ZACZYNSKA, D.; ORACZ, J. Effect of addition of green coffee extract and nanoencapsulated chlorogenic acids on aroma of different food products. **LWT - Food Sci Technol**, v. 73, p. 197-204, 2006.

CAI, C.; FENFANG, L.; LIANGLEI, L.; ZHIJIAN, T. Deep eutectic solvents used as the green media for the efficient extraction of caffeine from Chinese dark tea. **Separation and Purification Technology**, v. 227, 2019.

CAMARGO, M. B. P. The impact of climatic variability and change on arabic coffee crop in Brazil. **Bragantia**, v. 69, n. 1, p. 239-247, 2010.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A Review on antioxidants, prooxidants and related controversy. Natural and synthetic compounds, screenin and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARVALHO, L. M. et al. Aspectos morfofisiológicos das cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411- 416, mar. 2001.

CARVALHO, V. D. Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 7. n. 3, p. 197-199, set-dez, 2001.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2383-2389, 2010.

CAVIN, C.; MACE, K.; OFFORD, E.; SCHILTER, B. Protective effects of coffee diterpenes against aflatoxin B1-induced genotoxicity: mechanisms in rat and human cells. **Food Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1155-1163, 2002.

CHANIOTI, S.; TZIA, C. Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 48, 228–239, 2018.

CHEONG, M. W.; TONG, K. H.; ONG, J. J. M.; et al. Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. *Food Research International*, v. 51, n. 1, p. 388–396, 2013.

CHU, Y. et al. Type 2 diabetes-related bioactivities of coffee: Assessment of antioxidante activity, NF- $\kappa$ B inhibition and stimulation of glucose uptake. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 914-920, 2011.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Food and Agriculture**, v.79, p.363-372, 1999.  
coffee prevent acute liver injury induced by carbon tetrachloride. **Hepatology Research**, v. 35, p. 163-168, 2006.

CONAB, Companhia Nacional do Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos, quarto levantamento, janeiro de 2017. Brasília: Conab, 2017.

CORRALES, M., TOEPFL, S., BUTZ, P., KNORR, D., TAUSCHER, B. (2008).  
COSTA, A. C. O. Avaliação da capacidade antioxidante in vitro e determinação de compostos fenólicos totais em diferentes sistemas de extração em amostras de hibisco (*hibiscus sabdariffa*). In **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, v.1, n. 1, 2015.

COSTA, M. C. S. *Abordagem dos princípios da Química Verde por meio do lúdico na formação ambiental de profissionais da química*. 2018. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Goiânia, Goiânia.

Da CUNHA, L. S. **Delimitação Inteiramente Casualizada**. 2018. Disponível em: [http://www.uel.br/peessoal/lscunha/pages/arquivos/uel/Especializa%C3%A7%C3%A3o/DIC\(1\).pdf](http://www.uel.br/peessoal/lscunha/pages/arquivos/uel/Especializa%C3%A7%C3%A3o/DIC(1).pdf). Acesso em: 23/09/2020.

da SILVA, C., GARCIA, V. S., FRANCISCATO, L. S. Extração assistida por ultrassom de compostos bioativos das cascas de lichia (*Litchi chinensis* Sonn.). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, p. 81-96, 2016.

DAI, Y.; ROZEMA, E.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. **Journal of Chromatography A**, v. 1434, p. 50–56, 2016.

DAI, Y.; SPRONSEN, J. V.; WITKAMP, G. J.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Natural Deep Eutectic Solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 61-68, 2013.

DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; STOFFELEN, P. Na annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, n. 4, p. 465-512, 2006.

DESCROIX, F.; JOET, T. Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. **Food Chemistry** v. 135, p. 2575, 2012.

DONG, W.; TAN, L.; ZHAO, J.; HU, R.; LU, M.; Characterization of Fatty Acid, Amino Acid and Volatile Compound Compositions and Bioactive Components of Seven Coffee (*Coffea robusta*) Cultivars Grown in Hainan Province, China. **Molecules**, v. 20, pp. 16687-16708, 2015.

DUARTE, G. S.; PEREIRA, A. A.; FARAH, A. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 851-855, 2010.

DURÁN, C. A. A.; TSUKUI, A.; SANTOS, F. K. F.; MARTINEZ, S. T.; BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 107-134, 2017.

DURAND E. et al., Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, France, v. 65, p. 3591–3601, 2017.

EIRA, M. T. S. et al. Coffee seed physiology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 149-163, 2006.

EMMA L. S. et al., Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications, **Chem. Rev.**, University of Leicester, United Kingdom, v. 114 (21), p. 11060– 11062, 2014.

Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 9 (1), 85-91, 2008.

FARAH, A. Coffee. Emerging Health Effects and Disease Prevention; Chu, Y. F., ed.; John Wiley & Sons: Oxford, UK, 2012, pp. 21 - 58.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee Braz. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, 2006.

FARAH, A.; MONTEIRO, M. C.; CALADO, V.; FRANCA, A. S.; TRUGO, L. C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.

FARIAS, F. O. *Desenvolvimento e caracterização de sistemas de duas fases aquosas compostos por solventes eutécticos profundos aplicados na separação de biomoléculas*. 2019. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FEELEY, M. Effects of caffeine on human health, **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 1, p. 1-30, 2003.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. **Fennema's Food chemistry**, 4ed. Boca Raton: CRC Press, p. 1100, 2007.

FERNANDES, S. M.; PINTO, N. A. V. D.; THÉ, P. M. P.; PEREIRA, R. G. F. A.; Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 310-314, 2004.

FONCESA, F. A. A. da; SIVAL, T. de J. G.; FERRÃO, M. A. G.; FERRÃO, R. G.; VOLPI, P. S.; FILHO, A. C. V. GUARÇONI, R. Composição química de café conilon. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 7, 2011, Araxá, **Resumo**, MG, 2011.

FRANKLIN, G.; CONCEIÇÃO, L. F. R.; KOMBRINK, E.; DIAS, A. C. P. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. **Phytochemistry**, v. 70, n. 1, p. 60-68, 2009.

GARCIA, G.; APARICIO, S.; ULLAH, R.; ATILHAN, M. Deep Eutectic Solvents: Physicochemical Properties and Gas Separation Applications. **Energy & Fuels**, v.29, p. 2616–2644, 2015.

GAWLIK-DZIKI, U., et al. Lipoxygenase inhibitors and antioxidants from green coffee-mechanism of action in the light of potential bioaccessibility. **Food Research International**, 61, pp. 48-55, 2014.

GAWLIK-DZIKI, U.; SWIECA, M.; DZIKI, D.; KOWALSA, I.; PECIO, L.; DURAK, A.; HALLIWELL, B. Antioxidants and human disease: A general introduction. **Nutrition Reviews**. v.55, n.1, p. 44-52, 1997.

GETACHEW, A. T.; CHUN, B. S. Influence of hydrothermal process on bioactive compounds extraction from green coffee bean. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, p. 24-31.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. **Free radicals in Biology and Medicine**, 4 ed., p. 187-267, Oxford: Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, 2. Ed. Oxford: Clarendon Press 469 p.



HAMDOUCHE, Y. et al. Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses. **Food Control**, v. 131, n. 4, p. 1430-1436, 2012.

HARBONE, J. B. **The Flavonoids**. New York: Chapman e Hall, p. 676, 1994.

HEČIMOVIĆ, I.; BELŠČAK-CVITANOVIC, A.; HORZĀIC, D.; KOMES, D. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. **Food Chemistry**, v. 129, pp. 991-1000.

ICO, International Coffee Organization. **Relatório Mensal do Mercado Cafeeiro**. Disponível em: <https://www.ico.org/Market-Report-20-21-e.asp>. Acesso em: 05/05/2021.

ILLY, E. Um dos prazeres simples da vida é bastante complicado: A saborosa complexidade do café. **Revista Scientific American Brasil**, p. 48-53, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos**, 3ª Edição, São Paulo, 1985.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físicos e químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Coffee trade statistics. Disponível em: <http://www.ico.org>. Acesso em 24 de julho de 2019.

IVOGLO, M. G. F. et al. Divergência genética entre progênies de café robusta. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 4, p. 823-831, dez. 2008.

KHODDAMI, A.; WILKES, M.; ROBERTS, T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.2328-2375, 2013.

KRONHOLM, J.; KALPALA, J.; HARTONEN, K.; RIEKKOLA, M-L. Pressurized hot Água extraction coupled with supercritical Água oxidation in remediation of sand and soil containing PAHs. **Journal of Supercritical Fluids**, v.23, p.123-124, 2003.

KWON, D. J. et al. Assessment of green coffee bean metabolites dependente on coffee quality using a 1H NMR-based metabolomics approach. **Food ResearchInternation**, v. 67, n. 2015, p. 175-182, 2015.

KY, C. L.; Louarn, J.; Dussert, S.; Guyot, B.; Hamon, S.; Noirot, M.; **Food Chemistry**, v. 75, p. 223, 2001.

LAGO, R.C.A. ANTONIASSI, R. FREITAS, S. C. Composição Centesimal E De Aminoácidos De Café Verde, Torrado e de Borra de Café Solúvel. II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, p. 1473–1478, 2001.

LAPOINTE, A., COUILLARD, C. E LEMIEUX, S. Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 17(10), p. 645-658, 2006.

LIYANA-PARTHIRANA, C., SHAHIDI, F. Optimisation of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**. v. 93, p. 47–56, 2005.

LIMA, A. R.; PEREIRA, R. G. F.; ABRAHÃO, S. A.; DUARTE, S. M. S.; PAULA, F. B. A.; Coffee bioactive compounds: *in vitro* antioxidant activity of green and roasted coffees before and after decaffeination. **Química Nova**, v. 33, n. 1, 2010.

LIU RH. Health benefits of phytochemicals in whole foods. In: Temple NJ, Wilson T, Jacobs DR Jr, editors. Nutritional Health: strategies for disease prevention. **Nutrition and Health**. 3 ed. New York: Humane Press, p. 293-310, 2012.

LOUREIRO, A. P. M., MASCIO, P. E MEDEIROS, M. H. G. Formação de adultos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagenese e carcinogênese. **Química Nova**, v. 25, p. 777, 2002.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22(1), p. 41-7, 2003.

MACHADO, H. et al. Flavonoides e seu potencial terapêutico. Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, v. 27, n. 1/2, 2010.

MANSUR, A.R., SONG, N.E., JANG, H.W., LIM, T.G., YOO, M., NAM, T.G. Optimizing the ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids in common buckwheat sprouts. **Food Chemistry**, v. 293, p. 438–445, 2019.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Café no Brasil, 2017.

MARTINEZ H. E. P.; CLEMENTE J. M.; LACERDA J. S D. E.; NEVES Y. P.; PEDROSA A. W.; (2014). Coffee mineral nutrition and beverage quality. **Ceres**. v. 61, p. 838- 848.

MARTINS, A. L. **História do Café**. São Paulo: Contexto. 2. ed., 2012.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia, [s.l.]**, v. 5, n. 2, p.185-200, 1996.

MAZZA, K. E. L., TELES, A. S. C., CALDAS, T. W., BRÍGIDA, A. I. S., BORGUINI, R. G., & TONON, R. V. Efeito das condições de processo na extração assistida por ultrassom de fenólicos do bagaço de uva. In Embrapa Agroindústria de Alimentos- Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 25.; CIGR SESSION 6 INTERNATIONAL TECHNICAL SYMPOSIUM, 10., 2016, Gramado. Alimentação: árvore que sustenta a vida. Anais. Gramado: SBCTA Regional, 2016.

MEHARI, B.; ABSHIRO-REDI, M.; CHANDRAVANSI, B. S.; ATLABACHEW, M.; COMBRINCK, S.; McCRINDLE, R.; Simultaneous Determination of Alkaloids in Green Coffee Beans from Ethiopia: Chemometric Evaluation of Geographical Origin. **Food Anal. Methods**, 2015.

MEUNIER, I. M. J.; FERREIRA, R. Luiz C. Uso de espécies produtoras de taninos para curtimento de peles no Nordeste do Brasil. **Biodiversidade**, v. 14, n. 1, 2015.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química nova**, v. 28, n. 4, p. 637, 2005.

MORALES, F.; BABEL, M. Melanoidins exert a weak antiradical activity in Águay fluids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4657-4661, 2002.

MUÑOZ, A. E.; HERNÁNDEZ, S. S.; TOLOSA, A. R.; BURILLO, S. P.; OLALLA MUSSATTO, S. I. et al. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 5, p. 661-672, 2011.

NAM, M. W., ZHAO, J., LEE, M. S., JEONG, J. H., LEE, J. Enhanced extraction of bioactive natural products using tailor-made deep eutectic solvents: application to flavonoid extraction from Flos sphorae. **Green Chemistry**, n. 3, v. 17, 1718-1723, 2015.

NARITA, Y.; INOUE, K. Review on utilization and composition of coffee silverskin. **Food Research International**, v. 61, p. 16-22, 2014.

NAVEED, M. HEJAZI, V. ABBAS, M. KAMBOH, A. A. KHAN, J. G., SCHMZAID, M., AHMAD F., BABAZADEH D., FANGFANG, X., MODARRESI-GHAZANI F., WENHUA, L., XIAHUI, Z. Clorogenic acid (ACGS): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67-74, 2018.

NAWROT, P.; JORDAN, S.; EASTWOOD, J.; ROTSTEIN, A.; HOUGENHOLTZ, A.; FEELEY, M. Effects of caffeine on human health, **Food Additives and Contaminants**, v. 20, n. 1, p. 1-30, 2003.

NEHRING, P., GONZAGA, L. V., SERAGLIO, S. K. T., FETT, R., SCHULZ, M., COSTA, A. C. O. Avaliação da capacidade antioxidante in vitro e determinação de compostos fenólicos totais em diferentes sistemas de extração em amostras de hibisco (*hibiscus sabdariffa*). In **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos** (Vol. 1, No. 1), 2015.

NEVES, L.C.; ALENCAR, S. M. de; CARPES, S.T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis melífera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, p. 107-110, 2009.

NOGUEIRA, M.; TRUGO, L. C. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 296-299, 2003.

OLIVEIRA, G. G. G. et al. Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 2, p. 177-187. 2001.

OLIVEIRA, P. D. de. Avaliação sensorial do café cereja descascado, armazenado sob atmosfera artificial e convencional. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.6, p. 1724-1729, 2008.

OZERCAN, I.H.; DAGLI, A.F.; USTUNDAG, B.; OZERCAN, M.R.; BAHCECIOGLU, I.H.; ÇELIK, H.; YALNIZ, M.; POYRAZOGLU, O.K.; ATASEVEN, H. Does instant coffee prevent acute liver injury induced by carbon tetrachloride. **Hepatology Research**, v. 35, p. 163-168, 2006.

PADOVANI, C. R. Delineamento de Experimentos. 1ª ed. São Paulo, 2014.

PARADISO, V. M., CLEMENTE, A., SUMMO, C., PASQUALONE, A., CAPONIO, F. Towards green analysis of virgin olive oil phenolic compounds: Extraction by a natural deep eutectic solvent and direct spectrophotometric detection. **Food chemistry**, v. 212, p. 43-47, 2016.

PATRICIO, V. M. I. et al. Avaliação nutricional da silagem de grãos úmidos de sorgo de alto ou de baixo conteúdo de taninos para leitões na fase de creche. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 1406-1415, 2006.

PEDROSA A. W.; (2014). Coffee mineral nutrition and beverage quality. **Ceres**. v. 61, p. 838- 848.

PEREIRA, G. A. et al. Optimizing the Homogenizer-Assisted Extraction (HAE) of Total Phenolic Compounds from Banana Peel. **Journal of Food Process Engineering**, 2016.

PEREIRA, J. F. B. et al. A stable liquid–liquid extraction system for clavulanic acid using polymer-based aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 441-450. 2012.

PEREIRA, M. C.; CHALFOUN, S. M.; CARVALHO, G. R.; SAVIAN, T. V. Multivariate analysis of sensory characteristics of coffee grains (*Coffea arabica* L.) in the region of upper Paranaíba. **Acta Scientiarum Agronomy** v. 32, n. 4, 2010.

PEREIRA, R. G. F. A.; VILLELA, T. C.; LOPES, L. M. V. Avaliação da composição química de cafés arábica e conilon, produzidos em Rondônia – RO e submetidos a diferentes tipos de pré-processamento. In: **Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil**, p. 638-640, 2000.

RUESGAS-RAMÓN, M; FIGUEROA-ESPINOZA, M, C; DURAND, E. Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 65, n. 18, p.3591-3601, 26 abr. 2017.

SAFDAR, M. N. et al. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 3, p. 488–500, 1 jul. 2017.

SANTOS, C. H. K. *Otimização multiobjetivo da extração de antioxidantes do resíduo da casca de pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze)*. 2016. Dissertação. (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão.

SATO, T.; TAKAHTA, T.; HONMA, T.; WATANABE, M.; WAGATSUMA, N.; MATSUDA, S.; SMITH, R. L.; ITOH, N. Hydrothermal Extraction of Antioxidant Compounds from Green Coffee Beans and Decomposition Kinetics of 3-o-Caffeoylquinic Acid. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 57, p. 7624-7632.

SECZYK, L. Lipoxygenase inhibitors and antioxidants from green coffee – mechanism of action in the light of potential bioaccessibility. **Food Research International**, v. 61, p. 48-55, 2014.

SYAKFANAYA, A. M. et al., **Simultaneously Extraction of Caffeine and Chlorogenic Acid from *Coffea canephora* Bean using Natural Deep Eutectic Solvent-Based Ultrasonic Assisted Extraction**. v. 11, n. 2, p. 267–271, 2019.

TECHNICAL SYMPOSIUM, 10., 2016, Gramado. Alimentação: árvore que sustenta a vida. Anais. Gramado: SBCTA Regional, 2016.

TEIXEIRA, L. D. L. et al. Identification of Ellagitannins and Flavonoids from *Eugenia brasiliensis* Lam. (Grumixama) by HPLC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 22, p. 5417–5427, 2015.

TEWABE, G.; BIKILA, S. L.; Determination of Caffeine Content and Antioxidant Activity of Coffee. **American Journal of Applied Chemistry**, v. 3 (2), pp. 69-76.

TRUGO, L. C.; **PhD Thesis**, University Reading England, 1984.

TOŠOVIĆ, J.; MARKOVIC, J. M.; MARKOVIC, D.; MOJOVIC, M.; MILENKOVIC, D. Antioxidative mechanisms in chlorogenic acid, **Food Chemistry**, 2017.

TSOI, B.; YI, R. N.; CAO, L. F.; LI, S.B.; TAN, R. R.; CHEN, M.; LI, X. X.; WANG, C. LI, Y. F. Comparing antioxidant capacity of purine alkaloids: a new, efficient trio for screening and discovering potential antioxidants in vitro and in vivo. **Food Chemistry**, v. 176, p. 411-419. 2015.

VASCONCELOS, A. L.; FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; GLÓRIA, M. B. A. Água extraction coupled with supercritical Água oxidation in remediation of sand and soil containing PAHs. *Journal of Supercritical Fluids*, v.23, p.123-124, 2003.

WEI, ZUO-FU, XIAOLIN QI, TINGTING LI, MENG LUO, WEI WANG, YUANGANG ZU, YUJIE FU. Application of Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction and Determination of Phenolics in *Cajanus Cajan* Leaves by Ultra Performance Liquid

Chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 149, p. 237–44, 2015.

WENHUA, L., XIAHUI, Z. Chlorogenic acid (ACGS): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67-74, 2018.

WOJEICCHOWSKI, J. P.; MARQUES, C.; MAFRA, L. I.; COUTINHO, J. A. P.; MAFRA, M. R.; Extraction of Phenolic Compounds from Rosemary using Choline Chloride – based Deep Eutectic Solvents. **Separation and Purification Technology**, v. 258, 2020.

XU, H., WANG, W., LIU, X., YUAN, F., & GAO, Y. Antioxidative phenolics obtained from spent coffee grounds (*Coffea arabica* L.) by subcritical Água extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 946-954, 2015.

XU, W. J.; ZHAI, W.J.; CUI, Q.; LIU, J. Z.; LUO, M.; FU, J.Y. ZU, Y. G. Ultra-Turrax based ultrasound-assisted extraction of five organic acids from honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) and optimization of extraction process. **Separation and Purification Technology**, v. 166, p. 73-82, 2016.

YISAK, H., REDI-ABSHIRO, M. AND CHANDRAVANSHI, B. S. ‘Determinação seletiva de cafeína e trigonelina em extrato aquoso de grãos de café verde por FT-MIR ATR espectroscopia, **Vibrational Spectroscopy**, 2018.

YOO, E. D.; JEONG, K. M.; HAN, Y. S.; KIM, E. M.; JIN, Y.; LEE, J. Deep eutectic solvent-based valorization of spent coffee grounds. **Food Chemistry**, v. 355, p. 357-364, 2018.

YUNIARTI, E. SAPUTRI, F. C.; ABDUL, M. Application of the natural deep eutectic solvent choline chloride- sorbitol to extract chlorogenic acid and caffeine from green coffee beans (*Coffea canephora*). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 9(03), pp. 082-090, 2019.

ZHANG, X.; LI, W.; YIN, B.; CHEN, W.; KELLY, D. P.; WANG, X.; ZHENG, K.; DU, Y.; Improvement of near infrared spectroscopic (NIRS) analysis of caffeine in roasted Arabica coffee by variable selection method of stability competitive adaptive reweighted sampling (SCARS). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 114, pp. 350-356, 2013.

ZHOU, P. et al. Enhanced phenolic compounds extraction from *Morus alba* L. leaves by deep eutectic solvents combined with ultrasonic-assisted extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 120, p. 147–154, 2018.

ZHU, K.; CORDEIRO, M.L.; ATIENZA, J.; ROBINSON, W.E.JR.; CHOW, A.S. Irreversible inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by dicaffeoylquinic acids. **J. Virol.** v. 73, p. 3309-3316, 1999.

## APÊNDICE 1 – EFEITO DE MATRIZ

### 1. METODOLOGIA VERIFICAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ

Tendo em vista que a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição, aumentando ou reduzindo o sinal, comprometendo o resultado das análises colorimétricas, torna-se necessário verificar a existência de efeito de matriz no estudo da seletividade.

De acordo com o INMETRO, o estudo do efeito da matriz pode ser conduzido com o preparo de duas curvas analíticas, que contenham a mesma adição de analito para cada nível de concentração. Deste modo, a fim de verificar o efeito de matriz na análise de compostos fenólicos totais são construídas duas curvas de calibração, uma preparada em água e outra na matriz, sendo a matriz o extrato obtido através da extração com o DES constituído de cloreto de colina e ácido láctico 1:2.

A solução inicial é preparada a partir da diluição de 0,05 g de ácido gálico para um volume de 5 mL de água. A solução é submetida a agitação e transferida para um frasco de vidro âmbar. Para o cálculo dos volumes listados na TABELA 1 partiu-se de uma concentração inicial de 10 mg. mL<sup>-1</sup> e um volume final de 2 mL.

TABELA 1 - DADOS DE CONCENTRAÇÃO E VOLUME UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DA CURVA PADRÃO

Padrão	Concentração (mg. mL <sup>-1</sup> )	Volume solução (mL)	Volume extrato (mL)
P1	1,0	0,200	1,800
P2	0,9	0,180	1,820
P3	0,8	0,160	1,840

P4	0,7	0,140	1,860
P5	0,6	0,120	1,880
P6	0,5	0,100	1,900
P7	0,4	0,080	1,920
P8	0,3	0,060	1,940
P9	0,2	0,040	1,960
P10	0,1	0,020	1,980

Em tubos de ensaio adiciona-se em duplicata 1,68 mL de água destilada, 20 µl de amostra (P1, P2, P3...P10), 100 µl da solução de Folin-Ciocalteu a 4% e 200 µl de carbonato de sódio.

As amostras são homogeneizadas, deixando em repouso à temperatura ambiente durante 60 min e protegidas de luz. Por fim, as amostras são submetidas à leitura de absorbância em comprimento de onda de 760 nm em espectrofotômetro. Por fim, para verificar componentes da amostra que possam comprometer o desempenho da análise, alterando o resultado, emprega-se o modelo estatístico *t* de Student com nível de confiança de 95%.

## 2. VERIFICAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ RESULTADO

A partir dos valores de concentração e absorbância das soluções padrão, construiu-se a curva de calibração (FIGURA 1) e obteve-se os parâmetros *a* (coeficiente angular), *b* (coeficiente linear) e  $R^2$  (coeficiente de correlação) da reta de regressão, conforme a TABELA 2.

TABELA 2- CONCENTRAÇÃO vs ABSORBÂNCIA UTILIZADOS NA OBTENÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO UTILIZANDO EXTRATO OBTIDO A PARTIR DO DES CLORETO DE COLINA E ÁCIDO LÁTICO (1:2) E SOLUÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO

Amostra	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Absorbância (u.a)
1	1,0	0,873
2	0,9	0,834
3	0,8	0,739
4	0,7	0,660
5	0,6	0,627



6	0,5	0,452
7	0,4	0,368
8	0,3	0,268
9	0,2	0,169
1	0,1	0,141

---

FONTE: A autora (2019)

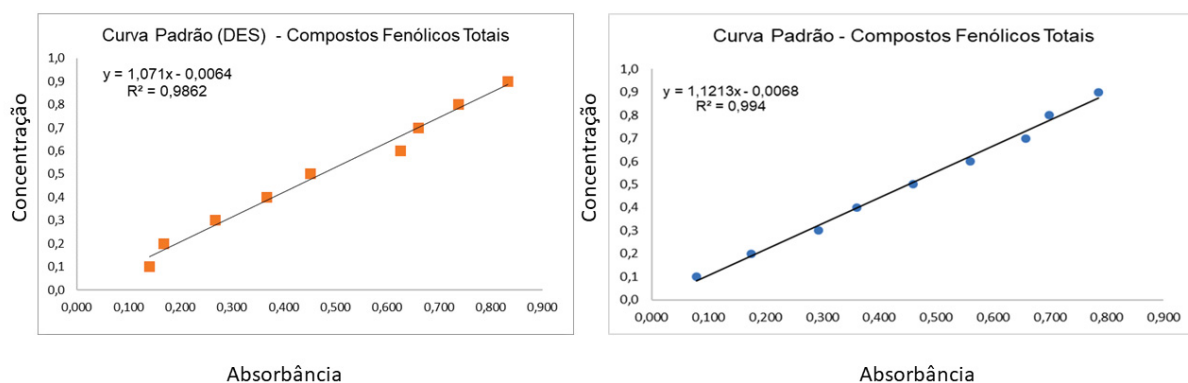
A curva de calibração utilizada nas análises anteriores (FIGURA 1), utilizando água ao invés do extrato, como visto anteriormente, foi obtida através dos seguintes dados (TABELA 3).

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO vs ABSORBÂNCIA UTILIZADOS NA OBTENÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO ÁGUA E SOLUÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO

Amostra	Concentração (mg/L)	Absorbância (nm)
1	1,0	0,794
2	0,9	0,786
3	0,8	0,698
4	0,7	0,657
5	0,6	0,560
6	0,5	0,460
7	0,4	0,361
8	0,3	0,294
9	0,2	0,175
1	0,1	0,080

---

FIGURA 1 - CURVA DE CALIBRAÇÃO UTILIZANDO ÁGUA E SOLUÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO E CURVA DE CALIBRAÇÃO UTILIZANDO EXTRATO OBTIDO A PARTIR DO DES COMPOSTO POR CLORETO DE COLINA E ÁCIDO LÁTICO (1:2) E SOLUÇÃO DE ÁCIDO GÁLICO



Para verificar componentes da amostra que possam comprometer o desempenho da análise, alterando o resultado, empregou-se o modelo estatístico *t* de Student. Os resultados obtidos encontram-se na TABELA 4.

TABELA 4 – TESTE T DE STUDENT

	DES	ÁGUA
Média	0,5131	0,4865
Variância	0,073312544	0,0643605
Observações	10	10
Hipótese da diferença de média	0	
gl	18	
Stat t	0,226702954	
P(T<=t) uni-caudal	0,411604682	
t crítico uni-caudal	1,734063607	
P(T<=t) bi-caudal	0,823209364	
t crítico bi-caudal	2,10092204	

FONTE: A autora (2019)

Obteve-se  $t$  calculado dos experimentos de 0,8232 e  $t$  tabelado crítico de 2,1009. O intervalo de confiança selecionado foi de 95%,  $\alpha = 0,05$ . Deseja-se que não haja variação significativa entre os dois casos, logo utilizou-se o teste- $t$  e foi suposto que as variâncias são diferentes significativamente.

Os graus de liberdade foram determinados pela diferença entre o número de experimentos e o número de variáveis  $GL = 18$ . Logo, não rejeitamos a hipótese nula, não havendo diferença significativa entre as amostras.

Através do teste  $t$  de student concluiu-se que os componentes da matriz da amostra não interferem no desempenho da medição.