

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA ALICE ANTONIASSI

SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DOS GRÃOS CRUS DE CAFÉ
ARÁBICA EMPREGANDO EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO BASEADA EM
SOLVENTES VERDES

CURITIBA

2021

MARIA ALICE ANTONIASSI

SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DOS GRÃOS CRUS DE CAFÉ
ARÁBICA EMPREGANDO EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO BASEADA EM
SOLVENTES VERDES

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

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

CURITIBA

2021

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

A635s

Antoniassi, Maria Alice

Separação dos compostos bioativos dos grãos crus de café arábica empregando extração líquido-líquido baseada em solventes verdes [recurso eletrônico] / Maria Alice Antoniassi. – Curitiba, 2021.

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

Orientador: Marcos Rogério Mafra – Coorientador: Aline T Toci.

1. Compostos fenólicos. 2. Antioxidantes. 3. Solventes orgânicos. 4. Café.
I. Universidade Federal do Paraná. II. Mafra, Marcos Rogério. III. Toci, Aline T. IV. Título.

CDD: 664.0284

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARIA ALICE ANTONIASSI** intitulada: **Separação dos Compostos Bioativo dos Grãos Crus de Café Arábica Empregando Extração Líquido-líquido Baseada em 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 mestra 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, 14 de Dezembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

14/12/2021 12:16:48.0

MARCOS ROGÉRIO MAFRA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

14/12/2021 15:27:22.0

RODRIGO CORRÊA BASSO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS)

Assinatura Eletrônica

15/12/2021 16:49:27.0

DEBORA FRANÇA DE ANDRADE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO)

Aos meus pais, em especial à minha mãe, Lourdes Alice (in memoriam), que sempre foi um grande exemplo de mãe, mulher e educadora, sua força e carinho durante esta trajetória foi o que me inspirou a seguir em frente mesmo nos momentos de incerteza.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora por abençoarem o meu caminho e serem o meu sustento nos momentos de dificuldades.

Ao meu pai José Eduardo, minha mãe Lourdes Alice (*in memoriam*) e meus irmãos Lúcia de Fátima e Eduardo Lourenço por toda força, incentivo e amor. Em todos os momentos, não importando as provações pelas quais passamos, sempre foram os primeiros a me apoiarem a sempre seguir em frente na conquista deste sonho.

De forma especial ao meu orientador Professor Dr. Marcos Mafra pelo acolhimento desde o primeiro dia do mestrado, pelos diversos ensinamentos que vão além da formação acadêmica e por toda a compreensão e disponibilidade durante esses dois anos.

A minha coorientadora Professora Dra. Aline Toci por aceitar fazer parte deste projeto conosco, pela sua dedicação e por compartilhar o seu conhecimento, que foi fundamental para a estruturação desta dissertação.

Aos meus amigos do LATOS pelos momentos de descontração, em especial à Fabiane, Letícia, Danielle e Rodrigo que além do conhecimento acadêmico compartilhado tornaram o processo muito mais fácil e leve.

Aos meus amigos do PPGEQ, Gabriela, Giulia, João Carlos, Lucas e José que tornaram o caminho mais significativo com a presença de cada um.

A Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Engenharia Química pela estrutura disponibilizada.

À CAPES pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte desta grandiosa trajetória.

A vocês, eu deixo o sono.

O sonho, não.

Esse, eu mesmo carrego.

(Paulo Leminski)

RESUMO

Os grãos de café são atrativos no âmbito científico, pois contém ativos que comprovadamente apresentam propriedades nutricionais e medicinais. Estes se encontram presentes em maiores quantidades nos grãos crus do café. Para a obtenção destes compostos, aplica-se processos de extração, estando entre os mais empregados a extração sólido-líquido (ESL), que se destaca pelo baixo custo e simples aplicação. No processo de separação e purificação destes compostos, a extração líquido-líquido (ELL) está entre os mais utilizados. No entanto, tradicionalmente, a ELL emprega solventes orgânicos que podem ser nocivos à saúde e ao meio ambiente. Neste contexto, surgem os solventes eutéticos profundos (DES) que integram a categoria dos solventes verdes como potenciais substituintes aos solventes orgânicos convencionais. Os DES apresentam as vantagens da biodegradabilidade, fácil formação e baixo custo. Inicialmente, na sua composição aplicava-se apenas compostos hidrofílicos, mas com o intuito de ampliar a área de aplicação, recentemente iniciou-se o emprego de compostos hidrofóbicos, surgindo, assim, os DES hidrofóbicos (HDES). Mas ainda são escassos os dados que permitem um completo entendimento deste solvente. Assim sendo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o processo de ELL empregando HDES para a separação dos compostos bioativos presentes nos extratos dos grãos crus de café arábica. Partindo de um planejamento experimental fatorial misto, avaliou-se o teor de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante (AA) na etapa de ESL considerando três variáveis: solvente (água, etanol 50 % e etanol 100 %), temperatura (25 e 40 °C) e razão m/v (1/50 e 1/20). Os maiores valores de CFT e AA foi alcançado pelo extrato a base de etanol 50 % a 25 °C e 1:20 (m/v). Este extrato e um segundo obtido a partir de cloreto de colina 50 % foram empregados na etapa de ELL, a qual foi avaliada da mesma forma analisando os fatores tipo de extrato (definidos pela etapa de ESL) e solvente extrator (quatro HDES a base de mentol e ácidos carboxílicos e um sistema de duas fases aquosas (SDFA) com o intuito de comparar a capacidade de extração nos diferentes meios). Os resultados apontaram maior afinidade dos CFT e antioxidantes pela fase hidrofílica dos sistemas com HDES e pela fase pobre em sal para os SDFA. Este comportamento ocorre devido aos perfis mais hidrofílicos apresentados pelos principais bioativos presentes nos extratos dos grãos crus de café arábica. Entre os HDES, não se observou resultados satisfatórios para os formados por mentol e ácido acético e láctico, visto que os teores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante particionaram-se de forma igualitária entre as fases de topo e fundo. Por outro lado, os HDES formados por mentol e ácido caprílico e láctico demonstraram elevada capacidade de agirem na remoção de compostos indesejados ou concentrar compostos desejados presentes nos extratos dos grãos crus de café arábica, apresentando resultados por vezes superiores aos SDFA. Todavia, os HDES se mostraram capazes de atuar em processos de ELL para a separação dos compostos bioativos do café, tornando-se uma opção favorável para substituição dos solventes orgânicos nestas etapas.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Atividade antioxidante. Solventes eutéticos profundos hidrofóbicos. Sistemas de duas fases aquosas.

ABSTRACT

Coffee beans are scientifically attractive, as they contain actives that proved to have nutritional and medicinal properties. These are present in greater amounts in green coffee beans. To obtain these compounds, extraction processes are applied, being among the most used the solid-liquid extraction (SLE), which stands out for its low cost and simple application. In the process of separation and purification of these compounds, liquid-liquid extraction (LLE) is among the most used. However, traditionally, LLE employs organic solvents that can be harmful to health and the environment. In this context, deep eutectic solvents (DES) appear, which are part of the category of green solvents as potential replacements for conventional organic solvents. DES has the advantages of biodegradability, simple synthesis, and low cost. Initially, only hydrophilic compounds were applied in its composition, but to expand the area of application, the use of hydrophobic compounds in its formulation has recently started, thus giving rise to the hydrophobic DES (HDES). However, data that allow a complete understanding of this solvent are still scarce. Therefore, the present work aims to evaluate the LLE process employing HDES for the separation of bioactive compounds present in the extracts of green Arabica coffee beans. Based on a mixed factorial design of experiment, the content of total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity (AA) in the SLE step were evaluated by three variables: solvent (water, 50 % ethanol, and 100 % ethanol), temperature (25 °C and 40 °C), and m/v ratio (1/50 and 1/20). The best results of TPC and AA was achieved by the 50 % ethanol-based extract at 25 °C and 1:20 (m/v). This extract and a second one obtained from 50 % choline chloride were used in the LLE step, which was evaluated in the same way by analyzing the type of extract factors (defined by the SLE step) and extractant solvent (four base HDES of menthol and carboxylic acids and an aqueous biphasic system (ABS) to compare the extraction capacity in different media). The results showed a greater affinity of TPC and antioxidants for the hydrophilic phase of systems with HDES and the poor salt phase for the ABS. This behavior is due to the more hydrophilic profiles presented by the main bioactive present in the extracts of raw Arabica coffee beans. Among the HDES, no satisfactory results were observed for HDES formed by menthol and acetic and lactic acid, since the levels of total phenolic compounds and antioxidant activity were equally partitioned between the top and bottom phases. On the other hand, the HDES formed by menthol and caprylic and lactic acid demonstrated a high capacity to act in the removal of unwanted compounds or to concentrate desired compounds present in the extracts of raw Arabica coffee beans, showing results sometimes superior to the ABS. However, HDES proved capable of acting in LLE processes for the separation of bioactive compounds from coffee, becoming a favorable option for replacing organic solvents in these steps.

Keywords: Phenolic compounds. Antioxidant activity. Hydrophobic deep eutectic solvents. Aqueous biphasic system.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – GRÃOS CRUS DE <i>COFFEA ARABICA</i> E <i>COFFEA CANEPHORA</i>	23
FIGURA 2 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA CAFEÍNA	25
FIGURA 3 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA TRIGONELINA	26
FIGURA 4 – FÓRMULA ESTRUTURAL DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICOS	27
FIGURA 5 – DIAGRAMA DE FASE DEMONSTRATIVO DE UM SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO	33
FIGURA 6 – NÚMERO DE PUBLICAÇÕES SOBRE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS HIDROFÓBICOS ENTRE OS ANOS DE 2015 E 2020.	35
FIGURA 7 – DISPOSIÇÃO DA DISSERTAÇÃO	40
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS REALIZADAS NO PRESENTE TRABALHO	43
FIGURA 9 – APARATO EXPERIMENTAL PARA A EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO UTILIZANDO AGITAÇÃO MAGNÉTICA	47
FIGURA 10 – APARATO EXPERIMENTAL PARA A EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO UTILIZANDO ULTRA-TURRAX	48
FIGURA 11 – ESTRUTURA QUÍMICA E FUNÇÃO DOS REAGENTES NOS DES HIDROFÓBICOS	53
FIGURA 12 – GRÁFICO DE EFEITOS PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	62
FIGURA 13 – INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA RAZÃO M/V NO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS OBTIDOS A 25 °C E 40 °C.....	63
FIGURA 14 – GRÁFICO DE EFEITOS DA ATIVIDADE DE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DPPH	66
FIGURA 15 – INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA RAZÃO M/V NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DPPH DOS EXTRATOS OBTIDOS A 25 °C E 40 °C	67
FIGURA 16 – GRÁFICO DE EFEITOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP	70

FIGURA 17 – INFLUÊNCIA DO SOLVENTE DA RAZÃO M/V E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP DOS EXTRATOS OBTIDOS.....	71
FIGURA 18 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS RESULTADOS DO TEOR DE CFT OBTIDOS PARA A FASE DE TOPO E FUNDO NOS TEMPOS DE 24 E 96 HORAS	80
FIGURA 19 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DPPH OBTIDOS PARA A FASE DE TOPO E FUNDO NOS TEMPOS DE 24 E 96 HORAS.....	85
FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP OBTIDOS PARA A FASE DE TOPO E FUNDO NOS TEMPOS DE 24 E 96 HORAS	90
FIGURA 21 – COMPARATIVO ENTRE AS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO COM ÁGUA (●) E ETANOL (■).....	110
FIGURA 22 – COMPARATIVO ENTRE AS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX PARA O MÉTODO DPPH COM ÁGUA (●) E ETANOL (■)	112
FIGURA 23 – COMPARATIVO ENTRE AS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX PARA O MÉTODO FRAP COM ÁGUA (●) E ETANOL (■)	113

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PRINCIPAIS COMPONENTES DOS GRÃOS CRUS DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE CAFÉ.....	24
TABELA 2 – NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A ESL.....	45
TABELA 3 – PLANEJAMENTO FATORIAL MISTO PARA A ETAPA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO.....	45
TABELA 4 – PROPORÇÃO MOLAR E REFERÊNCIAS UTILIZADAS PARA A PREPARAÇÃO DOS DES HIDROFÓBICOS.....	54
TABELA 5 – NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A ELL.....	54
TABELA 6 – PLANEJAMENTO FATORIAL MISTO PARA A ETAPA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	55
TABELA 7 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS DE CAFÉ ARÁBICA.....	60
TABELA 8 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS DE <i>COFFEA ARABICA</i>	61
TABELA 9 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE CAFÉ ARÁBICA PELO MÉTODO DPPH.....	64
TABELA 10 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH DOS EXTRATOS DE <i>COFFEA ARABICA</i>	65
TABELA 11 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE CAFÉ ARÁBICA PELO MÉTODO FRAP.....	68
TABELA 12 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP DOS EXTRATOS DE <i>COFFEA ARABICA</i>	69
TABELA 13 – TEORES DE TRIGONELINA, CAFEÍNA E ÁCIDOS CLOROGÊNICOS NO EXTRATO DOS GRÃOS CRUS DE CAFÉ ARÁBICA.....	73
TABELA 14 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DAS FASES DE TOPO E FUNDO OBTIDAS PELA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO NOS TEMPOS DE 24 E 96 HORAS.....	77

TABELA 15 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NA FASE DE TOPO DA ELL..	79
TABELA 16 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NA FASE DE FUNDO DA ELL	79
TABELA 17 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH DAS FASES DE TOPO E FUNDO OBTIDA PELA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO NOS TEMPOS DE 24 E 96 HORAS	82
TABELA 18 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH NA FASE DE TOPO DA ELL	84
TABELA 19 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH NA FASE DE FUNDO DA ELL.....	84
TABELA 20 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP DAS FASES DE TOPO E FUNDO OBTIDA PELA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO NOS TEMPOS DE 24 E 96 HORAS	87
TABELA 21 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP NA FASE DE TOPO DA ELL	88
TABELA 22 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP NA FASE DE FUNDO DA ELL.....	89
TABELA 23 – DADOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO PARA A ANÁLISE DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	109
TABELA 24 – TESTE-T PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO (COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS).....	110
TABELA 25 – DADOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH.....	111
TABELA 26 – TESTE-T PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX (DPPH)	112
TABELA 27 – DADOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX PARA A ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP	113

TABELA 28 – TESTE-T PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX (FRAP)

.....114

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

3-ACQ	- Ácido 3-cafeoilquínico
4-ACQ	- Ácido 4-cafeoilquínico
5-ACQ	- Ácido 5-cafeoilquínico
4,5-AFQ	- Ácido 4,5-feruloquínico
3,4-AdiCQ	- Ácido 3,4-dicafeoilquínico
3,5-AdiCQ	- Ácido 3,5-dicafeoilquínico
4,5-AdiCQ	- Ácido 4,5-dicafeoilquínico
AA	- Atividade antioxidante ou <i>antioxidant activity</i>
ABS	- <i>Aqueous biphasic system</i> (sistema aquoso bifásico)
ACG	- Ácido clorogênico
AG	- Ácido gálico
ANOVA	- <i>Analise of variance</i> (Análise de variância)
CFT	- Compostos fenólicos totais
ChCl	- Cloreto de colina
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	- <i>Diode-array detection</i> (detector de arranjo de diodos)
d.C.	- Depois de Cristo
DES	- <i>Deep eutetic solvents</i> (Solventes eutéticos profundos)
DP	- Desvio padrão
DPPH	- 1,1 difenil-2-picril-hidrazil
EAG	- Equivalente de ácido gálico
ELL	- Extração líquido-líquido
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária
ESL	- Extração sólido-líquido
ET	- Equivalente de Trolox
FRAP	- <i>Ferric reduction antioxidant power</i> (Poder de redução do íon ferro)
G.L.	- Graus de liberdade
HBA	- <i>Hydrogen bond acceptor</i> (receptor de ligação de hidrogênio)
HBD	- <i>Hydrogen bond donor</i> (doador de ligação de hidrogênio)
HDES	- <i>Hydrophobic deep eutectic solvent</i> (solvent eutéticos profundo hidrofóbico)
HPLC	- <i>High performance liquid chromatography</i>

K ₂ HPO ₄	- Fosfato de potássio dibásico
LATOS	- Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação
LLE	- <i>Liquid-liquid extraction</i> (extração líquido-líquido)
LI	- Líquido iônico
MAA	- Mentol:ácido acético
MCAP	- Mentol:ácido caprílico
MLAT	- Mentol:ácido láctico
MLAU	- Mentol:ácido láurico
p-ACoQ	- Ácidos p-cumaroilquínicos
p-valor	- Valor de probabilidade
RMN	- Ressonância magnética nuclear
SDFA	- Sistema de duas fases aquosas
SLE	- <i>Solid-liquid extraction</i> (extração sólido-líquido)
TPC	- <i>Total phenolic compounds</i> (compostos fenólicos totais)
TPTZ	- Tripiridiltriazina
Trolox	- 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UHPLC	- <i>Ultra-high-performance liquid chromatography</i>
UNILA	- Universidade Federal da Integração Latino-Americana
UV-vis	- Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

PARTE I	18
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA E ESTADO DA ARTE	19
1.1 INTRODUÇÃO	19
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.2.1 Histórico do café e seu cenário no mercado brasileiro	21
1.2.2 Composição química dos grãos de café.....	22
1.2.2.1 Cafeína	25
1.2.2.2 Trigonelina.....	26
1.2.2.3 Ácidos clorogênicos.....	27
1.2.3 Processos de extração e separação de biocompostos	28
1.2.3.1 Extração líquido-líquido	29
1.2.3.1.1 Sistema de duas fases aquosas	30
1.2.4 Solventes eutéticos profundos	31
1.2.4.1 Os HDES e suas aplicações em processos de extração.....	34
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS E ESCOPO	39
2.1 OBJETIVOS	39
2.1.1 Objetivo geral	39
2.1.2 Objetivos específicos.....	39
2.2 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	40
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 PREPARO DA AMOSTRA DOS GRÃOS CRUS DE CAFÉ ARÁBICA	43
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA A ETAPA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO	44
3.3 PROCESSO DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO	47
3.4 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS	49
3.4.1 Determinação dos compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu	
49	
3.4.2 Análise da atividade antioxidante	50
3.4.2.1 DPPH.....	50
3.4.2.2 FRAP	51

3.4.3 Análise do perfil de composição dos extratos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência	51
3.5 SÍNTESE DOS SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS HIDROFÓBICOS	53
3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA A ETAPA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	54
3.7 PROCESSO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	56
3.7.1 Preparo do sistema de duas fases aquosas.....	56
3.8 AVALIAÇÃO DAS FASES DE TOPO E FUNDO	57
PARTE II	58
CAPÍTULO 4 - PLANEJAMENTO FATORIAL MISTO PARA A ETAPA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO	59
4.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO	59
4.1.1 Teor de compostos fenólicos totais	59
4.1.2 Atividade antioxidante	64
4.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE COMPOSIÇÃO DETERMINADO POR CROMATOGRAFIA.....	72
CAPÍTULO 5 - PLANEJAMENTO FATORIAL MISTO PARA A ETAPA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO	75
5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	75
5.1.1 Teor de compostos fenólicos totais para a etapa de ELL.....	76
5.1.2 Atividade antioxidante para a etapa de ELL	81
PARTE III	93
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO	94
6.1 CONCLUSÕES	94
6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	96
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS E APÊNDICES.....	97
REFERÊNCIAS.....	97
APÊNDICE 1 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO E EFEITO MATRIZ.....	109

PARTE I

Motivação, estado da arte, objetivos e descrição experimental

Nesta parte será apresentado a motivação, a revisão da literatura e o estado da arte atual, assim como os objetivos e o escopo desta dissertação. Além disso, serão descritos os materiais e as metodologias empregadas para a realização do trabalho.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA E ESTADO DA ARTE

1.1 INTRODUÇÃO

Desde sua propagação, o café tem desempenhado um importante papel na sociedade influenciando na economia mundial e ditando costumes ao longo de sua história. Para o Brasil, maior produtor e consumidor deste grão, o café apresenta grande importância cultural e econômica.

Existem cerca de 100 diferentes espécies de café, entretanto apenas as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, conhecidas popularmente como café arábica e robusta, respectivamente, possuem valor comercial. Essas espécies apresentam diferentes composições químicas, que além de influenciar na produção e consumo de uma bebida de qualidade, desperta o interesse industrial e científico pelos compostos bioativos presentes nos grãos e potencial aplicação nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Conhecido como uma fonte natural de antioxidantes, seus principais compostos bioativos são a cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos, já existindo estudos clínicos que apontam estes compostos como promissores suplementos naturais visando um estilo de vida mais saudável para quem os consome.

Durante o processamento dos grãos de café para obtenção da bebida, tanto a trigonelina, quanto os ácidos clorogênicos são quase que completamente degradados no processo de torra, o qual emprega elevadas temperaturas. Desta forma, para que seja possível obter o máximo do potencial bioativo deste grão, faz-se necessário o desenvolvimento de processos capazes de extrair, separar e purificar estes compostos da matriz, de maneira prévia ao processamento (café cru), preservando suas atividades funcionais. Para tanto, o processo de extração sólido-líquido (ESL) é o mais utilizado. A ESL se baseia no contato da matriz sólida (café cru) com um solvente líquido capaz de solubilizar os compostos de interesse. Além da ESL, etapas sequenciais de separação, como a extração líquido-líquido (ELL), favorecem a purificação dos compostos de interesse. A ELL se destaca por seu baixo custo energético, fácil aplicação, além de apresentar alta flexibilidade das condições operacionais.

Em ambos os processos, ESL e ELL, os solventes orgânicos como acetona, etanol, metanol, propanol ou suas misturas são amplamente utilizados considerando

sua alta capacidade extrativa. Entretanto, estes solventes são muitas vezes nocivos ao ser humano e ao meio ambiente, além de causar a degradação de alguns compostos bioativos de interesse.

Neste contexto, os solventes eutéticos profundos (DES, do inglês, *Deep Eutectic Solvents*) surgem como uma alternativa ambientalmente correta, de maior biodegradabilidade e biocompatibilidade com os compostos de interesse. Os DES podem ser definidos como uma mistura eutética de doadores e receptores de ligação hidrogênio, a qual apresenta um profundo abaixamento da temperatura do ponto eutético real comparado ao da solução ideal. Dentre as vantagens conferidas aos DES, destacam-se a síntese simples, o baixo custo e a maior biodegradabilidade em relação aos solventes orgânicos. Quanto às propriedades físico-químicas, os DES apresentam baixa volatilidade, comumente, densidade superior à da água e alta viscosidade. Embora a alta viscosidade possa ser limitante em processos que envolvam transferência de massa, estratégias como aumento da temperatura de processo e adição de água de forma controlada resultam em significativa redução da viscosidade.

No que diz respeito a sua composição, os primeiros DES descritos na literatura são formados por compostos de maior caráter hidrofílico, normalmente um sal quaternário de amônio, como receptor de hidrogênio, e amidas, álcoois ou açúcares, como moléculas doadoras de hidrogênio. Entretanto, com o intuito de aumentar a aplicabilidade dos DES, compostos de maior hidrofobicidade têm sido utilizados para sua obtenção, como por exemplo: DL-mentol, ácidos carboxílicos, ou ainda sais quaternários de amônio e ácidos de cadeia longa. Embora mais recentes, os DES de maior caráter hidrofóbico já apresentam grande potencial de aplicação, principalmente no processo de extração de biomoléculas hidrofóbicas em processos de ELL. No entanto, ainda são escassas na literatura informações como os dados de equilíbrio que permitem um melhor entendimento destes solventes para futuras aplicações.

Dessa forma, este trabalho tem por objetivo realizar a ELL empregando DES hidrofóbicos em um extrato de café arábica previamente obtido. A partir deste processo, será avaliado a capacidade de separação do solvente através de análises de atividade antioxidante e compostos fenólicos.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção será apresentada uma breve revisão da literatura e o estado da arte envolvendo os temas abordados nesta dissertação.

1.2.1 Histórico do café e seu cenário no mercado brasileiro

Classificado no ano de 1735, em um trabalho publicado pelo naturalista Carlos Lineu, como pertencente à família botânica *rubiacae* e gênero *Coffea*, o cafeeiro tem o início da sua história marcada por lendas acerca de sua descoberta (MARTINS, A., 2012).

Esta planta é originária do continente africano, mais especificamente da região da Etiópia, e seu primeiro relato data do ano de 575 d.C., quando um pastor de ovelhas, observando a agitação de seu rebanho após ingerir o fruto de um arbusto desconhecido, decide provar seus efeitos e ao sentir o impacto estimulante, dissemina a notícia pela região (PENDERGRAST, 2010).

No final do século VI, o café chega ao Iêmen, onde se torna parte integrante da cultura local, mas é apenas no século XIV que a bebida passa a ser produzida da forma como a conhecemos hoje. É, também, no Iêmen que a fruta recebe o nome de 'quahweh', palavra que antigamente era utilizada pelos árabes como um termo poético para se referir ao vinho, por isso, torna-se conhecida como o "vinho das Arábias" (PENDERGRAST, 2010; SMITH, R., 1985).

Cultiva-se o café de forma lucrativa em parte do Oriente Médio e norte da África. Por meio da comercialização no Mar Vermelho, a planta enfim chega à Europa no final do século XV onde se espalhou rapidamente estando presente em todos os países europeus e grande parte de suas colônias entre os séculos XVII e XVIII (SMITH, R., 1985).

No Brasil o café chega pela Guiana Francesa no ano de 1727 e começa a ser cultivado com sucesso no Pará. Entretanto, com o fim da era do ouro em Minas Gerais, 1781, a planta ganha maior destaque no país e passa a ser produzida no Rio de Janeiro, logo se espalhando para São Paulo, estado que se tornou em 1880 o maior produtor (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2007). Em 1845 o Brasil era o principal produtor desse grão, responsável por 45 % da produção mundial, e apesar das crises enfrentadas em 1929 e 1975, até hoje mantém este

posto, contando, atualmente, com áreas de cultivo expressivo nos estados de São Paulo, Paraná, sul de Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e Rondônia (REVISTA CAFEICULTORES, 2006; VOLSI *et al.*, 2019).

Não apenas um grande exportador, mas também um grande consumidor, na safra de 2020/2021 o Brasil ultrapassou os Estados Unidos como maior consumidor da *commodity*, tendo o mercado brasileiro uma participação de cerca de 14 % no consumo mundial de café. Durante este período de pandemia houve uma queda do consumo de café verificada em vários países, no entanto mesmo com um cenário de inflação e perda do poder de compra do consumidor, por já ter uma tradição forte de consumo da bebida do café em casa, no Brasil a queda observada foi menor que comparado a outros países (AGÊNCIA BRASIL, 2021).

Na safra de 2020/2021, a produção mundial de café atingiu 169,6 milhões de sacas de 60 kg, 99,3 milhões de sacas da espécie *Coffea arabica* e 70,4 milhões de sacas a *Coffea canephora*. Neste mesmo período, a produção africana apresentou um aumento de 0,1 % na produção, a Ásia e a Oceania, e a América Central e o México tiveram sua produção diminuída em 1,1 % e 2,1 %, respectivamente. No entanto, a produção na América do Sul sofreu um aumento de 1,9 %. No Brasil, para a safra de 2021/2022 as previsões são incertas devido a períodos de estiagem e a geada enfrentada no ano de 2021 que danificaram numerosos cafezais (EMBRAPA, 2021).

1.2.2 Composição química dos grãos de café

Existe cerca de 100 diferentes espécies de café, sendo que dessas apenas duas possuem grande significância comercial, a *Coffea arabica*, conhecido como arábica, e a *Coffea canephora*, chamado de conilon, quando é produzido no Brasil, ou robusta nas demais partes do mundo (FIGURA 1). Embora pareçam similares, as espécies se diferem em vários aspectos, desde a composição química até a adaptabilidade nas regiões de cultivo (CAGLIANI *et al.*, 2013; BESSADA *et al.*, 2018; PRUVOT-WOEHL; KRISHNAN; SOLANO, 2020).

FIGURA 1 – GRÃOS CRUS DE *COFFEA ARABICA* E *COFFEA CANEPHORA*

FONTE: A autora (2021).

O café arábica caracteriza-se por ser mais complexo, contém 44 cromossomos, o que impossibilita o cruzamento deste com outras espécies. Desenvolve-se melhor em regiões de grandes altitudes, com temperaturas na faixa de 15 °C a 22 °C e precipitação anual média de 1500 mm, o seu cafeeiro pode alcançar de 4 – 6 m (MARTINS, M. Q.; PARTELLI; GOLYNSKI, 2019; BEE *et al.*, 2005; MARTINS, A., 2012).

Por outro lado, como o próprio nome já sugere, a árvore da espécie *Coffea canephora* é mais robusta. Atualmente é cultivada em baixas e médias altitudes, adapta-se a regiões com variação da temperatura por volta de 17 °C a 33 °C e precipitação média anual de 1200 mm. A espécie possui 22 cromossomos, sua árvore pode alcançar de 8 – 12 m e é mais resistente a pragas e intempéries (MARTINS, M. Q.; PARTELLI; GOLYNSKI, 2019; BEE *et al.*, 2005; MARTINS, A., 2012).

O principal diferencial entre estas espécies está na composição química, que implica diretamente na formação do aroma e sabor da bebida. É conhecido que o café arábica possui o aroma mais intenso e gosto mais suave, enquanto o café robusta produz uma bebida mais amarga e adstringente. Estas características devem-se ao fato de os grãos de café robusta conterem maiores quantidades de cafeína e compostos antioxidantes. Nos cafés instantâneos é comumente utilizado o café robusta, por este também possuir maior teor de sólidos solúveis, que conferem corpo à bebida e aumentam a produção. Entretanto, para que a bebida tenha sabor mais agradável, este café é tradicionalmente empregado como um *blend* do café arábica (MARTINS, A., 2012; FARAH, 2012; LEMOS; PEREZ; DA CUNHA, 2020).

No Brasil há regiões especializadas no cultivo de determinada espécie. O estado de Rondônia é responsável pela maior produção de café conilon no país,

enquanto Minas Gerais e Bahia produzem predominantemente o café arábica (VOLSI *et al.*, 2019). Esta especificidade também está presente entre os 3 maiores produtores mundiais de café. O Brasil produz ambas as espécies, em contrapartida, o Vietnã e a Colômbia, segundo e terceiro maiores produtores, cultivam apenas a variedade robusta e arábica, respectivamente (PRUVOT-WOEHL; KRISHNAN; SOLANO, 2020).

Denomina-se “café verde” as sementes cruas do cafeeiro que foram descascadas, mas não submetidas ao processo de torrefação (ŞEMEN *et al.*, 2017; PERDANI; PRANOWO; QONITATILAH, 2019). Este compreende a maior porcentagem do café exportado no mundo, representando 91 % do total exportado entre 2014 e 2018 (ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ, 2019).

A composição do café verde é bastante complexa, com mais de 700 compostos que conferem o sabor, o aroma e a atividade antioxidante característicos deste grão. Esta característica é fortemente influenciada por fatores genótipos e ambientais e interfere diretamente na qualidade da bebida. Constituintes bioquímicos como a cafeína, trigonelina, ácidos clorogênicos, açúcares e lipídios são os que mais afetam os traços sensoriais. Posto isso, estudos demonstram que altas quantidades de cafeína e ácidos clorogênicos nos grãos de café verde resultam em uma bebida de sabor inferior. Na TABELA 1 estão apresentados os principais constituintes dos grãos crus de café considerando-se as duas espécies mais comercializadas atualmente (ŞEMEN *et al.*, 2017; LEMOS PEREZ; DA CUNHA, 2020; CHENG, B. *et al.*, 2016; BARBOSA *et al.*, 2019).

TABELA 1 – PRINCIPAIS COMPONENTES DOS GRÃOS CRUS DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE CAFÉ

Componente	Concentração (g/100 g)	
	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea canephora</i>
Polissacarídeos	34 - 44	48 - 55
Monossacarídeos	0,1 - 0,2	0,4 - 0,5
Oligossacarídeos	6 - 9	3 - 7
Proteínas	8,5 - 11	11 - 15
Aminoácidos livres	0,2 - 0,5	0,8 - 1
Minerais	3,0 - 4,2	4,4 - 5,4
Lipídios	15 - 18	8 - 12
Óleo	15 - 17	7 - 10
Cafeína	0,8 - 1,4	1,7 - 4,0
Trigonelina	0,6 - 2	0,3 - 0,9
Ácidos clorogênicos	4,1 - 9,2	6,1 - 12,1

FONTE: Adaptado de Farah (2012) e Belitz, Grosch e Schieberle (2009).

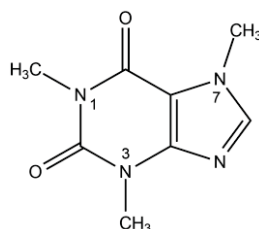
Os componentes bioativos presentes no café verde conferem ao grão características antioxidantes, despertando cada vez mais o interesse da aplicação dos grãos crus de café nas indústrias farmacêutica e nutricional. Estudos clínicos apontam potencial aplicação do óleo do café verde na indústria de cosméticos e feitos terapêuticos do extrato na gestão de diversas disfunções como a obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e redução da mortalidade em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana e da hepatite C (BABOVA; OCCHIPINTI; MAFFEI, 2016; WAGEMAKER *et al.*, 2011; GOUTHAMCHANDRA *et al.*, 2017; CARRIERI; PROTOPOPESCU; MARCELLIN, 2017).

Como citado, os compostos bioativos são frequentemente relacionados a redução do risco de doenças crônicas. Eles podem ser classificados em amplas categorias como compostos fenólicos, alcaloides, compostos nitrogenados, organossulfurados, fitosteróis e carotenoides. Apesar de muitos destes compostos já terem sido identificados, estima-se que ainda há uma grande porcentagem que não foi devidamente identificada e estudada. No café as substâncias biologicamente ativas que se destacam por exercer benefícios à saúde humana são os alcaloides cafeína e trigonelina e os compostos fenólicos que são formados principalmente pelos ácidos clorogênicos (LIU, 2012; ABRAHÃO *et al.*, 2008).

1.2.2.1 Cafeína

A cafeína é uma metilxantina conhecida quimicamente como 1,3,7-trimetilxantina (FIGURA 2). Faz parte de um grupo de compostos conhecidos como alcaloides púricos e se destaca por ser o principal alcaloide presente nos grãos de café. Apresenta estabilidade térmica e características amargas, entretanto é responsável por não mais de 10 % do amargor presente na bebida do café (ASHIHARA; CROZIER, 2001; ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; FARAH, 2012).

FIGURA 2 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA CAFEÍNA



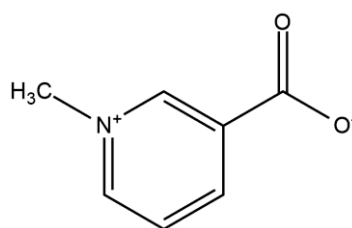
FONTE: A autora (2021).

A cafeína é conhecida por ser um dos compostos que mais causa debates na ciência no tocante aos benefícios ou malefícios do consumo do café em detrimento à saúde humana. Seus principais efeitos no corpo humano, sejam eles positivos ou negativos, estão relacionados ao sistema cardiovascular, sistema nervoso central, modificações no metabolismo de carboidratos e mecanismos inflamatórios. Desta forma, o consumo de café descafeinado cresce entre o público que busca uma forma de vida mais saudável, principalmente entre aqueles que apresentam ou são suscetíveis às doenças cardiovasculares (MEJIA; RAMIREZ-MARES, 2014; CANO-MARQUINA; TARÍN; CANO, 2013; SHLONSKY; KLATSKY; ARMSTRONG, 2003).

1.2.2.2 Trigonelina

A trigonelina ou ácido 1-N-metil nicotínico (FIGURA 3) é o segundo alcaloide mais importante do café, atrás apenas da cafeína. Está presente em maiores níveis no café verde, devido a intensa degradação térmica sofrida durante o processamento do grão (HATZOLD, 2012; JESZKA-SKOWRON; FRANKOWSKI; ZGOLA-GRESKOWIAK, 2020; NOGUEIRA; TRUGO, 2003).

FIGURA 3 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA TRIGONELINA



FONTE: A autora (2021).

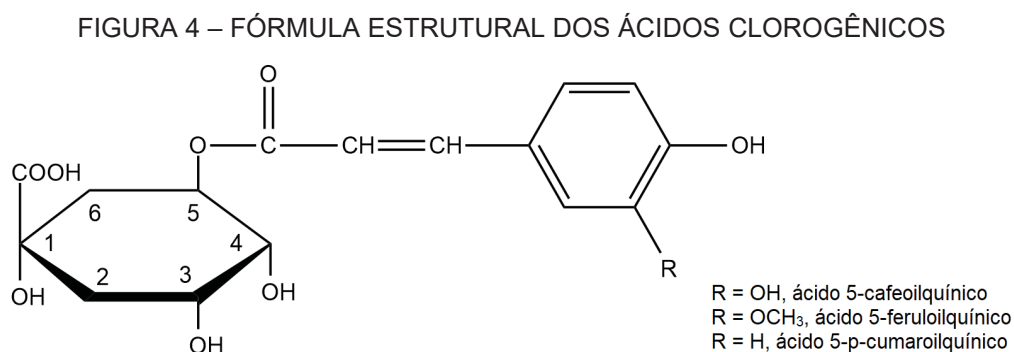
No processo de torrefação, a trigonelina gera diferentes classes de compostos voláteis, como os derivados das piridinas e pirrol, que são os responsáveis por conferir o sabor e aroma característicos da bebida do café. Entre os compostos formados, tem-se o ácido nicotínico (niacina), conhecida como vitamina B3. Tais transformações conferem ao café a característica ímpar de ser um alimento que após submetido a um processo drástico gera biocompostos importantes para o metabolismo humano (FARAH, 2012; ASHIHARA, 2015; MONTEIRO; TRUGO, 2005).

A trigonelina é um biocomposto importante para o ser humano. Há estudos sobre o seu potencial de bioatividade na prevenção de doenças cardiovasculares, na atuação como neuroprotetor e como composto anticâncer (HU *et al.*, 2019).

1.2.2.3 Ácidos clorogênicos

Os ácidos clorogênicos (ACG) formam um grupo de compostos fenólicos que fazem parte da família dos ésteres e são formados a partir da esterificação de um ou mais derivados do ácido trans-cinâmico com o ácido quínico. Apesar de estar presente em diversas plantas, o café cru é a principal fonte deste composto (BASTOS DE MARIA; MOREIRA, 2004; NARITA; INOUE, 2015).

Os isômeros dos ACG podem ser divididos em subgrupos, sendo os principais os ácidos cafeoilquínico (ACQ), ácidos dicafeoilquínico (AdiCQ), ácidos feruloilquínico (AFQ) e em menor quantidade os ácidos p-cumaroilquínicos (p-ACoQ) (BASTOS DE MARIA; MOREIRA, 2004). Entre os compostos destes grupos, o que está presente em maior quantidade no café é o 5-ACQ, o qual representa mais de 50 % (m/m) do total de ACG presente nos grãos crus de café (NARITA; INOUE, 2015). Na FIGURA 4 está apresentado a estrutura química genérica do ácido clorogênico e a composição de seus principais isômeros.



FONTE: A autora (2021).

Assim como a trigonelina, os ácidos clorogênicos também sofrem degradação térmica no processo de torrefação. Quanto maior o grau de torra, menor será a quantidade de ácidos clorogênicos presentes na amostra (FARAH *et al.*, 2005). Na bebida do café os ACG conferem pigmentação, aroma e adstringência, ademais, a sua degradação térmica gera compostos fenólicos que contribuem para

o amargor. Farah *et al.* (2006) também constataram que o maior teor de ACGs nos grãos crus de café resultam em uma bebida de qualidade inferior.

Devido às características bioativas, há um grande interesse nos ácidos clorogênicos. Seus isômeros apresentam propriedades que podem ser utilizadas para proteger pessoas contra os danos no sistema cardiovascular observados no diabetes (STEFANELLO; SPANEVELLO; PASSAMONTI, 2019). Além disso, tem demonstrado propriedades benéficas como proteção hepática, atividade antioxidante, anticâncer e proteção de morte celular cerebral (FANALI; DELLA POSTA; DUGO, 2020).

No setor alimentício, o ACG pode ser empregado como um suplemento aditivo natural e seguro, visando substituir os aditivos químicos sintéticos. Isto se deve pelo fato de possuir atividade antimicrobiana, inibir a oxidação lipídica e funcionar como um prebiótico (NAVEED; HEJAZI; ABBAS, 2018; SANTANA-GÁLVEZ; CISNEROS-ZEVALLOS; JACOBO-VELÁZQUEZ, 2017).

É crescente o interesse por antioxidantes de fontes naturais que sejam seguros para prevenir o dano oxidativo de células vivas e possam substituir os antioxidantes sintéticos (LIMA *et al.*, 2010). Contudo é fundamental o estudo de metodologias de extração menos agressivas, uma vez que os bioativos antioxidantes podem ser degradados quando submetidos a elevadas temperaturas ou face a alguns solventes (MEIRELES, 2009).

1.2.3 Processos de extração e separação de biocompostos

O processo de extração consiste em uma operação físico-química de transferência de massa, onde, a partir do contato direto do solvente com a matriz, seja ela sólida ou líquida, determinados compostos são separados, extraídos. Este processo possui inúmeras aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica sendo amplamente aplicado na extração de compostos bioativos de matrizes vegetais (TZIA; LIANDAKIS, 2003).

As técnicas mais aplicadas para a extração de compostos fenólicos empregam tanto solventes orgânicos, como inorgânicos. A escolha da metodologia a ser aplicada é dependente do tipo da matriz e de seus compostos bioativos de interesse. Desta forma, alguns parâmetros podem influenciar significativamente na eficiência da extração, como o tempo de extração, a temperatura, a razão

solvente/amostra, o número de repetições de extração da amostra e o tipo de solvente, sendo este último um dos fatores principais (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Para atender à seletividade de extração das variadas matrizes de fontes naturais, diferentes técnicas são utilizadas. Entre as técnicas convencionais, pode-se citar a extração por soxhlet, maceração e destilação. Visando intensificar o processo de extração, tem surgido diversas técnicas não convencionais, dentre as quais destacam-se a extração assistida por ultrassom, extração de campo elétrico pulsado, extração assistida por micro-ondas, extração por líquido pressurizado e extração por fluido supercrítico. Essas técnicas normalmente apresentam custo mais elevado que as convencionais. Apesar de diferentes, todas possuem objetivos equivalentes, ou seja, a extração de compostos bioativos alvo com elevado rendimento e seletividade, e fornecimento de um método que seja possível a sua reprodução independente das variações que possam ocorrer na matriz (AZMIR; ZAIDUL; RAHMAN, 2013; SOSA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2018).

Atualmente, muita atenção é dada para o desenvolvimento de tecnologias integradas e sustentáveis para produzir, extrair, separar e purificar uma ampla variedade de compostos bioativos. As técnicas de separação e purificação são, normalmente, mais complexas devido a dificuldades em isolar os compostos de interesse com altos rendimentos e pureza. Além disso, geralmente emprega-se condições severas e solventes orgânicos voláteis (VENTURA; SILVA; QUENTAL, 2017).

Alternativamente, a extração líquido-líquido (ELL) se configura como um processo simples e de baixo custo, quando avaliado isoladamente. Além disso, dependendo do solvente empregado, a ELL pode apresentar alta biocompatibilidade e seletividade.

1.2.3.1 Extração Líquido-Líquido

Segundo Perry e Green (1984), a extração líquido-líquido (ELL) é um processo de separação que envolve a transferência de massa de um componente em solução (soluto) entre duas fases líquidas imiscíveis.

Dentro do processo de ELL, o soluto representa o composto de interesse, a alimentação é a solução que contém o soluto a ser separado e o solvente ou

solvente extrator é o líquido imiscível adicionado ao processo com o objetivo de extrair o soluto. Dependendo da complexidade da matriz, o processo pode ser empregado em um ou mais estágios. Na operação de múltiplos estágios, o processo de separação é repetido sucessivas vezes, podendo ser empregado o mesmo ou diferentes solventes em cada estágio (PERRY; GREEN, 1984; FACCHIN; PASQUINI, 1998; SILVESTRE *et al.*, 2009).

O processo de extração líquido-líquido possui inúmeras aplicações nas indústrias hidrometalúrgicas, petroquímicas, farmacêutica, ambiental e nuclear. É empregado para a recuperação de metais, extração de biocompostos termossensíveis, recuperação de óleo vegetal em substratos naturais, extração de poluentes, entre outras aplicações. Contudo, em alguns casos, este processo emprega solventes orgânicos que possuem elevada toxicidade, inflamabilidade, além de poder gerar compostos orgânicos voláteis (ZHANG, J. *et al.*, 2019; HUDDLESTON *et al.*, 1998a).

1.2.3.1.1 Sistema de duas fases aquosas

Um dos processos de extração líquido-líquido muito avaliado no processamento de biomassa é o sistema de duas fases aquosas (SDFA). Este foi apresentado pela primeira vez por Albertsson, em 1958, para designar a mistura de dois polímeros utilizada no processo de partição de proteínas. Instantaneamente, este sistema de fases se mostrou promissor em comparação aos solventes orgânicos, pela facilidade do procedimento de extração e por não causar a desnaturação da proteína (ALBERTSSON, 1958; BENAVIDES; RITO-PALOMARES, 2017).

Os SDFA são produzidos quando combinações de componentes hidrofílicos, acima de uma concentração crítica, causam o fenômeno de exclusão, o qual tende a formar as duas fases. Estas fases formadas apresentam características físicas e químicas distintas, o que faz com que a molécula fique mais concentrada na fase de maior afinidade. Este sistema pode ser formado pela combinação de dois polímeros, um polímero e um sal, um álcool e um sal, ou ter como base os LI ou DES, possibilitando a aplicação de uma gama de moléculas diferentes (ABRAHAM; ZISSIMOS; HUDDLESTON, 2003; BENAVIDES; RITO-PALOMARES, 2017). Contrapondo os solventes orgânicos e fluidos supercríticos, os SDFA apresentam

como vantagens a baixa energia consumida, rápida separação, baixo custo e por ser basicamente composto de água, é compatível com uma ampla variedade de biomoléculas (HATTI-KAUL, 2000). No entanto, industrialmente ainda são empregados em casos específicos.

Para se obter o maior rendimento de extração possível para os SDFA é necessário verificar alguns fatores que podem influenciar a partição, como a massa molar do polímero empregado (ALBERTSSON *et al.*, 1987), o pH da solução (FARIAS *et al.*, 2018), o tipo de sal utilizado (TOLEDO *et al.*, 2019) e a temperatura (ZENG; WANG; HUANG, 2014).

Devido à alta sensibilidade, o SDFA se destaca como método de extração líquido-líquido por possuir aplicações, na recuperação de íons metálicos, de corantes alimentares e têxteis, na partição de pequenas moléculas orgânicas, na separação de anticorpos, proteína, antibióticos e bioativos de plantas (ROGERS *et al.*, 1996; HUDDLESTON *et al.*, 1998b; XU; XU; WANG, 2020; ROGERS *et al.*, 1998; ZHANG, J. *et al.*, 2019; ZENG; WANG; HUANG, 2014).

Na extração de compostos bioativos, a demanda por encontrar solventes alternativos para os solventes convencionais orgânicos tem crescido significativamente. O desenvolvimento de processos verdes de separação e extração de produtos naturais é um campo de grande interesse na indústria química. Atentando a estas preocupações, destaca-se neste meio os solventes eutéticos profundos (ZAINAL-ABIDIN; HAYYAN; WONG, 2021; CAO; SU, 2021).

1.2.4 Solventes eutéticos profundos

Para atingir os objetivos de desenvolvimento sustentável, a exploração de solventes verdes tem sido um *hotspot* de pesquisa. Em um trabalho publicado no ano de 2003, Abbott e colaboradores utilizaram pela primeira vez o termo solventes eutéticos profundos, do inglês *deep eutectic solvent* (DES), para designar uma solução formada pela mistura de sais quaternários de amônio e amidas que resultavam em um profundo abaixamento do ponto de fusão, apresentando-se líquida a temperatura ambiente. Este solvente é geralmente formado por 2 ou 3 compostos capazes de associar-se entre si por meio de ligação hidrogênio, formando um complexo com as moléculas doadoras e receptoras de hidrogênio (CAO; SU, 2021; ABBOTT *et al.*, 2003; VANDA *et al.*, 2018).

Desde o seu surgimento, o DES tem sido utilizado intercambiavelmente com o líquido iônico (LI). Alguns autores têm tratado os DES como uma subclasse dos LI por compartilharem muitas características e propriedades físicas. Ambos são considerados biocompatíveis, quimicamente estáveis, biodegradáveis, pouco voláteis, não inflamáveis e suas propriedades físico-químicas são altamente ajustáveis agindo como solventes projetados (*designer solvent*) podendo ser formados para atender uma necessidade particular de interesse. Entretanto, estes são dois tipos diferentes de solventes baseados em estruturas químicas distintas. Enquanto o DES é formado a partir de uma mistura eutética de ácidos e bases de Lewis ou Brønsted, o LI é composto principalmente de um ânion e um cátion (MA *et al.*, 2018; ZAINAL-ABIDIN; HAYYAN; WONG, 2021; SMITH, E.; ABBOTT; RYDER, 2014). Dai e colaboradores (2013) também tentaram estabelecer a diferença entre o DES e o LI, apontando que os LI são sais orgânicos com baixo ponto de fusão, enquanto os DES são misturas de compostos que apresentam ponto de fusão mais baixo que o ponto de fusão de cada composto formador individualmente.

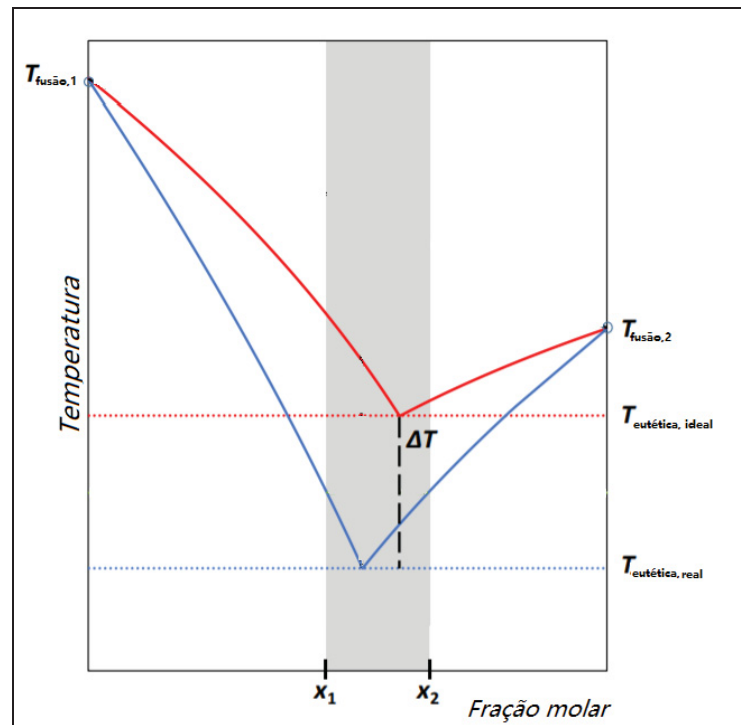
O DES foi proposto como uma alternativa menos tóxica, não inflamável (o que facilita seu armazenamento) e biodegradável, quando comparado aos solventes orgânicos convencionais, além de apresentar baixo custo, comparando-o aos LI. Ademais, uma de suas maiores vantagens é o seu método de preparo, o qual consiste, basicamente, na mistura dos doadores e receptores de hidrogênio aplicando agitação e aquecimento brandos (MARTINS, M.; PINHO; COUTINHO, 2019; ZHANG, Q. *et al.*, 2012; FLORINDO; BRANCO; MARRUCHO, 2019).

Por ser um conceito recentemente estabelecido e que integra esta nova geração de solventes verdes, o DES gera algumas divergências acerca das suas atribuições. Os componentes individuais que formam esse novo solvente são caracterizados, na sua maioria, como não tóxicos ou de baixa toxicidade. Apesar disso, existe pouca informação sobre suas propriedades toxicológicas quando complexados (OVIEDO *et al.* 2021; SMITH, E.; ABBOTT; RYDER, 2014).

Um aspecto fundamental relevante refere-se ao abaixamento da temperatura de fusão no ponto eutético. Essencialmente, todas as misturas de compostos que são completamente ou parcialmente imiscíveis na fase sólida apresentam um ponto eutético. Entretanto, a presença efetiva das ligações de hidrogênio que se formam nos DES deve ser capaz de provocar um desvio negativo com relação à hipótese de

solução ideal (Lei de Raoult). Este comportamento é apresentado na FIGURA 5 (MARTINS, M. A.; PINHO; COUTINHO, 2019).

FIGURA 5 – DIAGRAMA DE FASE DEMONSTRATIVO DE UM SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO



FONTE: Adaptado de Martins, M., Pinho e Coutinho (2019).

As propriedades físico-químicas são os principais aspectos a serem analisados para avaliar o potencial de aplicação de um solvente. Os DES apresentam baixa volatilidade em comparação com os solventes orgânicos convencionais e, de maneira geral, apresentam densidade superior à da água, tendo que o tipo de receptor de ligação de hidrogênio (HBA) ou doador de ligação de hidrogênio (HBD) utilizado e a razão molar influenciam diretamente nesta propriedade. A viscosidade apresenta elevada importância industrial, e considerando os DES com características hidrofílicas, com exceção do DES composto por cloreto de colina e etilenoglicol (ChCl:etilenoglicol), esses solventes apresentam alta viscosidade à temperatura ambiente. Para auxiliar na redução da viscosidade, a elevação da temperatura e a adição de água são alternativas. Entretanto, a adição de água deve ser realizada de forma controlada, pois em quantidade elevada a água é capaz de romper as ligações de hidrogênio que formam os DES (ZHANG, Q. *et al.*, 2012; GARCÍA *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2018).

São poucos os estudos experimentais sobre as propriedades físico-químicas dos DES e estes, muitas vezes, apresentam desacordos entre si. Isto resulta em disparidades no tocante a qual fator realmente influencia suas propriedades e de que forma. No entanto, aplicações encontradas na literatura, mostram o potencial dos DES em várias áreas, como: captura de CO₂, solubilização de drogas, extração de bioativos, purificação do biodiesel, solubilização de lignina, deslignificação da madeira, concentração de pesticidas em amostras, aplicações em catálise e em eletroquímica, dentre outros (GARCÍA *et al.*, 2015; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; FERNÁNDEZ-PRIOR; BERMÚDEZ ORIA, 2020; ABOLGHASEMI; PIRYAEI; IMANI, 2020; MALAEKE *et al.*, 2018).

Os DES mais avaliados até o momento apresentam caráter polar, limitando a sua aplicação. Recentemente, uma nova categoria de DES referida como solventes eutéticos profundos hidrofóbicos, do inglês *hydrophobic deep eutectic solvent* (HDES), surgiu de forma promissora para superar as limitações dos DES hidrofílicos tradicionais e estender os escopos de aplicação (CAO; SU, 2021; ZAINAL-ABIDIN; HAYYAN; WONG, 2021).

1.2.4.1 Os HDES e suas aplicações em processos de extração

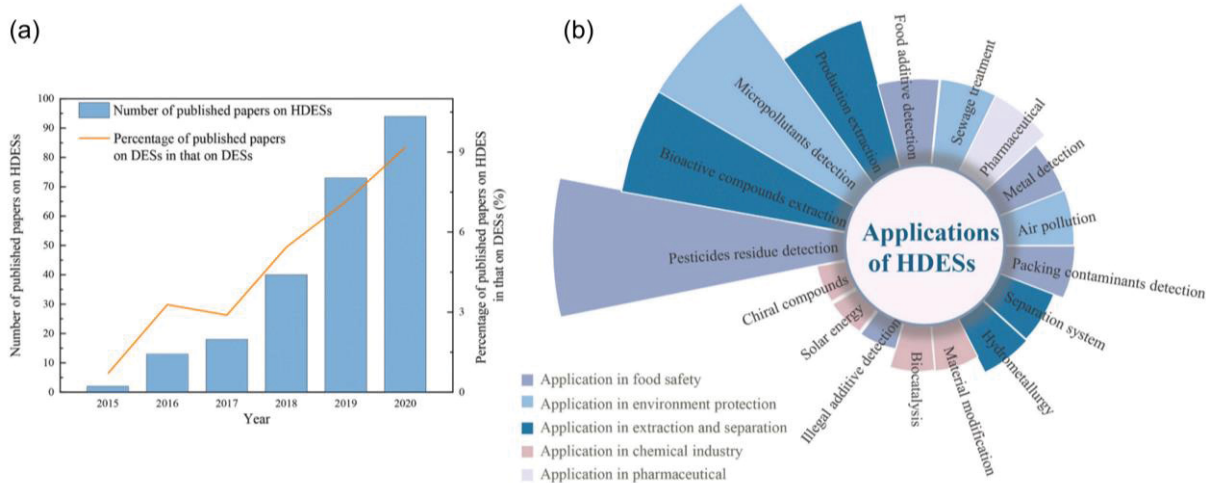
É apresentado em 2015, como uma subclasse dos DES, o primeiro relato na literatura sobre os solventes eutéticos profundos hidrofóbicos. Além de manter as características intrínsecas dos DES, os HDES têm se destacado pela sua estabilidade em meios aquosos, uma vez que apresentam solubilidade em água muito baixa, tornando-os ideias para a separação e extração de analitos apolares presentes em soluções aquosas (OVIDO *et al.*, 2021; RIBEIRO *et al.*, 2015).

Os HDES mais empregados são formados principalmente por um sal quaternário de amônia com um grupo alquila de cadeia longa (ZAINAL-ABIDIN; HAYYAN; WONG, 2021). Em um trabalho realizado por Ribeiro *et al.* (2015) foram introduzidos os primeiros HDES de base neutra sintetizados com DL-mentol e ácidos carboxílicos e timol e ácidos carboxílicos. De forma geral, no HDES o HBA pode ser um composto iônico ou não iônico e o HBD é baseado principalmente em fenóis, gliceróis, álcoois com cadeia alquila longa ou ácidos carboxílicos. Além disso, dependendo do arranjo formado para a síntese do HDES alguns destes compostos

podem agir tanto como HBA, quanto como HBD (FLORINDO; BRANCO; MARRUCHO, 2019, OVIEDO *et al.*, 2021).

Desde 2015, os HDES têm emergido como um meio alternativo para a substituição de solventes orgânicos voláteis na extração de moléculas orgânicas e inorgânicas em meios aquosos devido a sua negligenciável pressão de vapor e elevada eficiência. No entanto, os HDES permanecem abordados na literatura de forma escassa, seus estudos representam menos de 10 % em relação às publicações referentes aos DES hidrofílicos (DWAMENA, 2019; ZAINAL-ABIDIN; HAYYAN; WONG, 2021; CAO; SU, 2021). Isto indica que ainda há muito a se entender em relação aos seus aspectos fundamentais e a se explorar quanto a aplicações. Na FIGURA 6 estão apresentados os números de publicações referentes aos HDES entre os anos de 2015 e 2020 e as principais áreas de aplicação reportadas.

FIGURA 6 – NÚMERO DE PUBLICAÇÕES SOBRE SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS HIDROFÓBICOS ENTRE OS ANOS DE 2015 E 2020.



Notas. (a) O número de publicações sobre HDES e a porcentagem de publicações em relação aos DES hidrofílicos desde 2015. (b) Áreas de aplicação dos HDES.
 FONTE: Cao e Su (2021).

O principal foco dos relatos encontrados na literatura em relação aos HDES está direcionado ao isolamento e extração de ácidos graxos voláteis, metais pesados e compostos bioativos, destacando-se sempre sua imiscibilidade em água o que facilita a separação destes compostos em soluções aquosas (FLORINDO; BRANCO; MARRUCHO, 2019). No entanto, a aplicação dos HDES não se limita ao processo de extração em ambientes aquosos.

Em um trabalho publicado por Cao e colaboradores em 2017, foi estudado uma série de HDES sintetizados de álcoois de cadeia longa e ácidos carboxílicos aplicando diferentes razões molares, com o intuito de demonstrar a habilidade dos HDES na extração de bioativos. Utilizando as folhas de *Ginkgo biloba*, planta empregada na medicina chinesa que se destaca por ser rica em flavonoides e terpenos, os HDES foram empregados na extração sólido-líquido alcançando resultados superiores aos obtidos com os solventes convencionais.

Křížek *et al.* (2018) testou vários HDES a base de mentol e ácidos carboxílicos para a extração de fitocanabinoides. Entre os HDES testados, o sintetizado com mentol e ácido acético se mostrou como um solvente eficiente, bem como, não tóxico e biodegradável, surgindo como uma alternativa de aplicação na indústria farmacêutica.

Silva Y., Ferreira e Jiao (2019) estudou as melhores condições de extração do licopeno presente no bagaço de tomate empregando como solvente os HDES. O melhor rendimento foi encontrado pelo HDES formado por mentol e ácido láctico, superando o valor extraído pelos solventes orgânicos convencionais. O DES formado por mentol e ácido láctico também alcançou resultados superiores expressivos em relação aos solventes convencionais no processo de extração e armazenamento do β -cariofileno presente nas folhas de manuka, árvore florífera nativa da Oceania. Neste estudo foram avaliados 26 tipos de DES e HDES (ALSAUD; SHAHBAZ; FARID, 2021).

Oliveira, G. e colaboradores (2021) empregaram etanol, DES e HDES como solventes na extração de compostos bioativos presentes na raiz, folha e flor do açafraão. Os HDES empregados foram sintetizados com mentol e dois ácidos carboxílicos (ácido acético e láctico). Dentre os solventes utilizados os melhores desempenhos foram obtidos empregando DES e HDES, sendo que os HDES foram ainda superiores. Neste trabalho, os autores também avaliaram a atividade antibacteriana dos HDES, encontrando valores substanciais.

No âmbito da extração líquido-líquido, Florindo, Branco e Marrucho (2017) testaram diferentes HDES a base de mentol e ácidos carboxílicos e sal quaternário de amônia e ácidos carboxílicos para a extração de pesticidas em soluções aquosas. A pesquisa apontou resultados satisfatórios para os HDES formados com mentol e ácido caprílico e mentol e ácido láurico, os quais conseguiram extrair 4 diferentes pesticidas. Em outro trabalho, realizado por Soltani, Sereshti e Nouri

(2021), os autores também estudaram o emprego dos HDES na separação de 16 pesticidas presentes no óleo de oliva por meio da microextração líquido-líquido, apresentando resultados promissores.

Ainda no ramo da química ambiental, Florindo *et al.* (2020) avaliaram em sua pesquisa o uso de HDES para a remoção de Bisfenol-A de ambientes aquosos por extração líquido-líquido. Como resultado, o HDES formado por brometo de tetractilamônio e ácido decanoico foi capaz de remover quase 100 % do poluente da solução aquosa nas condições ótimas de extração.

Ji *et al.* (2021) apresentaram pela primeira vez o uso de HDES formado por cloreto de trioctilmetilamonio e ácido láctico para o monitoramento de traços de cádmio e arsênio em 6 amostras de vinho. A metodologia aplicada foi a de microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom e encontrou-se resultados satisfatórios.

Na extração de compostos bioativos, Cao e colaboradores (2018), analisaram um sistema de duas fases compostos por um HDES e um DES hidrofílico com o intuito de verificar a capacidade de extração simultânea de compostos com diferentes polaridades. Observou-se uma eficiência de extração de 4 fitoquímicos diferentes de aproximadamente 77 %. Aplicando, também, um sistema de duas fases composto por HDES e DES hidrofílico, Li e Row (2020) conseguiram isolar monossacarídeos na fase hidrofóbica e aminoácidos na fase hidrofílica.

Fan e colaboradores (2021), aplicaram a ELL empregando HDES a base de mentol para extrair sete principais compostos bioativos do *Taxus chinese*, planta que apresenta bioativos com potencial aplicação no tratamento do câncer. Os resultados apontaram os HDES a base de mentol como um solvente extrator efetivo e não tóxico, e que tem potencial de extrair fitoquímicos de materiais de plantas no futuro.

Como visto, nos últimos anos os HDES têm sido explorados principalmente como solventes extratores e apresentado resultados satisfatórios. No entanto, dados importantes como o estudo da toxicidade dos solventes eutéticos profundos hidrofóbicos nas células humanas e animais, e dados de equilíbrio que avaliem e garantam a estabilidades dos HDES em meios aquosos, são ainda escassos. Acredita-se que futuramente os DES hidrofóbicos se desenvolvam tornando-se uma opção real de substituição integral dos dispendiosos LI e dos solventes orgânicos

que são hostis ao meio ambiente (OVIEDO *et al.*, 2021; FLORINDO; BRANCO; MARRUCHO, 2019; DWAMENA, 2019).

A crescente necessidade de atender ao meio ambiente, guia o futuro da ciência pela busca incessante por tecnologias verdes, sobretudo no tocante aos processos químicos, como os processos de extração líquido-líquido. Desta forma, o presente trabalho tem a finalidade de contribuir para a comunidade científica empregando os solventes eutéticos profundos hidrofóbicos na extração de bioativos presentes nos extratos dos grãos crus de café arábica. Destaca-se que o café arábica é um produto mundialmente consumido e facilmente disponível no Brasil, além de se destacar na comunidade científica pela elevada capacidade de aplicação de seus bioativos na indústria alimentícia e farmacêutica.

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS E ESCOPO

2.1 OBJETIVOS

Neste tópico serão apresentados os objetivos que conduzem o presente trabalho, divididos em objetivo geral e objetivos específicos.

2.1.1 Objetivo geral

O trabalho tem como objetivo principal a avaliação do processo de extração líquido-líquido empregando solventes eutéticos profundos hidrofóbicos na etapa de separação dos compostos bioativos dos grãos crus do café da espécie *Coffea arabica*.

2.1.2 Objetivos específicos

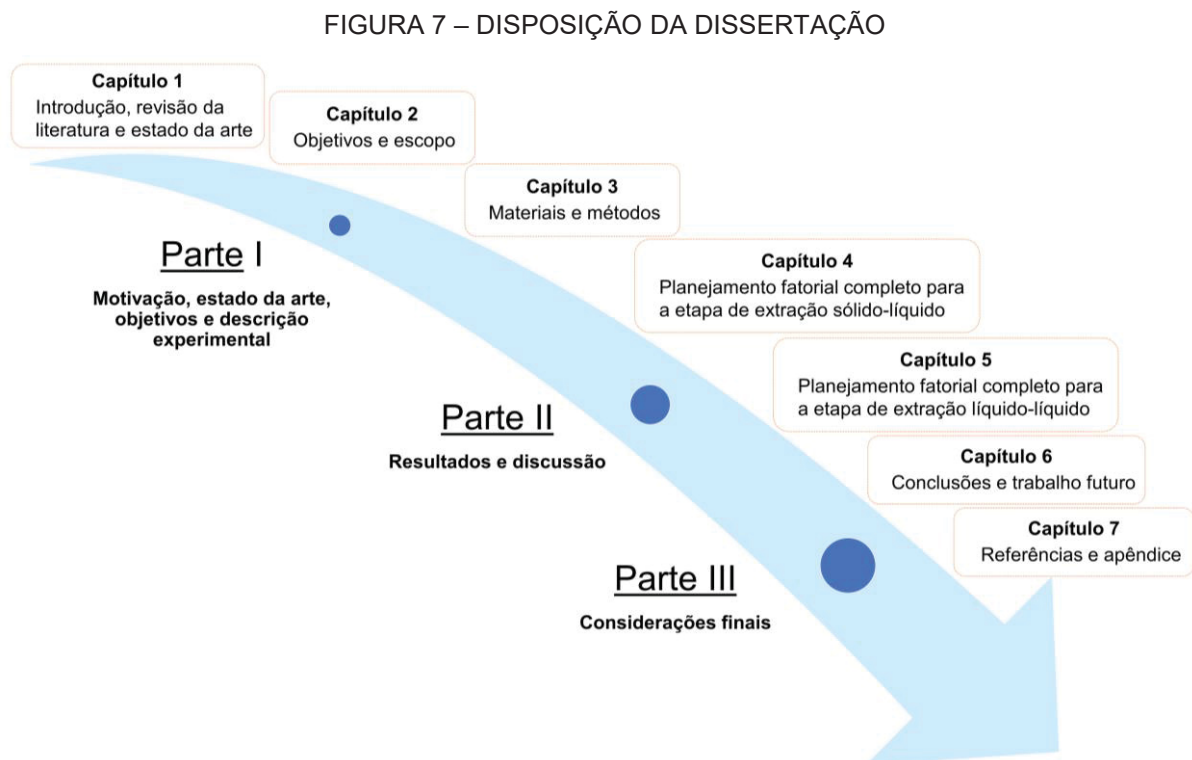
Para atingir o objetivo geral do trabalho, estabeleceu-se os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar via planejamento experimental fatorial misto as condições de extração sólido-líquido, considerando os fatores temperatura, tipo de solvente e razão entre massa da amostra e volume de solvente, de forma a obter os extratos de grãos crus do café da espécie *Coffea arabica* com os maiores teores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante;
- b) Caracterizar o extrato quanto ao teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e o perfil cromatográfico dos principais compostos bioativos;
- c) Selecionar os extratos que apresentaram os melhores resultados quanto aos teores avaliados na etapa anterior a partir do planejamento experimental empregado;
- d) Formar diferentes solventes eutéticos profundos hidrofóbicos utilizando mentol como receptor de ligação de hidrogênio e como doador de ligação de hidrogênio diferentes ácidos carboxílicos para posterior aplicação no processo de extração líquido-líquido;

- e) Aplicar o planejamento de experimento fatorial misto de forma a avaliar as condições do processo de extração líquido-líquido considerando os fatores extrato e solvente extrator, com o intuito de determinar as condições ótimas de extração segundo resultados de teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante;
- f) Caracterizar as fases obtidas a partir da extração líquido-líquido quanto ao teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante.

2.2 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Para que fosse possível cumprir todos os objetivos e com a finalidade de auxiliar no melhor entendimento das etapas a serem cumpridas, segue na FIGURA 7 o fluxograma desta dissertação.



FONTE: A autora (2021).

A Parte I foi dividida em 3 capítulos trazendo os tópicos que introduzem este trabalho. No primeiro capítulo foi apresentada a revisão de literatura dos principais temas abordados na dissertação e o estado da arte com o cenário atual da aplicação

dos solventes eutéticos profundos hidrofóbicos em processos de extração. Em seguida, foram exibidos os objetivos a serem alcançados e, fechando esta primeira parte, no Capítulo 3, será mostrado a descrição dos materiais e metodologias aplicadas.

Na Parte II será apresentado os resultados alcançados durante o período do mestrado e, com o intuito de melhor elucidá-los, esta parte foi dividida em dois capítulos separados a partir do planejamento experimental de cada etapa de extração.

No Capítulo 4 estarão expostos os resultados referentes ao processo de ESL, utilizado para avaliar qual o melhor extrato a ser aplicado na etapa de ELL. Esta avaliação foi realizada considerando os fatores temperatura de extração, razão massa de amostra e volume de solvente e tipo de solvente, onde aplicou-se solventes hidroalcoólicos. Esses fatores foram selecionados segundo experiência prévia do grupo de pesquisa. Seguindo um planejamento experimental os extratos foram analisados com relação ao teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP, realizando o perfil cromatográfico do extrato que obteve os melhores resultados, o qual foi selecionado para a segunda etapa.

Subsequentemente, o Capítulo 5 trará os resultados referentes ao processo de ELL, o qual teve como fatores considerados o tipo de extrato e o solvente extrator. O primeiro foi integrado pelo extrato que apresentou os melhores resultados na etapa de ESL e por um segundo extrato a base de cloreto de colina que apresentou resultados expressivos no trabalho realizado por Ronko (2021). Desta forma, há a possibilidade de avaliar o desempenho do extrato obtido por um solvente convencional e um solvente verde. Quanto ao solvente extrator, aplicou-se quatro DES hidrofóbicos a base de mentol e ácidos carboxílicos (ácido acético, láctico, caprílico e láurico) que foram escolhidos em virtude de experiências prévias do grupo de pesquisa. Com o intuito de comparar o desempenho destes HDES com sistemas de caráter hidrofílico, utilizou-se do SDFa com o sal K_2HPO_4 a partir de dados de equilíbrio apresentados por Toledo *et al.* (2019) e Farias *et al.* (2017) para os extratos a base de solvente hidroalcoólico e a base de cloreto de colina, respectivamente.

Na etapa referente à extração líquido-líquido, o tempo de decantação das fases foi um parâmetro fixado no planejamento de experimento, no entanto, para se

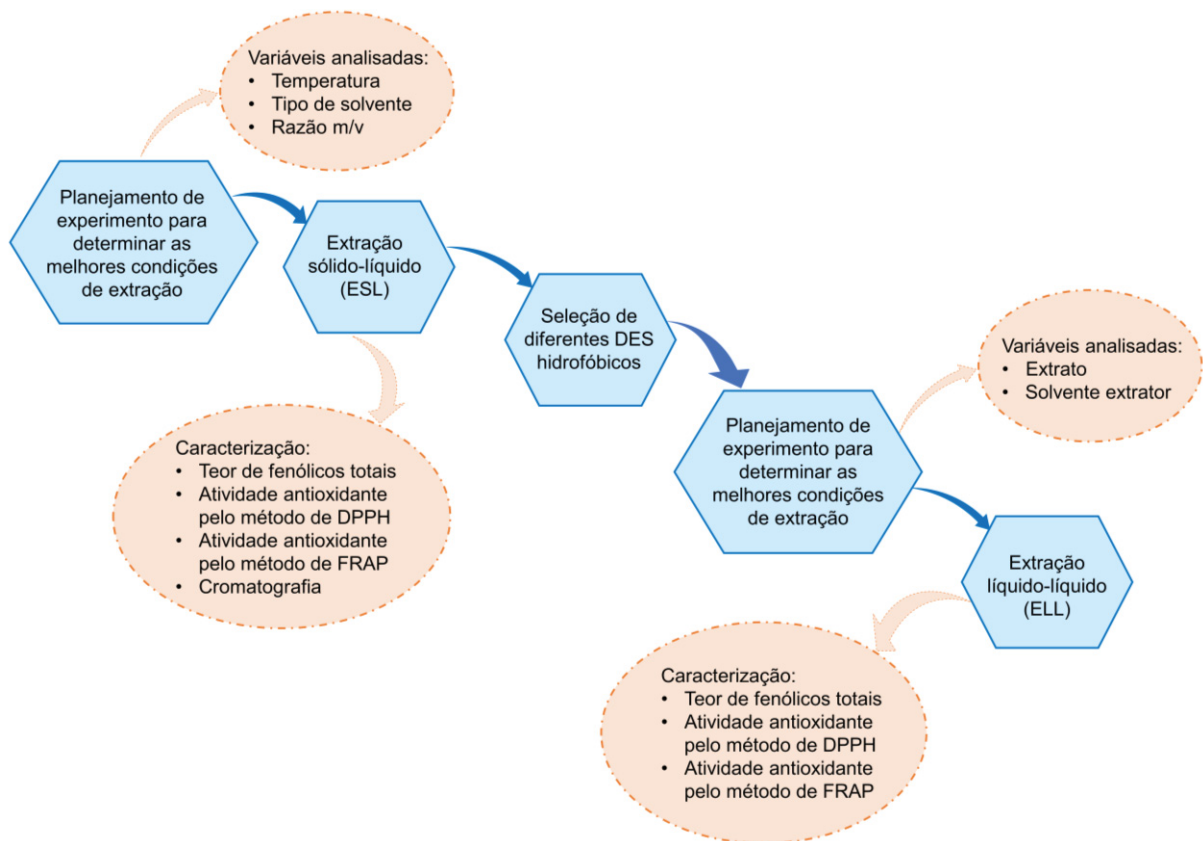
certificar que o sistema alcançou o equilíbrio entre as fases os experimentos foram realizados em dois períodos diferentes. Assim sendo, analisou-se os resultados em dois diferentes tempos de decantação para se certificar se houve ou não diferença significativa quanto ao teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (métodos de DPPH e FRAP) das fases de topo e fundo.

Por fim, na Parte III será apresentado o fechamento do trabalho com as considerações finais (conclusão), bem como sugestões para trabalhos futuros e a apresentação das referências utilizadas.

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os produtos químicos e metodologias aplicadas para o desenvolvimento deste trabalho. O projeto foi realizado nos Laboratórios de Termodinâmica e Operações de Separação (LATOS) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e em parceria com o laboratório de cromatografia da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA). A FIGURA 8 traz um fluxograma com as etapas experimentais realizadas.

FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS REALIZADAS NO PRESENTE TRABALHO



FONTE: A autora (2021).

3.1 PREPARO DA AMOSTRA DOS GRÃOS CRUS DE CAFÉ ARÁBICA

Para o desenvolvimento do projeto optou-se por trabalhar com os grãos crus de café da espécie *Coffea arabica* para que fosse possível aproveitar em seu máximo os compostos bioativos presentes na matriz, posto que durante o

processamento do café parte de seus compostos bioativos sofrem degradação na etapa de torrefação (MOREIRA; TRUGO; BASTOS DE MARIA, 2000). Os grãos utilizados foram cedidos pela empresa Café do Mercado, situada no município de Curitiba, Paraná, Brasil.

No preparo da amostra os grãos crus de café foram submetidos ao processo de secagem em estufa com circulação de ar (Fabbe) na temperatura de 40 °C pelo período de 24 horas. Após este processo, os grãos secos foram imersos em nitrogênio líquido, para facilitar a etapa de moagem, e então, moídos em um liquidificador industrial e tamisados em peneiras de 20 Mesh. Em seguida, foram armazenados em saco zip aluminizado, a temperatura ambiente e isento de luz e umidade com o intuito de preservar as propriedades do café para aplicação nas etapas subsequentes.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA A ETAPA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

No âmbito da pesquisa científica a análise de dados juntamente com a atividade experimental são ações primordiais para a compreensão dos resultados alcançados. Por consequência, o uso de planejamentos experimentais destaca-se por ser uma estratégia de suma importância e podem ser de dois tipos. O planejamento de experimento do tipo *screening* é empregado quando o principal objetivo é investigar vários fatores simultaneamente para posteriormente afunilar a investigação naqueles que se mostrarem mais relevante. Já o planejamento de experimento de modelagem é utilizado para alcançar a resposta desejada com a melhor parametrização dos fatores (MONTGOMERY, 1991; ZEVIANI e MAYER, 2019; SILVA C e SANT'ANNA, 2007).

O delineamento escolhido para o presente trabalho foi o planejamento fatorial misto (planejamento de modelagem), o qual fundamenta-se em realizar experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis e fatores, consistindo este no número mínimo de experimentos, tendo o analista a possibilidade de realizar replicatas, para assim, estimar o erro experimental (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; MARINHO e CASTRO, 2005). Ademais, com os resultados pode-se calcular os principais efeitos e as interações entre as variáveis independentes, bem como determinar quais efeitos são significativos (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Para o estudo, o planejamento fatorial misto foi aplicado com o intuito de determinar as melhores condições de extração para, conseqüentemente, obter o melhor extrato, ou seja, o extrato com os maiores teores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP. Seguindo conhecimento prévio do grupo de pesquisa, nele foram avaliadas três variáveis, sendo essas: temperatura, razão entre a massa de amostra e o volume de solvente e tipo de solvente. Estas variáveis foram estudadas em dois níveis para os fatores de temperatura e razão m/v, variáveis quantitativas, e em três níveis para o fator tipo de solvente, variável qualitativa, ($2^2 \times 3^1$) conforme está apresentado na TABELA 2.

TABELA 2 – NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A ESL

Solvente	Temperatura (°C)	Razão massa/volume
Água (-1)	25 (-1)	1:20 (-1)
Etanol 50 % (0)	40 (1)	1:50 (1)
Etanol 100 % (1)		

Os experimentos foram efetuados de forma aleatória para evitar erros sistemáticos e a resposta monitorada foi quanto ao teor de CFT e AA pelos métodos de DPPH e FRAP. O planejamento completo com as duplicatas realizadas em cada ponto está descrito na TABELA 3.

TABELA 3 – PLANEJAMENTO FATORIAL MISTO PARA A ETAPA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

(continua)

Ensaio	Variáveis explanatórias					
	Solvente (%etanol, v/v)		Temperatura (°C)		Razão massa/volume	
	Valor Real	Valor Codificado	Valor Real	Valor Codificado	Valor Real	Valor Codificado
1	50	0	40	1	1:50	1
2	100	1	40	1	1:20	-1
3	0	-1	40	1	1:50	1
4	100	1	25	-1	1:50	1
5	50	0	25	-1	1:50	1
6	50	0	25	-1	1:50	1
7	50	0	40	1	1:20	-1
8	50	0	40	1	1:20	-1
9	0	-1	25	-1	1:50	1
10	50	0	25	-1	1:20	-1
11	0	-1	25	-1	1:20	-1
12	100	1	40	1	1:50	1
13	50	0	40	1	1:50	1
14	100	1	40	1	1:20	-1
15	0	-1	40	1	1:50	1

TABELA 3 – PLANEJAMENTO FATORIAL MISTO PARA A ETAPA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

							(conclusão)
16	0	-1	25	-1	1:50	1	
17	0	-1	40	1	1:20	-1	
18	0	-1	40	1	1:20	-1	
19	100	1	25	-1	1:20	-1	
20	50	0	25	-1	1:20	-1	
21	100	1	25	-1	1:50	1	
22	0	-1	25	-1	1:20	-1	
23	100	1	25	-1	1:20	-1	
24	100	1	40	1	1:50	1	

Para averiguar o efeito dos parâmetros na extração, foi realizada uma regressão linear e análise de efeitos com o objetivo de definir as condições ótimas de extração dos compostos bioativos presentes nos grãos crus de café. 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 (EQUIPE ESTATCAMP, 2014).

A EQUAÇÃO 1 descreve o modelo de ajustes para o planejamento.

$$\begin{aligned} \mu_{ijk} = & \mu + \alpha_1 \cdot s + \alpha_2 \cdot s^2 + \beta_1 \cdot t + \gamma_1 \cdot r + \theta_{11} \cdot s \cdot t + \theta_{21} \cdot s^2 \cdot t + \tau_{11} \cdot s \cdot r + \tau_{21} \cdot s^2 \cdot r \\ & + \varphi_{11} \cdot t \cdot r + \lambda_{111} \cdot s \cdot t \cdot r + \lambda_{211} \cdot s^2 \cdot t \cdot r \end{aligned} \quad (1)$$

Sendo: μ_{ijk} = valor observado para o ponto experimental de tipo de solvente i, temperatura j e razão m/v k, μ = constante inerente à todas as observações, α_1 e α_2 = parâmetros para acomodar o efeito do tipo de solvente, s, t e r = níveis codificados dos solvente, temperatura e razão m/v, β_1 = parâmetro para acomodar o efeito da temperatura, γ_1 = parâmetro para acomodar o efeito da razão m/v, θ_{11} e θ_{21} = parâmetros para acomodar o efeito de interação entre o solvente e a temperatura, τ_{11} e τ_{21} = parâmetros para acomodar o efeito de interação entre solvente e razão m/v, φ_{11} = parâmetros para acomodar o efeito de interação entre temperatura e razão m/v, λ_{111} e λ_{211} = parâmetros para acomodar o efeito de interação entre o solvente, temperatura e razão m/v.

3.3 PROCESSO DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

O processo de extração dos compostos bioativos dos grãos crus de café arábica foi realizado em células de equilíbrio, com agitação constante, promovida por um agitador magnético, e utilizou-se um banho termostático (Lab Companion modelo RW 1025G) para controle de temperatura, como exposto na FIGURA 9.

FIGURA 9 – APARATO EXPERIMENTAL PARA A EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO UTILIZANDO AGITAÇÃO MAGNÉTICA



(1) Célula de equilíbrio; (2) Agitador magnético; (3) Mangueiras de látex; (4) Banho termostático; (5) Indicador e controle de temperatura.

FONTE: A autora (2021).

As extrações procederam pelo período de 1 hora nas temperaturas de 25 e 40 °C. Em cada célula adicionou-se 10 mL de solvente e 0,2 e 0,5 g do café moído, para as razões 1:50 e 1:20 (m/v), respectivamente. As operações seguiram conforme descrito no planejamento de experimento (TABELA 3).

Finalizada a etapa de extração, as amostras foram transferidas para microtubos de centrifugação do tipo eppendorf e colocadas em centrífuga (Thermo Electron Led GMBH modelo Pico Fresco 21) a 2000 rpm durante 15 minutos, com o

intuito de separar as partículas sólidas ainda restantes da fase líquida (extrato). Os extratos foram, então, armazenados sob refrigeração e no abrigo de luz para as análises de caracterização.

Na etapa de extração líquido-líquido foi incluído, a fim de comparação devido a resultados promissores, um extrato a base de cloreto de colina seguindo a metodologia descrita por Ronko (2021). O solvente extrator ChCl 50 % foi preparado na proporção 50:50 (m/m), cloreto de colina:água.

Assim como na extração com agitação magnética, utilizou-se células de equilíbrio e banho termostático (Lab Companion modelo RW 1025G) para o controle de temperatura. Adicionou-se nas células o café moído e o ChCl 50 % na proporção 1:20 (m/m) empregando o ultra-turrax (IKA T25, Alemanha) na rotação de 13000 rpm para promover a agitação. Aplicou-se a temperatura de 65 °C e o tempo de extração de 7,5 minutos. O aparato experimental está apresentado na FIGURA 10.

FIGURA 10 – APARATO EXPERIMENTAL PARA A EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO UTILIZANDO ULTRA-TURRAX



(1) Dispensador ultra-turrax; (2) Célula de equilíbrio; (3) Mangueiras de látex conectadas ao banho termostático.

FONTE: A autora (2021).

Após o período de extração, utilizou-se a mesma metodologia de centrifugação para separar partículas sólidas ainda presentes no extrato. Este foi, então, armazenado no abrigo de luz sob refrigeração para aplicação na etapa de ELL.

3.4 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS

Para analisar a composição dos extratos obtidos pela ESL, aplicou-se metodologias para a determinação do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Avaliando os extratos, para aquele que apresentou os melhores resultados também foi quantificado o teor de cafeína, ácido clorogênico e trigonelina.

3.4.1 Determinação dos compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

A metodologia empregada na determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) foi proposta por Singleton e Rossi (1965) e modificada por Bakirtzi, Triantafyllidou e Makris (2016), com adaptações, na qual utiliza-se o reagente Folin-Ciocalteu e, como padrão, o ácido gálico.

Em um tubo do tipo eppendorf adicionou-se uma alíquota de 1,68 mL de água osmolisada, 0,02 mL de cada amostra do extrato diluída e 0,1 mL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído 1:4, v/v). Após deixar a solução em repouso por 3 minutos, 0,2 mL de carbonato de sódio 20 % foi adicionado e os tubos submetidos a agitação em vórtex (Gomixer, MX-S). Em seguida, as amostras foram mantidas em repouso no abrigo de luz por 60 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-vis (Shimadzu UV-1700) no comprimento de onda de 760 nm. Uma amostra do branco foi conduzida nas mesmas condições, adicionando-se água osmolisada ao invés de extrato, e a concentração de fenóis totais foi calculada a partir da construção de uma curva de calibração utilizando o ácido gálico como padrão. Esta curva foi nas concentrações de ácido gálico 0,85; 0,70; 0,55; 0,40; 0,25; 0,10 mg mL⁻¹, realizadas em triplicata (APÊNDICE 1). Assim sendo, expressou-se os resultados do teor de compostos fenólicos totais em mg de equivalente ácido gálico (EAG) por g de amostra (mg_{EAG} g⁻¹).

3.4.2 Análise da atividade antioxidante

Devido à complexidade natural dos fitoquímicos presentes em produtos naturais, a avaliação da atividade antioxidante é dificultada. Com o intuito de contornar a dificuldade na determinação dos antioxidantes, diversas metodologias e modificações foram sendo incorporadas. Entretanto, todas têm a sua limitação por se tratar de uma análise de compostos que possuem diferentes origens. Por isto é sugerido que para avaliar os diferentes mecanismos de ação dos antioxidantes presentes em uma matriz alimentar, mais de um teste deve ser realizado (LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI; ALASALVAR, 2006; SHAHIDI; ZHONG, 2015; MISHRA *et al.*, 2012; CHEONG *et al.*, 2013).

Dentre os métodos existentes dois foram selecionados para este trabalho, são eles: DPPH e FRAP. Sabe-se que estas são análises que envolvem diferentes mecanismos, o método DPPH possui um mecanismo de atividade antioxidante de transferência de elétron e hidrogênio e o método FRAP envolve o mecanismo de transferência de elétron (SANTOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2019).

3.4.2.1 DPPH

Este método avalia a atividade antioxidante reagindo o extrato com o radical estável DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazil) em uma solução etanólica monitorando sua redução por leitura da absorbância em espectrofotômetro (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

A metodologia aplicada foi proposta por BRAND-WILLIAMS, CURVELIER e BERSET (1995), com modificações. Previamente preparou-se uma solução etanólica de DPPH adicionando 3,95 mg do reagente, 50 mL de álcool etílico absoluto e 50 mL de tampão fosfato monobásico (50 mM, pH 6,0). Em seguida, adicionou-se em tubos de ensaio 1,95 mL da solução de DPPH e 50 µL da amostra de extrato diluída. Os tubos foram agitados no vórtex (Gomixer, MX-S) e mantidos no abrigo de luz por 30 minutos. Passado este período, realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-vis (Shimadzu UV-1700) no comprimento de onda de 517 nm. Uma amostra do branco foi conduzida nas mesmas condições e a atividade antioxidante foi determinada a partir da construção de uma curva de calibração utilizando a solução padrão de Trolox. A curva foi construída com as concentrações

de Trolox realizadas em triplicata, sendo elas: 350; 300; 250; 200; 150; 100; 50; 10 mg L⁻¹ (APÊNDICE 1). Os resultados foram expressos em mg de equivalente ao Trolox (ET) por g de amostra (mg_{ET} g⁻¹).

3.4.2.2 FRAP

O método FRAP mede o poder de redução do íon ferro (FRAP), quando o reagente Fe^{III} – TPTZ (complexo férrico-tripiridiltriazina) é reduzido a Fe^{II}, em condições de baixo pH. A formação da cor azul na amostra indica a presença de antioxidantes (BENZIE; STRAIN, 1996).

As determinações da atividade antioxidante pelo método FRAP foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Benzie e Strain (1996), com modificações. Previamente preparou-se a solução FRAP adicionando 0,0312 g de TPTZ, 10 mL de tampão acetato de sódio (pH 3,6) e 10 mL de cloreto férrico (20 mM), esta mistura foi homogeneizada na temperatura de 37 °C. Após este procedimento, um volume de 45 µL das amostras diluídas foi adicionado em tubos de ensaio e homogeneizado em vórtex (Gomixer, MX-S) com 135 µL de água e 1,35 mL da solução FRAP. Esta mistura foi mantida em repouso por 30 minutos no abrigo de luz e fez-se a leitura da absorbância em 595 nm. Para a obtenção da atividade antioxidante construiu-se uma curva de calibração com concentrações conhecidas da solução padrão de Trolox realizadas em triplicata, sendo elas: 150; 125; 100; 75; 50; 25; 5 mg L⁻¹ (APÊNDICE 1). Deste modo os resultados foram expressos em mg de equivalente de Trolox por grama de amostra (mg_{ET} g⁻¹).

3.4.3 Análise do perfil de composição dos extratos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência

Várias são as metodologias desenvolvidas para a determinação de biocompostos nas matrizes *in natura* ou em produtos processados. Para a quantificação dos componentes do café, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em inglês *high performance liquid chromatography* (HPLC), é o método mais aplicado (WELDEGEBREAL; REDI-ABSHIRO; CHANDRAVANSI, 2017). Desta forma, optou-se por empregar este método para quantificar a cafeína, trigonelina e os ácidos clorogênicos presentes nos extratos dos grãos de café cru.

Primeiramente as amostras foram preparadas diluindo-as com água Milli-Q na proporção volumétrica 1:10 e filtrando-as com filtro para seringa 0,22 µm. Avaliou-se a presença de cafeína, trigonelina e os ácidos clorogênicos nos extratos dos grãos crus de café arábica utilizando um sistema de CLAE com gradiente de fase reversa. O equipamento de Cromatografia Líquida de Ultra-alta Eficiência (*Ultra-high performance liquid chromatography*, UHPLC) é equipado com um sistema de bomba de dois pistões, um desgaseificador, um injetor de amostra automático e um detector de *Diode Array* (DAD – Thermo Scientific, Alemanha, modelo Dionex UltiMate 3000). Para a quantificação da cafeína, trigonelina e dos isômeros do ácido clorogênico, foi injetado 100 µL de amostra na coluna Ace 5 C18 (octadecilsilano) (250 mm x 4,6 mm i.d.; 2,6 µm), mantendo-a a 25 °C.

Para a determinação da cafeína e trigonelina por CLAE, foi empregada a metodologia proposta por Toci, Farah e Trugo (2006), com adaptações. A fase móvel aplicada na análise foi constituída de metanol e água com a vazão de 1,0 mL min⁻¹. A eluição foi iniciada a 5 % de metanol e mantida por 3 minutos, a porcentagem de metanol foi então elevada para 15 %, 25 %, 35 % e 40 %, sendo todas mantidas durante 3 minutos. A detecção da cafeína e trigonelina foi realizada por absorção nos comprimentos de onda de 272 nm e 265 nm, respectivamente.

Os ácidos clorogênicos foram detectados por absorção no comprimento de onda de 360 nm. A fase móvel empregada foi constituída da solução tampão de citrato trissódico (0,01 M e pH de 2,5) e metanol, com a vazão de 1,0 mL min⁻¹. O gradiente de eluição foi iniciado em 100 % da solução de citrato por 19 min, seguindo por 80 % durante 10 min, 60 % por 10 min e 100 % da solução por 25 min. A quantificação dos ácidos clorogênicos foi realizada por meio da comparação da área do pico dos isômeros de interesse com a curva de calibração do padrão externo ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ). É possível quantificar cada isômero individualmente por meio de seus coeficientes de extinção molar (ϵ), obtidos na literatura, de acordo com a EQUAÇÃO 2 descrita por Trugo e Macrae (1984). Neste trabalho foram quantificados três isômeros cafeoilquínicos nas posições 3, 4 e 5, três isômeros dicafeoilquínicos nas posições 3,4-, 3,5- e 4,5 e um isômero feruloilquínico.

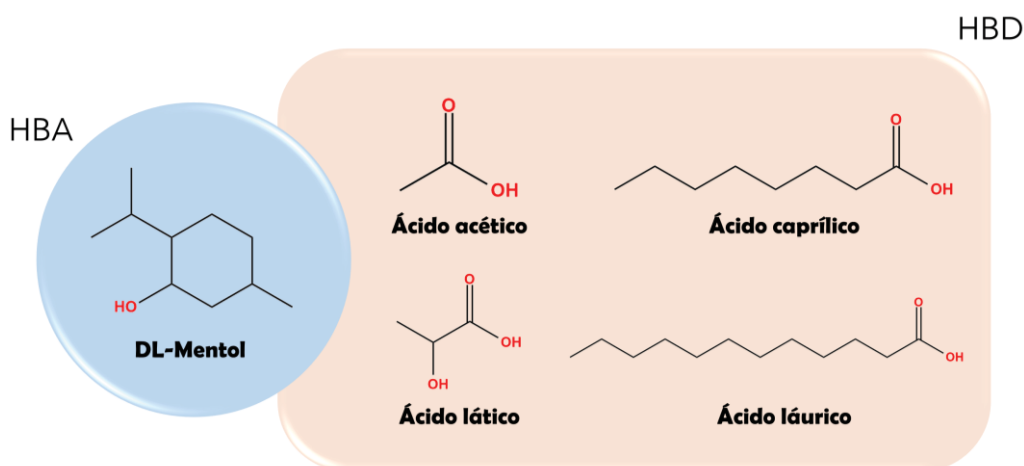
$$C = \frac{FR \times \epsilon_1 \times M_{r_2} \times A}{\epsilon_2 \times M_{r_1}} \quad (2)$$

Sendo: FR = fator de resposta estabelecido para o 5-ACQ, ϵ_1 = absorvidade molar do 5-ACQ (1,95), ϵ_2 = absorvidade molar do isômero alvo, M_{r1} = massa molecular relativa do 5-ACQ (354,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$), M_{r2} = massa molecular relativa do isômero alvo e A = área do isômero alvo.

3.5 SÍNTESE DOS SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS HIDROFÓBICOS

No preparo dos solventes eutéticos profundos hidrofóbicos, utilizou-se os seguintes reagentes: mentol ($\geq 95\%$), ácido acético (99,8%), ácido láctico (85 - 90%), ácido caprílico ($> 98\%$) e ácido láurico ($\geq 98\%$), obtidos da Sigma-Aldrich. O teor de água nos reagentes foi avaliado por Karl-Fischer e foram empregados conforme disponibilizados pelo fabricante (sem tratamento). Na FIGURA 11 estão as estruturas químicas dos reagentes e suas respectivas funções como receptor (HBA) ou doador (HBD) de ligação de hidrogênio na formação dos HDES.

FIGURA 11 – ESTRUTURA QUÍMICA E FUNÇÃO DOS REAGENTES NOS DES HIDROFÓBICOS



FONTE: A autora (2021).

Para a síntese dos HDES utilizou-se a metodologia do aquecimento brando com agitação, descrita por Dai *et al.* (2013). Pesou-se em balança analítica quantidades conhecidas de cada um dos componentes respeitando suas respectivas proporções molares (TABELA 4). A mistura foi mantida sob aquecimento na temperatura de, pelo menos, 50 °C e agitação constante durante 15 a 30 minutos até a formação de um líquido transparente e homogêneo.

TABELA 4 – PROPORÇÃO MOLAR E REFERÊNCIAS UTILIZADAS PARA A PREPARAÇÃO DOS DES HIDROFÓBICOS

HBA	HBD	Razão molar (HBA/HBD)	Siglas	Referência
Mentol	Ácido acético	1:1	MAA	Florindo, Branco e Marrucho (2017)
	Ácido láctico	1:2	MLAT	Ribeiro <i>et al.</i> (2015)
	Ácido caprílico	2:1	MCAP	Ge, Zhang e Yang (2017)
	Ácido láurico	2:1	MLAU	Florindo, Branco e Marrucho (2017)

Após o preparo, os DES foram armazenados em frascos fechados na estufa a 35°C para posterior uso na etapa de extração líquido-líquido.

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA A ETAPA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Nesta etapa do trabalho, optou-se por aplicar um planejamento fatorial misto para avaliar a separação dos compostos bioativos do extrato dos grãos crus de café arábica entre as fases na ELL. Neste planejamento considerou-se dois fatores qualitativos a serem estudados: o tipo de extrato e o solvente extrator, os quais foram escolhidos segundo experiência do analista. O fator tipo de extrato foi analisado em dois níveis, considerando o extrato que apresentou o melhor resultado na etapa de ESL e um segundo extrato obtido com uma solução aquosa de cloreto de colina, e o fator solvente extrator foi composto por 5 níveis, quatro HDES e um sistema de duas fases aquosas formado por extrato, água e o sal fosfato de potássio dibásico, ($2^1 \times 5^1$) em conformidade com o apresentado na TABELA 5.

TABELA 5 – NÍVEIS REAIS E CODIFICADOS DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA A ELL

Extrato	Solvente extrator
ChCl 50 % (-1)	Mentol:Ácido acético (-2)
Etanol 50 % (1)	Mentol:Ácido láctico (-1)
	Mentol:Ácido caprílico (0)
	Mentol:Ácido láurico (1)
	SDFA (2)

O planejamento foi gerado utilizando o sistema estatístico Action Stat (EQUIPE ESTATCAMP, 2014). Para evitar erros sistemáticos os experimentos foram realizados de forma aleatória e monitorou-se a resposta quanto ao teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante aplicando os métodos DPPH e FRAP. Com o intuito de calcular o erro, realizou-se duplicatas em cada ponto do planejamento conforme está apresentado na TABELA 6.

TABELA 6 – PLANEJAMENTO FATORIAL MISTO PARA A ETAPA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Ensaio	Variáveis explanatórias			
	Extrato (%etanol v/v e %ChCl m/m)		Solvente Extrator	
	Valor real	Valor codificado	Valor real	Valor codificado
1	Et 50 %	1	Mentol:Ác. Láutico	-1
2	Et 50 %	1	SDFA	2
3	Et 50 %	1	Mentol:Ác. Láutico	-1
4	Et 50 %	1	Mentol:Ác. Caprílico	0
5	ChCl 50 %	-1	SDFA	2
6	ChCl 50 %	-1	Mentol:Ác. Láutico	-1
7	Et 50 %	1	Mentol:Ác. Láurico	1
8	Et 50 %	1	Mentol:Ác. Láurico	1
9	ChCl 50 %	-1	Mentol:Ác. Láutico	-1
10	ChCl 50 %	-1	Mentol:Ác. Láurico	1
11	ChCl 50 %	-1	Mentol:Ác. Láurico	1
12	ChCl 50 %	-1	SDFA	2
13	Et 50 %	1	Mentol:Ác. Acético	-2
14	Et 50 %	1	Mentol:Ác. Caprílico	0
15	ChCl 50 %	-1	Mentol:Ác. Acético	-2
16	Et 50 %	1	Mentol:Ác. Acético	-2
17	ChCl 50 %	-1	Mentol:Ác. Caprílico	0
18	ChCl 50 %	-1	Mentol:Ác. Acético	-2
19	ChCl 50 %	-1	Mentol:Ác. Caprílico	0
20	Et 50 %	1	SDFA	2

A análise estatística foi realizada aplicando-se aos resultados obtidos uma regressão linear e analisando o Gráfico de Superfície. Por meio desta regressão linear, fez-se a análise de variância (ANOVA) com um p valor < 0,05. Avaliou-se o modelo com base no teste F (Fisher-Snedecor) e para a comparação das médias aplicou-se o Teste de Tukey ao nível de 5 % de significância. Assim como o planejamento experimental, a análise estatística foi executada com o auxílio do sistema estatístico Action Stat e o Gráfico de Superfície com o *software* Statistica V10.

A equação que descreve o modelo de ajustes para este planejamento está apresentada abaixo:

$$\mu_{lm} = \mu + \delta_1 \cdot e + \varepsilon_1 \cdot se + \varepsilon_2 \cdot se^2 + \varepsilon_3 \cdot se^3 + \varepsilon_4 \cdot se^4 + \sigma_{11} \cdot e \cdot se + \sigma_{12} \cdot e \cdot se^2 + \sigma_{13} \cdot e \cdot se^3 + \sigma_{14} \cdot e \cdot se^4 \quad (3)$$

Sendo: μ_{lm} = valor observado para o ponto experimental de tipo de extrato l e solvente extrator m, μ = constante inerente à todas as observações, δ_1 = parâmetro para acomodar o efeito do tipo de extrato, e e se = níveis codificados do extrato e solvente extrator, ε_1 , ε_2 , ε_3 e ε_4 = parâmetro para acomodar o efeito solvente extrator

e σ_{11} , σ_{12} , σ_{13} e σ_{14} = parâmetros para acomodar o efeito de interação entre o extrato e solvente extrator.

3.7 PROCESSO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Para realizar o processo de extração líquido-líquido, empregou-se como solventes extratores os solventes eutéticos profundos hidrofóbicos. Além disso, com o intuito de investigar e comparar o comportamento dos extratos em soluções hidrofílicas, utilizou-se a metodologia do sistema de duas fases aquosas empregando sistemas previamente conhecidos.

Realizou-se a ELL em tubos de ensaio, seguindo a proporção volumétrica 50:50 (v/v). Com o DES hidrofóbico como solvente extrator, pôs-se em contato 5 mL da solução de extrato e 5 mL do DES hidrofóbico. Para o SDFA, gerou-se o SDFA composto por extrato + K_2HPO_4 + água de forma que a proporção volumétrica entre as fases também fosse 50:50 (v/v). Os tubos foram agitados por 1 minuto no agitador vórtex (Gomixer, MX-S) em condições ambiente de temperatura e pressão. Em seguida, as amostras foram mantidas em repouso na temperatura de 25 °C, controlada pelo banho termostático (Lab Companion modelo RW 1025G), durante 24 e 96 horas de forma a garantir que o equilíbrio entre as fases fosse atingido.

Logo após o período de decantação das fases, com o auxílio de uma pipeta Pasteur de vidro, coletou-se amostras de ambas as fases para análises posteriores, armazenando-as sob refrigeração no abrigo de luz.

3.7.1 Preparo do sistema de duas fases aquosas

Os SDFA aplicados neste trabalho para avaliar a partição das biomoléculas do extrato dos grãos crus de café em comparação com o seu desempenho em um sistema hidrofóbico, seguiu o proposto por Farias *et al.* (2017) e Toledo *et al.* (2019), os quais são formados por cloreto de colina (ChCl), fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4) e água; e etanol, K_2HPO_4 e água, respectivamente. Optou-se por empregar estes sistemas devido a sua baixa viscosidade e biocompatibilidade com o extrato estudado.

Para a sua aplicação buscou-se a composição global em uma linha de amarração onde ambas as fases apresentassem uma proporção próxima a 50:50

(v/v). Desta forma, foi adicionado gravimetricamente ao tubo de ensaio, para o extrato formado com ChCl 50 %, 3,84 g do extrato, 3,5 g de sal e 2,29 g de água; e, para o extrato formado com etanol 50 %, 2,64 g do extrato, 2,5 g de sal e 3,09 g de água. As misturas foram agitadas e mantidas sob repouso para a separação das fases seguindo a metodologia descrita anteriormente na seção 3.7.

3.8 AVALIAÇÃO DAS FASES DE TOPO E FUNDO

As fases obtidas pela ELL foram analisadas de acordo com o teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP, assim como realizado na etapa de ESL.

Para as análises foi necessário diluir as amostras de cada fase, sendo assim, as fases hidrofílicas foram diluídas utilizando água destilada e para as fases hidrofóbicas utilizou-se o álcool etílico absoluto. Com o objetivo de averiguar se os diferentes solventes aplicados interfeririam na leitura espectrofotométrica, fez-se um estudo do efeito matriz que está descrito no APÊNDICE 1.

PARTE II

Resultados e Discussão

Nesta parte serão apresentados todos os resultados obtidos nesta dissertação. Conforme previamente descrito no Capítulo 2, os resultados foram divididos em 2 capítulos.

CAPÍTULO 4 - PLANEJAMENTO FATORIAL MISTO PARA A ETAPA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

A avaliação dos compostos bioativos presentes nos extratos dos grãos crus de café foi realizada através da determinação do teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP. Para isso, fez-se necessário a construção de curvas de calibração para ambos os métodos, estando estas dispostas no APÊNDICE 1. Para o extrato que apresentou os melhores resultados, também foi quantificado via UHPLC os compostos bioativos cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos.

4.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

Com o intuito de determinar a influência de algumas variáveis (fatores) no processo de extração sólido-líquido, utilizou-se o planejamento experimental como uma ferramenta para estudar o efeito conjunto dos fatores sobre a variável resposta de interesse (teor de compostos fenólicos totais, DPPH e FRAP).

Uma das principais análises realizadas para verificar a significância dos efeitos das variáveis independentes sobre as respostas é a análise de variância (ANOVA). Esta análise constitui uma extensão do teste t de Student, o qual compara apenas duas médias (PADOVANI, 2014). Segundo Neto, Scarminio e Bruns (2001), para que um modelo tenha boa significância ele deve apresentar um p-valor $< 0,05$, por conseguinte, considerou-se este valor de significância no presente trabalho.

Para a etapa de extração sólido-líquido os parâmetros tipo de solvente, temperatura e razão m/v foram escolhidos de acordo com experiência prévia do grupo de pesquisa.

4.1.1 Teor de compostos fenólicos totais

Os resultados da análise do teor de compostos fenólicos totais obtido em cada ensaio do planejamento fatorial foi descrito por meio da equação dada pela curva de calibração do ácido gálico (FIGURA 21, APÊNDICE 1) e está apresentado na TABELA 7.

TABELA 7 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS DE CAFÉ ARÁBICA

Amostra	Variáveis explanatórias			CFT (mg _{EAG} g ⁻¹)
	Solvente	Temperatura (°C)	Razão m/v	
1	Água	25	1:20	41,57 ^a ± 7,46
2	Etanol 50%	25	1:20	32,24 ^b ± 3,56
3	Etanol 100%	25	1:20	1,98 ^e ± 0,90
4	Água	25	1:50	23,40 ^c ± 12,28
5	Etanol 50%	25	1:50	24,73 ^c ± 5,50
6	Etanol 100%	25	1:50	9,16 ^d ± 0,55
7	Água	40	1:20	51,13 ^a ± 4,96
8	Etanol 50%	40	1:20	31,49 ^b ± 1,07
9	Etanol 100%	40	1:20	3,99 ^d ± 0,44
10	Água	40	1:50	9,20 ^d ± 7,16
11	Etanol 50%	40	1:50	19,34 ^c ± 4,68
12	Etanol 100%	40	1:50	3,23 ^d ± 0,73

Notas. Os resultados estão expressos nos valores médios das replicatas ± desvio padrão (DP). Letras sobrescritas diferentes na mesma temperatura indicam diferença significativa em $p < 0,05$.

É possível observar certa discrepância entre as quantidades extraídas dos CFT dependendo das condições aplicadas, visto que, o teor variou entre 1,98 – 51,13 mg_{EAG} g⁻¹. Isto indica que ambos os solventes foram capazes de extrair os compostos fenólicos da amostra em estudo, mas com diferentes efetividades.

Para a água, obteve-se resultados entre 9,20 – 51,13 mg_{EAG} g⁻¹. Stelmach *et al.* (2015) apresentou em seu trabalho um estudo analisando 12 variantes do café arábica cru oriundos de diversas partes do mundo. Utilizando a água como solvente foram obtidos teores de CFT que variaram de 20,8 a 41,2 mg_{EAG} g⁻¹. O teor de compostos fenólicos totais encontrado por Tripetch e Borompichaichartkul (2019), através da extração dos grãos crus de café arábica proveniente da Tailândia aplicando água como solvente, foi de 40,14 mg_{EAG} g⁻¹. Comparando estes valores é possível notar que o resultado obtido pela extração de compostos fenólicos totais aplicando a água como solvente estão de acordo com os apresentados pela literatura.

Examinando os resultados dos extratos hidroalcoólico e alcoólico, têm-se teores para o etanol 50 % e para o etanol 100 % no intervalo de 19,34 – 32,24 mg_{EAG} g⁻¹ e 1,98 – 9,16 mg_{EAG} g⁻¹, respectivamente. Estudos realizados por Oliveira, É. *et al.* (2019), que analisava 6 diferentes solventes orgânicos na extração dos grãos crus de café arábica proveniente do sul de Minas Gerais, apresentou os resultados de 40,48 mg_{EAG} g⁻¹ e 22,81 mg_{EAG} g⁻¹ para a extração com etanol 100 % realizada no Soxhlet durante 3 e 5 h, respectivamente. Apesar dos resultados serem consideravelmente mais elevados quando comparado aos encontrados neste estudo, a metodologia aplicada apresenta desvantagens como o tempo de extração

e a dificuldade de reprodução em larga escala. Cheng e colaboradores (2019) realizaram a extração dos grãos crus de café arábica empregando aquecimento brando e agitação magnética, tendo o etanol 80 % como solvente extrator e obtiveram teores de compostos fenólicos totais de 4,24 e 3,22 mg_{EAG} g⁻¹, os quais corroboram os valores obtidos neste trabalho.

Para analisar estatisticamente os resultados apresentados na TABELA 7, aplicou-se a ANOVA e a metodologia de Gráfico de Efeitos para avaliar o impacto que as variáveis independentes (solvente, temperatura de extração e razão m/v) e suas interações desempenharam sobre o teor de compostos fenólicos totais. A TABELA 8 traz o resultado da análise de variância.

TABELA 8 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS DE *COFFEA ARABICA*

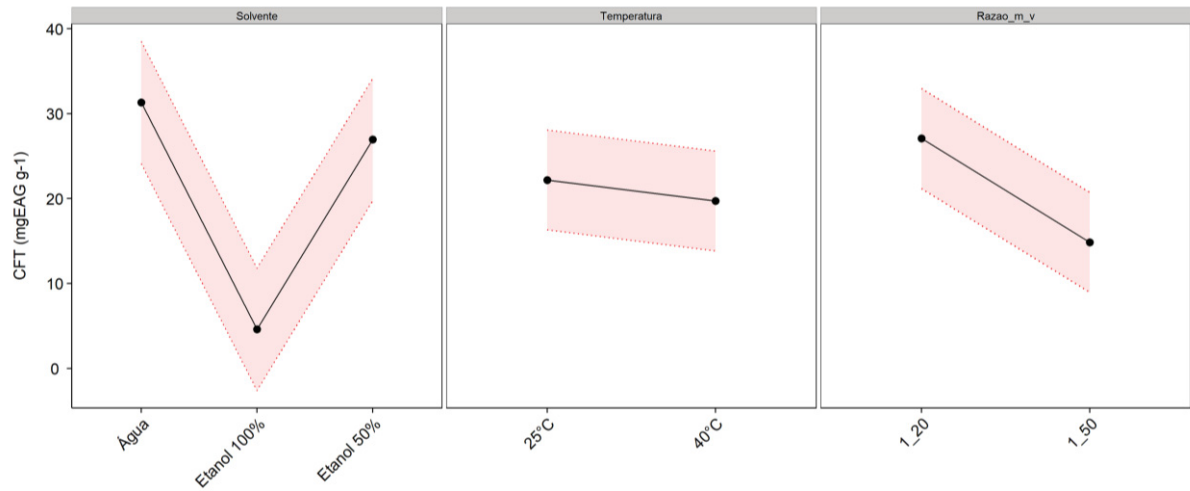
Fatores	G.L.	Soma Quadrática	Quadrado Médio	Estat. F	p-valor
Solvente	2	3290,22	1645,11	50,67	3,88E-7
Temperatura	1	36,02	36,02	1,11	0,31
Razão m/v	1	896,61	896,61	27,61	1,21E-4
Solvente:Temperatura	2	1,28	0,64	0,02	0,98
Solvente:Razão m/v	2	1123,80	561,90	17,31	1,64E-4
Temperatura:Razão m/v	1	220,23	220,23	6,78	0,02
Resíduos	14	454,54	32,47	-	-

Nota. G.L. = graus de liberdade; p-valor = valor de probabilidade.

Nota-se que segundo o parâmetro p-valor alguns fatores, como solvente, razão m/v e as interações solvente:razão m/v e temperatura:razão m/v, afetaram o processo de extração dos compostos fenólicos totais dos grãos crus de café arábica. É possível esta afirmação visto que o p-valor observado foi inferior a 0,05, indicando que se pode rejeitar a hipótese nula, hipótese de igualdade entre os resultados, e concluir que existe uma diferença significativa causada por estes parâmetros no processo de extração .

Com os resultados da análise de variância pode-se verificar quais fatores influenciaram no experimento, entretanto, não se pode afirmar qual dos níveis apresentou os melhores ou piores resultados. Assim sendo, aplicou-se o Gráfico de Efeitos (FIGURA 12) e um teste de comparação das médias, Teste de Tukey, para confrontar os resultados encontrados e concluir estatisticamente qual o melhor tratamento para a extração dos compostos fenólicos totais.

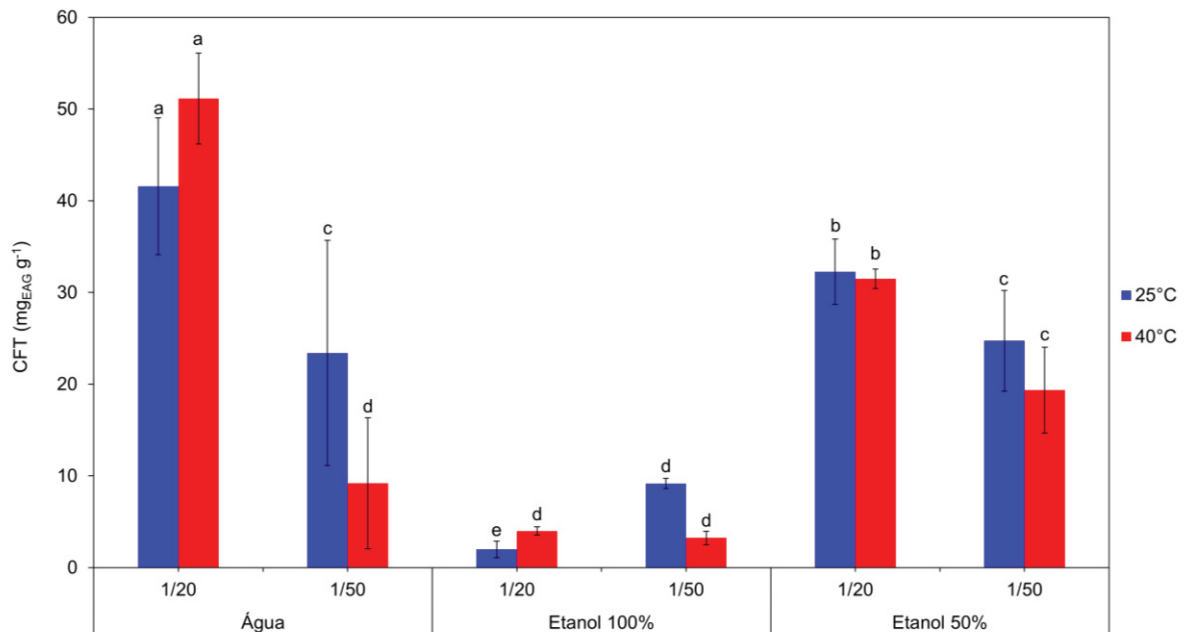
FIGURA 12 – GRÁFICO DE EFEITOS PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS



Entre os tipos de solvente, o etanol 100 % apresentou desempenho bem inferior frente aos demais, tendo a água como melhor solvente, porém com desempenho semelhante ao obtido pelo etanol 50 %. Em relação ao fator razão m/v, os melhores resultados foram alcançados com a razão 1:20 (m/v), enquanto para a temperatura os resultados em ambos os casos foram semelhantes, assim como apontado pela ANOVA.

Com o intuito de analisar mais profundamente as diferenças entre as médias de extração e verificar como se estabelece as diferenças significativas entre os parâmetros empregados, na FIGURA 13 está apresentado o resultado do Teste de Tukey com significância de 5 %. Nele foi considerado a influência das interações entre as variáveis solvente e razão m/v mantendo a temperatura constante.

FIGURA 13 – INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA RAZÃO M/V NO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS OBTIDOS A 25 °C E 40 °C



Nota. Letras diferentes para a mesma cor da coluna significam diferença significativa de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Confrontando os resultados anteriormente obtidos na FIGURA 12 com o que foi apresentado pelo gráfico, pode-se confirmar que a água na proporção 1:20 (m/v) apresentou os melhores resultados independente da temperatura.

Fazendo uma comparação com os resultados encontrados na temperatura de 25 °C, temos a água na razão de 1:20 (m/v) com o maior teor de CFT, seguido pelo etanol 50 % na mesma razão de 1:20 (m/v). Seguidamente a estes resultados aparece o etanol 50 % e água, ambos na razão de 1:50 (m/v), sem diferença significativa entre si. E os piores resultados são apresentados pelo etanol 100 %, independente da razão empregada. Para a temperatura de 40 °C, é encontrado o mesmo perfil de resultado, no entanto, a água na razão de 1:50 (m/v) não apresentou diferença significativa com o etanol 100 % em ambas as razões, tendo estas três condições de solvente e razão como as que apresentaram os menores teores de CFT para 40 °C. Já entre as temperaturas não é possível verificar a influência deste fator no resultado, como esperado, uma vez que, dependendo do tipo de solvente e da razão, o maior e menor valor se alternam entre as condições de 25 e 40 °C.

Ao confrontar as diferentes razões, para os solventes água e etanol 50 % os maiores valores, independente da temperatura, são encontrados na razão de 1:20

(m/v), com diferença significativa para a razão de 1:50 (m/v). Para o etanol 100 %, na temperatura de 25 °C, o melhor desempenho é apresentado pela razão de 1:50 (m/v) e em 40 °C não houve diferença significativa entre as duas razões.

Assim, temos que o que foi discutido corrobora com o observado na TABELA 8 e no Gráfico de Efeitos (FIGURA 12).

4.1.2 Atividade antioxidante

É sabido que os grãos de café possuem compostos bioativos que demonstram uma resposta positiva no tratamento de doenças crônicas e degenerativas. Dentre estes, os antioxidantes constituem o grupo de maior interesse dos pesquisadores, por isso a importância de estudá-los (WANDERLEY *et al.*, 2017).

Posto isso, por meio da equação obtida pela curva de calibração do Trolox mostrada na FIGURA 22, presente no APÊNDICE 1, na TABELA 9 estão apresentados os resultados obtidos para atividade antioxidante pelo método de DPPH.

TABELA 9 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE CAFÉ ARÁBICA PELO MÉTODO DPPH

Amostra	Variáveis explanatórias			DPPH (mg _{ET} g ⁻¹)
	Solvente	Temperatura (°C)	Razão m/v	
1	Água	25	1:20	39,83 ^c ± 16,17
2	Etanol 50%	25	1:20	72,75 ^a ± 0,03
3	Etanol 100%	25	1:20	14,60 ^d ± 3,69
4	Água	25	1:50	24,88 ^d ± 2,13
5	Etanol 50%	25	1:50	67,76 ^b ± 3,84
6	Etanol 100%	25	1:50	36,26 ^d ± 2,52
7	Água	40	1:20	17,62 ^c ± 4,63
8	Etanol 50%	40	1:20	72,77 ^a ± 6,86
9	Etanol 100%	40	1:20	22,30 ^c ± 4,67
10	Água	40	1:50	14,55 ^c ± 5,03
11	Etanol 50%	40	1:50	93,75 ^a ± 6,87
12	Etanol 100%	40	1:50	49,28 ^b ± 6,62

Notas. Os resultados estão expressos nos valores médios das replicatas ± DP. Letras sobrescritas diferentes na mesma temperatura indicam diferença significativa em $p < 0,05$.

Os resultados da atividade antioxidante pelo método DPPH obtidos para os diferentes solventes estão na faixa de 14,55 – 93,75 mg_{ET} g⁻¹, novamente mostrando que existe diferença na capacidade de extração de cada solvente. A água apresentou resultados no intervalo de 14,55 – 39,83 mg_{ET} g⁻¹, o solvente etanol 50 %

ficou entre 67,76 – 93,75 mg_{ET} g⁻¹ e o etanol 100 % obteve valores da atividade antioxidante na faixa de 14,60 – 49,28 mg_{ET} g⁻¹. Evidentemente, observa-se a maior capacidade de atividade antioxidante no extrato obtido com o solvente etanol 50 % frente aos demais.

Em estudo realizado por Cheng *et al.* (2019), utilizando como solvente o etanol 80 % na extração dos grãos crus de café arábica, encontrou-se o valor de 15,5 mg_{ET} g⁻¹ para a atividade antioxidante pelo método de DPPH, estando de acordo com o que foi obtido neste trabalho aplicando o solvente etanol 100 %. Isto nos faz pressupor que em solventes com teores alcoólicos próximos a 100 % a extração de antioxidantes é desfavorecida, uma vez que o solvente etanol 50 % apresentou resultados superiores.

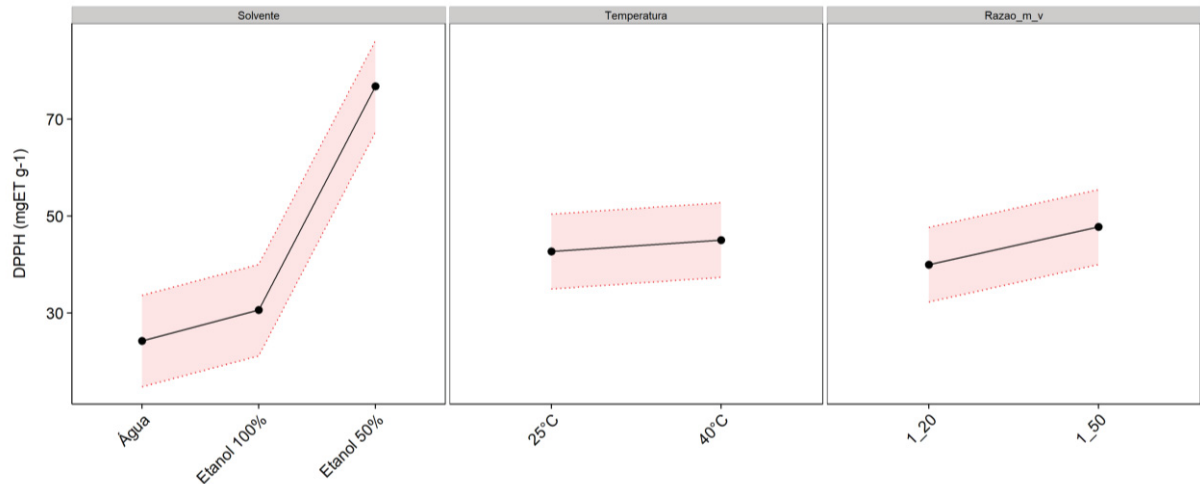
Assim como para o teor de CFT, realizou-se a ANOVA e construiu-se o Gráfico de Efeitos para poder averiguar os dados encontrados. Na TABELA 10 estão apresentados os resultados da análise de variância.

TABELA 10 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH DOS EXTRATOS DE *COFFEA ARABICA*

Fatores	G.L.	Soma Quadrática	Quadrado Médio	Estat. F	p-valor
Solvente	2	13148,14	6574,07	148,78	3,70E-10
Temperatura	1	33,51	33,51	0,76	0,40
Razão m/v	1	362,14	362,14	8,20	0,01
Solvente:Temperatura	2	1048,78	524,39	11,87	9,67E-4
Solvente:Razão m/v	2	1111,01	555,50	12,57	7,49E-4
Temperatura:Razão m/v	1	310,92	310,92	7,04	0,02
Resíduos	14	618,60	44,19	-	-

Observando os resultados, tem-se que, com exceção da temperatura a qual apresentou um p-valor maior que 0,05, para todos os outros parâmetros pode-se rejeitar a hipótese nula e concluir que exercem influência no resultado. Para verificar como os diferentes níveis se comportam na análise da atividade antioxidante pelo método de DPPH, fez-se o Gráfico de Efeitos que está apresentado no FIGURA 14.

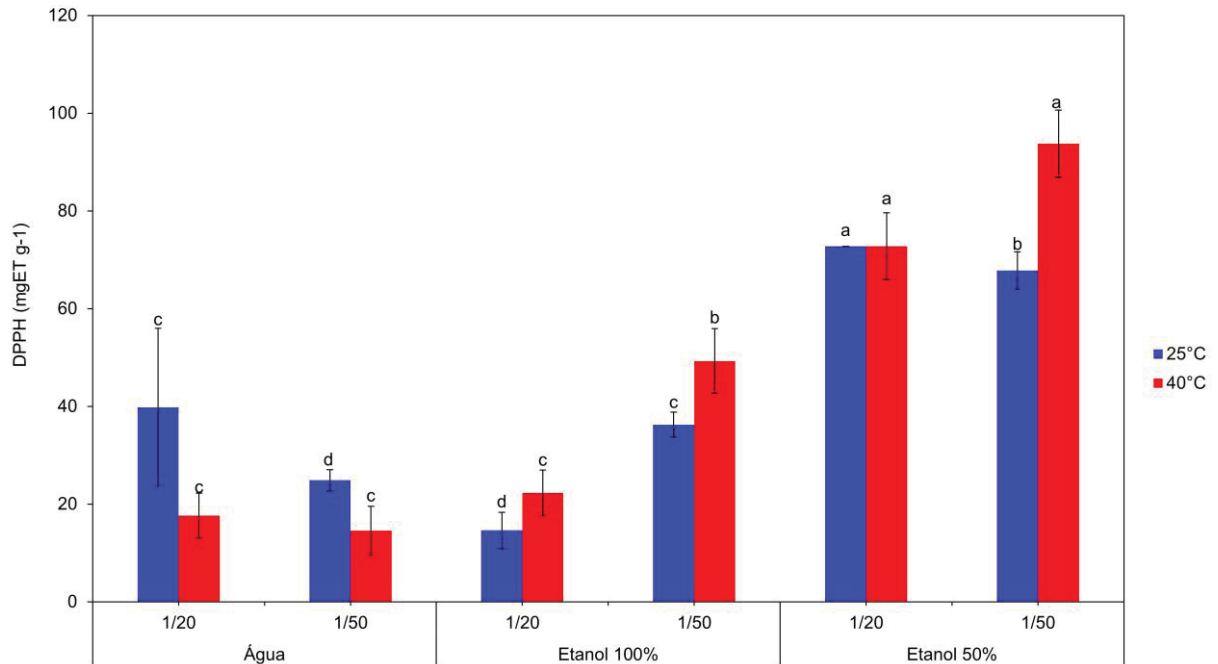
FIGURA 14 – GRÁFICO DE EFEITOS DA ATIVIDADE DE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DPPH



Nota-se que o solvente é o fator de maior diferença significativa para a atividade antioxidante pelo método de DPPH. O melhor desempenho foi obtido com o solvente etanol 50 %, tendo que tanto a água, quanto o etanol 100 % ilustraram resultados bem inferiores e não muito díspares entre si. Com relação ao fator razão m/v, na razão de 1:50 (m/v) obteve-se um teor de atividade antioxidante um pouco superior quando comparada à razão de 1:20 (m/v) e para a temperatura não é possível verificar diferença entre os diferentes níveis, como foi previsto na análise de variância apresentada na TABELA 10.

Com o intuito de complementar esta análise, aplicou-se o Teste de Tukey para comparar as médias da atividade antioxidante pelo método de DPPH de cada ensaio na mesma temperatura. O resultado está apresentado na FIGURA 15.

FIGURA 15 – INFLUÊNCIA DO SOLVENTE E DA RAZÃO M/V NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DPPH DOS EXTRATOS OBTIDOS A 25 °C E 40 °C



Nota. Letras diferentes para a mesma cor da coluna significam diferença significativa de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na temperatura de 25 °C, tem-se que os ensaios realizados com etanol 50 % apresentaram os melhores resultados, tendo a razão de 1:20 (m/v) com resultados de atividade antioxidante superiores quando comparado à razão de 1:50 (m/v). Em seguida, tem-se a água na razão de 1:20 (m/v) sem diferença significativa com o etanol 100 % na razão de 1:50 (m/v) apresentando resultados mais satisfatórios quando comparado à água na razão de 1:50 (m/v) e ao etanol 100 % na razão de 1:20 (m/v), os quais não apresentaram diferença significativa entre si.

A temperatura de 40 °C exprime resultados com diferenças mais expressivas entre o melhor e o pior ensaio. Assim como para a temperatura de 25 °C, o melhor resultado foi alcançado pelo solvente etanol 50 %, neste caso, independente da razão aplicada, pois não houve diferença significativa entre elas. Seguidamente, tem-se o etanol 100 % na razão de 1:50 (m/v) com os maiores teores de atividade antioxidante e os demais ensaios não apresentaram diferença significativa entre si.

Comparando as razões, para o solvente etanol 100 %, independente da temperatura, os maiores resultados foram alcançados pela razão de 1:50 (m/v), no entanto, para os solventes água e etanol 50 %, o comportamento é dependente da temperatura, como esperado, uma vez que segundo a ANOVA a interação entre

estes parâmetros é significativa. Para a água e o etanol 50 % na temperatura de 25 °C, a razão de 1:20 (m/v) apresenta resultados superiores, no entanto, a 40 °C não se observa diferença significativa entre os resultados nas diferentes razões.

Logo temos que, para a análise da atividade antioxidante pelo método de DPPH, independente da temperatura ou da razão m/v aplicada, o solvente etanol 50 % apresentou o melhor desempenho frente os demais solventes.

Para complementar os ensaios de atividade antioxidante pelo método de DPPH, optou-se por trabalhar com o método FRAP em virtude da informação complementar que este método oferece. Desta forma, na TABELA 11 estão apresentados os resultados obtidos pelo método FRAP para cada ensaio determinado pelo planejamento de experimento, seguindo a equação da curva de calibração da FIGURA 23, APÊNDICE 1.

TABELA 11 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE CAFÉ ARÁBICA PELO MÉTODO FRAP

Amostra	Variáveis explanatórias			FRAP (mg _{ET} g ⁻¹)
	Solvente	Temperatura (°C)	Razão m/v	
1	Água	25	1:20	0,88 ⁱ ± 0,56
2	Etanol 50%	25	1:20	14,82 ^g ± 1,18
3	Etanol 100%	25	1:20	19,38 ^e ± 5,60
4	Água	25	1:50	27,46 ^b ± 7,94
5	Etanol 50%	25	1:50	5,26 ^h ± 1,47
6	Etanol 100%	25	1:50	8,28 ^h ± 1,90
7	Água	40	1:20	1,37 ⁱ ± 0,68
8	Etanol 50%	40	1:20	15,38 ^f ± 0,71
9	Etanol 100%	40	1:20	23,59 ^c ± 0,26
10	Água	40	1:50	23,35 ^d ± 2,42
11	Etanol 50%	40	1:50	13,32 ^g ± 1,90
12	Etanol 100%	40	1:50	45,95 ^a ± 1,08

Notas. Os resultados estão expressos nos valores médios das replicatas ± DP. Letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa em $p < 0,05$.

Para a atividade antioxidante pelo método de FRAP, obteve-se resultados na faixa de 0,88 – 45,95 mg_{ET} g⁻¹, como apresentado pela TABELA 11. Neste caso, o solvente água apresentou resultados que variaram de 0,88 – 27,46 mg_{ET} g⁻¹ e encontrou-se valores na faixa de 5,26 – 15,38 mg_{ET} g⁻¹ e 8,28 – 45,95 mg_{ET} g⁻¹ para os solventes hidroalcoólico e alcoólico, respectivamente. Nota-se que todos os ensaios nesta análise exibiram resultados díspares para um mesmo solvente, apontando que os fatores temperatura e razão m/v provavelmente interferiram significativamente no processo de extração.

O solvente etanol 100 % foi o que apresentou os maiores resultados, diferentemente do ocorrido nas análises anteriores, onde este se destacou por exibir os piores desempenhos. Entretanto este também foi o solvente com a maior discrepância entre os resultados, indicando que o fator solvente extrator não é o único interferente nesta análise. Quanto à água e ao etanol 50 %, estes apresentaram resultados dentro de um mesmo intervalo apontando que não houve grande diferença entre os teores de atividade antioxidante obtidos por estes dois solventes.

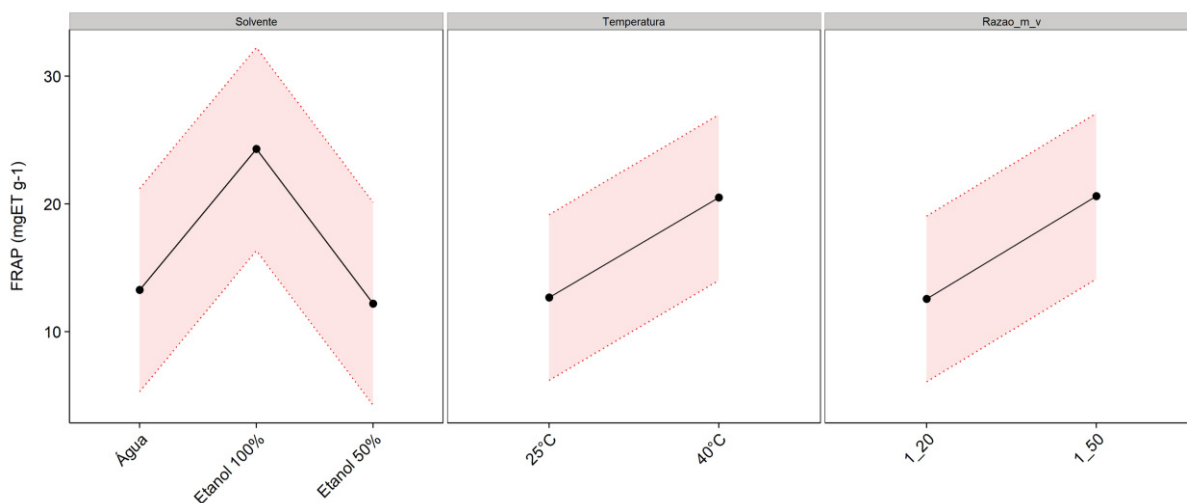
Para avaliar estatisticamente os dados da atividade antioxidante pelo método FRAP, realizou-se a ANOVA e o Gráfico de Efeitos dos resultados. Na TABELA 12 estão apresentados os resultados da análise de variância.

TABELA 12 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP DOS EXTRATOS DE *COFFEA ARABICA*

Fatores	G.L.	Soma Quadrática	Quadrado Médio	Estat. F	p-valor
Solvente	2	718,56	359,28	10,24	1,82E-3
Temperatura	1	366,36	366,36	10,44	6,04E-3
Razão m/v	1	387,33	387,33	11,03	5,04E-3
Solvente:Temperatura	2	554,45	277,22	7,90	5,06E-3
Solvente:Razão m/v	2	922,65	461,33	13,14	6,12E-4
Temperatura:Razão m/v	1	220,24	220,24	6,27	0,02
Resíduos	14	491,41	35,10	-	-

Observando a ANOVA da atividade antioxidante pelo método FRAP, tem-se que todos os fatores apresentaram um p-valor menor que 0,05, ou seja, interferem no resultado final. Para auxiliar no melhor entendimento deste resultado e verificar quais as melhores condições de extração, fez-se o Gráfico de Efeitos, apresentado na FIGURA 16.

FIGURA 16 – GRÁFICO DE EFEITOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP



Analisando o fator tipo de solvente, ao contrário do obtido nas duas análises anteriores, a diferença entre as médias dos resultados observada, apesar de significativa, é a menor entre as análises (CFT: 26,73 mg_{EAG} g⁻¹, DPPH: 52,54 mg_{ET} g⁻¹ e FRAP: 12,10 mg_{ET} g⁻¹). Tendo o etanol 100 % como melhor solvente com os solventes água e etanol 50 % sem aparente diferença significativa entre eles, assim como foi previsto analisando os resultados exibidos na TABELA 11.

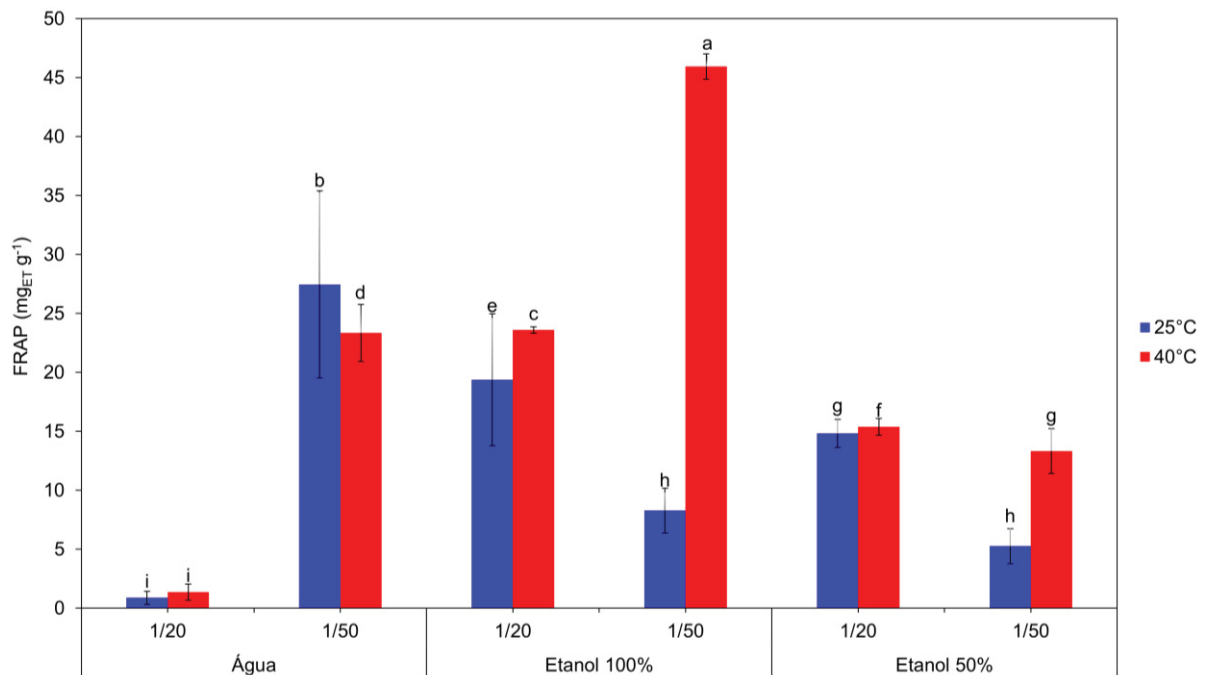
Os fatores temperatura e razão m/v, como visto pela análise de variância, exercem certa influência sobre o resultado da atividade antioxidante pelo método FRAP, tendo resultados mais satisfatórios para a temperatura de 40 °C e razão de 1:50 (m/v). Esta foi a única análise onde houve influência da temperatura de extração nos resultados obtidos.

Fazendo uma comparação entre os resultados obtidos pelos métodos de atividade antioxidante DPPH e FRAP, observa-se que em ambos os casos a água está entre os desempenhos mais baixos, no entanto os solventes hidroalcoólico e alcoólico apresentam desempenhos opostos nas análises. No método DPPH o etanol 50 % exibiu resultados expressivamente mais elevados ao comparar com o etanol 100 % e no método FRAP tem-se o etanol 100 % com o melhor desempenho de extração de antioxidantes. Como estas análises envolvem diferentes mecanismos da ação antioxidante, este pode ser um dos fatores que justificam as diferenças encontradas nos perfis, contudo a análise sobre a atividade antioxidante de matrizes

naturais é uma ciência complexa que exige um estudo aprofundado para melhor compreendê-la.

Observa-se na TABELA 12 que as interações entre os fatores também exercem influência na busca pelos melhores parâmetros de extração para a atividade antioxidante pelo método FRAP. Desta forma, para avaliar com mais cuidado a interação entre os fatores e verificar como se comporta a diferença entre as médias de extração de cada ensaio, confrontando com os resultados apresentados pelas análises estatísticas realizadas, aplicou-se o Teste de Tukey. Na FIGURA 17 tem-se o resultado.

FIGURA 17 – INFLUÊNCIA DO SOLVENTE DA RAZÃO M/V E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP DOS EXTRATOS OBTIDOS



Nota. Letras diferentes significam diferença significativa de acordo com o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para a análise da atividade antioxidante pelo método FRAP todos os fatores exercem influência, desta forma, o Teste de Tukey foi realizado considerando todos os resultados simultaneamente.

A partir do apresentado na FIGURA 17, tem-se que o melhor resultado foi obtido pelo etanol 100% na razão 1:50 (m/v) a 40 °C, com uma notável diferença para os demais. O segundo melhor resultado foi apresentado pela água na mesma razão a 25 °C, seguido do etanol 100 % na razão 1:20 (m/v) a 40 °C. Em seguida, tem-se a água na razão 1:50 (m/v) e 40 °C com diferença significativa para o etanol

100 % a 25 °C na razão de 1:20 (m/v), logo depois temos os resultados obtidos com o solvente etanol 50 %, sendo que para as condições de 25 °C e razão 1:50 (m/v) não apresentou diferença significativa com o etanol 100 % nas mesmas condições. E, finalmente os piores resultados foram apresentados pela água na razão 1:20 (m/v) não verificando diferença significativa entre as diferentes temperaturas.

Considerando de um modo geral, a temperatura de 40 °C apresentou resultados realmente superiores quando comparado os ensaios no mesmo solvente e mesma razão. Já para o fator razão é possível observar uma dependência na sua variação de acordo com a temperatura e o tipo de solvente. Para o etanol 100 % e para a água na temperatura de 40 °C a razão de 1:50 (m/v) apresentou os maiores teores de atividade antioxidante. Entretanto, para 25 °C no solvente etanol 100 %, a razão 1:20 (m/v) apresentou melhores resultados, já para a água ainda tivemos uma superioridade da razão 1:50 (m/v). E no solvente etanol 50 %, independente da temperatura a razão 1:20 (m/v) apresentou os melhores resultados de atividade antioxidante.

As análises realizadas para a caracterização dos extratos, teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP, confirmam a viabilidade da ESL para se obter um extrato rico em compostos bioativos. Verificando os resultados alcançados na caracterização, definiu-se como melhor extrato o obtido pelo solvente etanol 50 %, na temperatura de 25 °C e razão de 1:20 (m/v). O solvente etanol 50 % demonstrou bom desempenho na extração de CFT e atividade antioxidante pelo método DPPH e apesar de não estar entre os melhores solventes para o método FRAP, apresentou bons resultados na razão de 1:20 (m/v). A temperatura de extração foi um fator que exerceu influência apenas para a atividade antioxidante pelo método FRAP, no entanto percebe-se que, exceto para a condição de etanol 100 % a 1:50 (m/v), a diferença não foi proeminente para as outras condições nas diferentes temperaturas, desta forma optou-se por empregar a extração a 25 °C. Definido o solvente extrator e a temperatura, a razão 1:20 (m/v) apresentou os melhores resultados nas condições escolhidas, logo esta foi a razão empregada.

4.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE COMPOSIÇÃO DETERMINADO POR CROMATOGRAFIA

Para prosseguir com as análises dos extratos dos grãos crus de café arábica, foi realizada a avaliação cromatográfica do perfil de composição do extrato que apresentou os melhores resultados. Que é o extrato obtido a base do solvente etanol 50 %, na temperatura de 25 °C e razão de 1:20 (m/v).

Neste trabalho analisou-se os principais compostos bioativos presentes no café, são eles: cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos. Estes foram identificados por UHPLC e os resultados estão apresentados na TABELA 13, a seguir.

TABELA 13 – TEORES DE TRIGONELINA, CAFEÍNA E ÁCIDOS CLOROGÊNICOS NO EXTRATO DOS GRÃOS CRUS DE CAFÉ ARÁBICA

Compostos bioativos		Teor (g 100 g ⁻¹)
Alcaloides	Trigonelina	1,12
	Cafeína	1,39
	3-ACQ	0,56
	4-ACQ	0,86
	5-ACQ	3,92
Ácidos Clorogênicos	4,5-AFQ	0,54
	3,4-AdiCQ	0,24
	3,5-AdiCQ	0,39
	4,5-AdiCQ	0,32
	Total ACG	6,83

As sementes cruas de café possuem dois principais alcaloides em sua composição, a trigonelina e a cafeína (ASHIHARA, 2006). Para o extrato escolhido segundo os melhores parâmetros da etapa de ESL os valores obtidos destes dois compostos estão de acordo com a literatura. Toci, Farah e Trugo (2006) encontraram teores de cafeína de 0,98 g % e de trigonelina de 1,10 g %. No estudo realizado por Yisak, Redi-Abshiro e Chandravanshi (2018), empregando a água, os autores obtiveram teores de cafeína e trigonelina na faixa de 0,84 – 1,13 g % e 0,83 – 1,10 g %, respectivamente. Aplicando um solvente a base de metanol, Dziki *et al.* (2015) alcançaram o teor de cafeína de 0,48 g %.

Nesta caracterização foi possível identificar 7 diferentes isômeros dos ácidos clorogênicos, tendo o 5-ACG como o composto dominante. Comparando o teor obtido para cada isômeros e o valor total de ACG com os dados da literatura, tem-se que os resultados corroboram entre si. Em sua pesquisa com grãos crus de café, Cheng, K. *et al.* (2019) identificaram 9 isômeros dos ácidos clorogênicos e obteve um teor total de ACG de 4,22 g %. Dziki *et al.* (2015) e Toci, Farah e Trugo (2006) também apresentaram resultados similares ao encontrado neste trabalho para o teor total de ácidos clorogênicos, 5,88 e 6,69 g %, respectivamente. Macheiner *et al.*

(2019) estudaram café de diversas origens e obteve teores totais de ácidos clorogênicos na faixa de 5,72 – 8,03 g %.

Isto mostra que os parâmetros escolhidos para a etapa de ESL foram eficientes para a obtenção de uma amostra com bons resultados dos principais compostos bioativos dos grãos crus de café da espécie *Coffea arabica*.

CAPÍTULO 5 - PLANEJAMENTO FATORIAL MISTO PARA A ETAPA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Neste capítulo diferentes DES hidrofóbicos compostos a partir de mentol e ácidos carboxílicos foram avaliados quanto a sua aplicabilidade no processo de extração líquido-líquido dos extratos de grãos crus de café da espécie *Coffea arabica*. Avaliou-se as fases quantitativamente quanto ao teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP e confrontou os resultados obtidos pelos sistemas hidrofóbicos com os SDFA.

5.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Assim como no Capítulo 4, para avaliar os resultados obtidos através da ELL dos extratos dos grãos crus de café arábica, aplicou-se o planejamento fatorial misto. Para esta etapa do trabalho, os fatores empregados foram o tipo de extrato e o solvente extrator, sendo a temperatura fixada em 25 °C, o tempo de agitação para mistura das fases em 1 minuto e o tempo de decantação das fases em 24 h. As respostas analisadas foram quanto ao teor de CFT e atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP.

Durante a execução dos procedimentos experimentais, apesar de inicialmente não estar dentro do planejamento experimental, foi investigado dois tempos de decantação das fases, 24 h (como inicialmente estava definido) e 96 h. O intuito desta investigação era verificar se com o passar do tempo observar-se-ia mudanças nas amostras, de forma a garantir que dentro das 24 h seria possível alcançar o equilíbrio entre as fases. As amostras foram avaliadas visualmente quanto a cor e tamanho das fases a cada 24 h, no entanto não apresentaram diferença ao confrontar com as características das amostras obtidas após 1 dia de decantação. Ainda assim, optou-se por realizar a caracterização das fases após 96 h e comparar com o resultado obtido nas primeiras 24 h de extração.

Os resultados das caracterizações foram alcançados aplicando as equações das curvas de calibração, da sua respectiva solução padrão, apresentadas no APÊNDICE 1.

5.1.1 Teor de compostos fenólicos totais para a etapa de ELL

A mesma metodologia empregada para quantificar o teor de compostos fenólicos totais na etapa de extração sólido-líquido foi utilizada nesta etapa de extração líquido-líquido. Os resultados obtidos para as fases de topo e fundo nos dois tempos de decantação investigados estão apresentados na TABELA 14.

Com o intuito de auxiliar no estudo de como os bioativos se particionaram entre as fases hidrofílicas e hidrofóbicas, calculou-se uma razão de extração conforme apresentado pela EQUAÇÃO 4.

$$R = \frac{[topo]}{[fundo]} \quad (4)$$

Sendo: R = a razão de extração, [topo] = o teor de CFT ou AA para a fase de topo e [fundo] = o teor de CFT ou AA para a fase de fundo.

Esta razão foi empregada tanto na análise do teor de compostos fenólicos totais, quanto na atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP. Para o teor de CFT seu resultado também está exibido na TABELA 14.

TABELA 14 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DAS FASES DE TOPO E FUNDO OBTIDAS PELA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO NOS TEMPOS DE 24 E 96 HORAS

Amostra	Variáveis explanatórias		CFT (mg _{EAG} g ⁻¹) 24 h		CFT (mg _{EAG} g ⁻¹) 96 h			
	Extrato	Solvente Extrator	Fase de Topo	Fase de Fundo	R _{CFT}	Fase de Topo	Fase de Fundo	R _{CFT}
1	ChCl 50 %	MAA	34,97 ^a ± 3,81	35,00 ^c ± 0,71	1,00	33,46 ^a ± 0,41	29,05 ^{b,c} ± 2,76	1,15
2	ChCl 50 %	MLAT	20,03 ^{b,c} ± 1,59	19,28 ^e ± 0,35	1,04	12,67 ^{e,f} ± 0,76	14,04 ^d ± 0,35	0,90
3	ChCl 50 %	MCAP	26,15 ^{a,b} ± 1,21	31,88 ^d ± 0,88	0,82	26,93 ^b ± 0,12	35,83 ^{b,c} ± 7,88	0,75
4	ChCl 50 %	MLAU	19,20 ^{b,c} ± 4,94	33,25 ^{c,d} ± 0,35	0,58	16,96 ^{d,e} ± 1,88	32,46 ^{b,c} ± 1,70	0,52
5	ChCl 50 %	S DFA	10,15 ^c ± 0,11	N/A	N/A	11,46 ^f ± 1,21	N/A	N/A
6	Etanol 50 %	MAA	31,70 ^a ± 4,00	31,03 ^d ± 0,97	1,02	31,14 ^{a,b} ± 0,18	31,47 ^{b,c} ± 3,41	0,99
7	Etanol 50 %	MLAT	17,94 ^{b,c} ± 3,97	19,62 ^e ± 0,35	0,91	21,80 ^c ± 0,03	24,82 ^c ± 1,94	0,88
8	Etanol 50 %	MCAP	17,41 ^{b,c} ± 1,19	41,57 ^b ± 1,41	0,42	17,19 ^d ± 2,50	43,03 ^{a,b} ± 5,12	0,40
9	Etanol 50 %	MLAU	25,37 ^{a,b} ± 1,75	48,00 ^a ± 0,09	0,53	19,56 ^{c,d} ± 0,09	52,67 ^a ± 3,88	0,37
10	Etanol 50 %	S DFA	13,40 ^c ± 1,18	N/A	N/A	11,99 ^f ± 0,52	N/A	N/A

Nota. Os resultados estão expressos em valores médios das replicatas ± DP. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa de acordo com Teste de Tukey (p < 0,05). R_{CFT} = razão de extração para o teor de compostos fenólicos totais.

Não foi possível obter resultados para a fase de fundo dos SDFA, em razão do turvamento das amostras durante a análise. Isto pode ter ocorrido devido a uma reação entre os reagentes utilizados na metodologia da análise de compostos fenólicos totais e o sal K_2HPO_4 presente na fase, uma vez que nestes sistemas a fase de fundo se caracteriza por ser rica em sal (FARIAS *et al.*, 2017).

Em relação aos resultados presentes na TABELA 14, nota-se que para os sistemas formados pelo extrato a base de ChCl 50% e os HDES MAA, MLAT e MCAP, a R_{CFT} apresentou valores próximos a 1. O mesmo foi observado para os sistemas com o extrato a base de etanol 50 % e os HDES MAA e MLAT. Isto indica que os CFT particionaram de forma igualitária entre as fases, ou seja, não houve uma maior afinidade pela fase hidrofílica ou hidrofóbica nestes sistemas. Este comportamento, apesar de ainda apresentar que houve uma ELL, não é satisfatório, visto que o objetivo na aplicação da ELL é isolar biocompostos de interesse em uma determinada fase. Em contrapartida, os sistemas formados pelo extrato a base de ChCl 50 % e o HDES MLAU e extrato a base de etanol 50 % e os HDES MCAP e MLAU apresentaram bons resultados, uma vez que é possível observar uma maior afinidade dos CFT pela fase de fundo, fase hidrofílica.

Confrontando os resultados das fases entre os diferentes sistemas, tem-se que a fase de topo os SDFA, independente do extrato empregado, apresentaram os menores valores de CFT. Os maiores teores na fase de topo foram alcançados pelos sistemas formados com o HDES MAA, não interferindo o tipo de extrato. Para a fase de fundo os maiores valores de CFT foram observados para os sistemas com o extrato a base de etanol 50 % e os HDES MCAP e MLAU, ao passo que os piores foram apresentados pelos sistemas contendo MLAT, independente do extrato.

Com relação aos tempos de decantação das fases, não houve diferença no perfil dos resultados, indicando que este fator não interferiu de forma significativa na extração.

Para avaliar estatisticamente os resultados obtidos, aplicou-se a ANOVA nas fases de topo e fundo para verificar a influência dos fatores e suas interações no processo de ELL. Os resultados estão apresentados nas TABELAS 15 e 16.

TABELA 15 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NA FASE DE TOPO DA ELL

Fatores	G.L.	Soma Quadrática	Quadrado Médio	Estat. F	p-valor
Solvente	4	1879,37	469,84	68,57	8,86E-13
Extrato	1	2,01	2,01	0,29	0,59
Tempo	1	17,29	17,29	2,52	0,12
Solvente:Extrato	4	254,92	63,73	9,30	1,09E-4
Solvente:Tempo	4	23,56	5,89	0,86	0,50
Extrato:Tempo	1	2,38	2,38	0,35	0,56
Resíduos	24	164,45	6,85	-	-

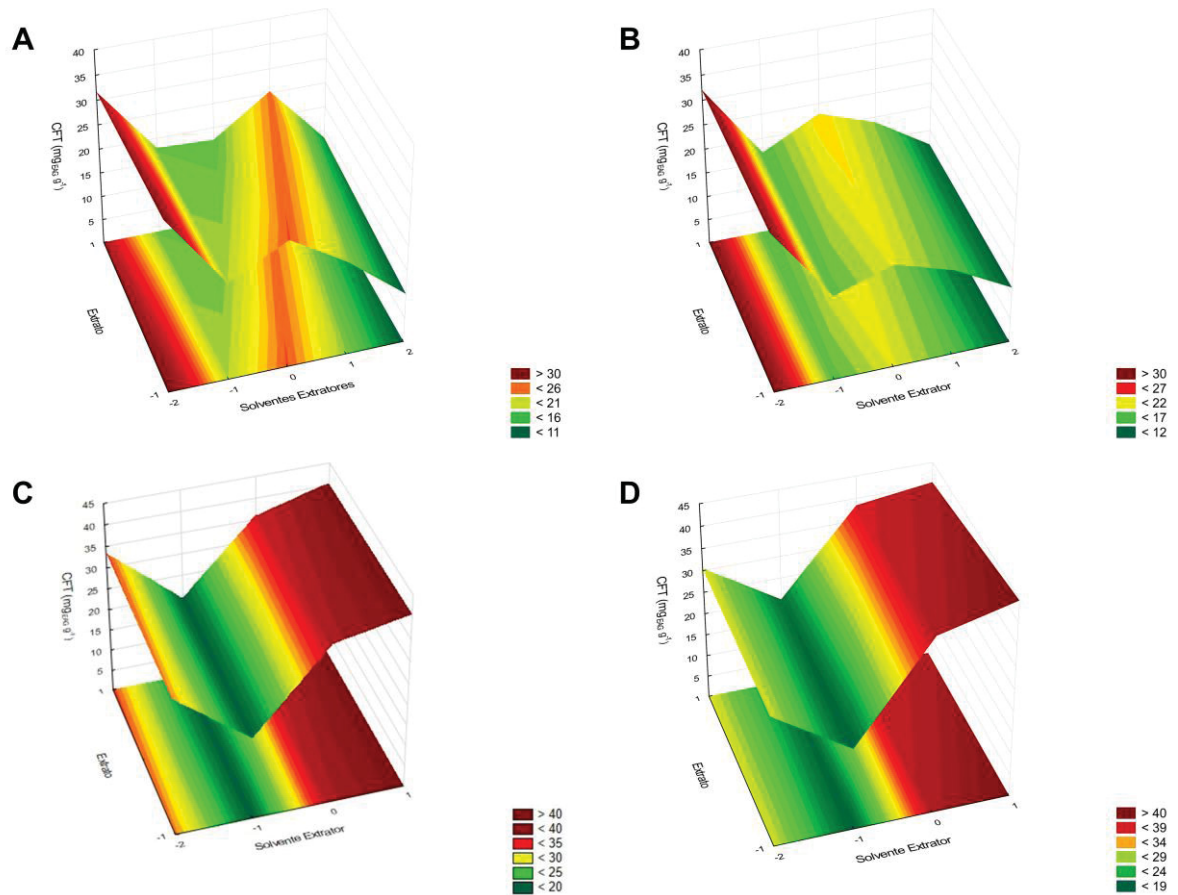
TABELA 16 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA O TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NA FASE DE FUNDO DA ELL

Fatores	G.L.	Soma Quadrática	Quadrado Médio	Estat. F	p-valor
Solvente	3	2280,11	760,04	81,18	5,12E-11
Extrato	1	471,25	471,25	50,33	9,51E-7
Tempo	1	1,75	1,75	0,19	0,67
Solvente:Extrato	3	345,17	115,06	12,229	1,07E-4
Solvente:Tempo	3	35,59	11,86	1,27	0,31
Extrato:Tempo	1	48,96	48,96	5,23	0,03
Resíduos	19	177,89	9,36	-	-

Como apontado pela TABELA 15, o fator que exerce influência no resultado da fase de topo é o tipo de solvente e a interação solvente:extrato, p-valor menor que 0,05, logo pode-se rejeitar a hipótese nula. Para a fase de fundo tanto o solvente, quanto o extrato, a interação entre eles e a interação extrato e tempo apresentaram um p-valor menor que 0,05, mostrando que influenciam no resultado da extração. Isto pôde ser observado na discussão dos dados apresentados pela TABELA 14, onde para a fase de topo o melhor e o pior valor independiam do tipo de extrato, enquanto para a fase de fundo o extrato a base de etanol 50 % apresentou os melhores resultados.

Construiu-se o gráfico de superfície para as fases de topo e fundo nos diferentes tempos de decantação para melhor ilustrar os resultados alcançados. Estes estão apresentados na FIGURA 18.

FIGURA 18 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS RESULTADOS DO TEOR DE CFT OBTIDOS PARA A FASE DE TOPO E FUNDO NOS TEMPOS DE 24 E 96 HORAS



Nota. **A** e **B** são os gráficos da fase de topo no tempo de 24 e 96 horas, respectivamente. **C** e **D** são os gráficos da fase de fundo no tempo de extração de 24 e 96 horas, respectivamente. Os fatores estão representados nos gráficos por meio de seus valores codificados.

Como é possível observar o perfil dos resultados e seus valores não são alterados com o tempo, como visto pela ANOVA, apontando que o tempo de 24 h é suficiente para alcançar o equilíbrio das fases nas condições de operação. Nota-se, também, que o tipo de extrato, ChCl 50 % (-1) e etanol 50 % (1), não exercem grande influência no resultado, comparado ao fator solvente extrator.

Observa-se que os maiores resultados na fase de topo (região de cor vermelho amarronzada) são obtidos com o HDES MAA (-2), seguido pelo HDES MCAP (0). Para a fase de fundo os HDES MCAP (0) e MLAU (1) se destacam dos demais, corroborando os resultados apresentados nas análises anteriores. Considerando todas essas análises estatísticas, conclui-se que os melhores sistemas foram os obtidos pelo extrato a base de etanol 50 % e HDES MCAP e MLAU, dado que apresentam elevados teores de CFT e maior afinidade dos compostos por uma das fases.

O desempenho inferior apresentado pelos sistemas contendo os HDES MAA e MLAT pode ser justificado devido às características dos doadores de hidrogênio. O ácido acético e o ácido láctico apresentam um $\log(K_{ow})$ de -0,2 e -0,7, respectivamente, ou seja, possuem carácter mais hidrofílico quando comparado aos ácidos caprílico e láurico que têm um $\log(K_{ow})$ de 3 e 4,2. Esta característica pode ter possibilitado uma maior ou menor interação das fases hidrofóbicas com os compostos fenólicos presentes no extrato dos grãos crus de café arábica, visto que os ácidos clorogênicos são um dos principais componentes da fração fenólica do café e apresenta $\log(K_{ow})$ de -0,27 (BASTOS DE MARIA; MOREIRA, 2004).

5.1.2 Atividade antioxidante para a etapa de ELL

Assim como no Capítulo 4, a análise da atividade antioxidante foi estudada por dois diferentes métodos, DPPH e FRAP.

Os resultados da atividade antioxidante pelo método DPPH para as fases de topo e fundo da ELL nos diferentes tempos de decantação estão apresentados na TABELA 17, assim como o valor da razão de extração para esta análise, obtida pela razão entre topo e fundo.

TABELA 17 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH DAS FASES DE TOPO E FUNDO OBTIDA PELA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO NOS TEMPOS DE 24 E 96 HORAS

Amostra	Variáveis explanatórias						DPPH (mg _{ET} g ⁻¹) 24 h		DPPH (mg _{ET} g ⁻¹) 96 h	
	Extrato	Solvente Extrator	Fase de Topo	Fase de Fundo	R _{DPPH}	Fase de Topo	Fase de Fundo	R _{DPPH}	Fase de Topo	Fase de Fundo
1	ChCl 50 %	MAA	34,89 ^c ± 0,28	42,75 ^a ± 0,08	0,82	23,76 ^b ± 2,74	42,19 ^a ± 0,47	0,56	42,19 ^a ± 0,47	0,56
2	ChCl 50 %	MLAT	38,03 ^b ± 0,00	38,89 ^b ± 0,47	0,98	24,23 ^b ± 0,40	41,62 ^a ± 0,37	0,58	41,62 ^a ± 0,37	0,58
3	ChCl 50 %	MCAP	21,96 ^e ± 1,37	36,32 ^{c,d} ± 0,12	0,60	28,29 ^b ± 1,41	36,10 ^b ± 0,37	0,78	36,10 ^b ± 0,37	0,78
4	ChCl 50 %	MLAU	15,43 ^g ± 1,31	36,43 ^{c,d} ± 0,04	0,42	13,41 ^c ± 1,50	35,62 ^b ± 0,23	0,38	35,62 ^b ± 0,23	0,38
5	ChCl 50 %	SDFA	29,07 ^d ± 0,06	7,94 ^e ± 0,37	3,66	26,47 ^b ± 0,14	2,70 ^c ± 0,22	9,78	2,70 ^c ± 0,22	9,78
6	Etanol 50 %	MAA	18,97 ^f ± 0,21	42,28 ^a ± 0,59	0,45	15,69 ^c ± 0,08	40,99 ^a ± 0,33	0,38	40,99 ^a ± 0,33	0,38
7	Etanol 50 %	MLAT	22,89 ^e ± 0,62	34,91 ^d ± 0,08	0,66	27,58 ^b ± 2,00	40,99 ^a ± 0,18	0,67	40,99 ^a ± 0,18	0,67
8	Etanol 50 %	MCAP	6,77 ^h ± 0,21	36,84 ^c ± 0,16	0,18	4,85 ^d ± 0,07	36,01 ^b ± 1,31	0,13	36,01 ^b ± 1,31	0,13
9	Etanol 50 %	MLAU	8,56 ^h ± 0,76	36,57 ^{c,d} ± 0,08	0,23	10,89 ^c ± 0,44	36,00 ^b ± 0,49	0,30	36,00 ^b ± 0,49	0,30
10	Etanol 50 %	SDFA	42,56 ^a ± 0,17	3,53 ^f ± 1,01	12,05	51,57 ^a ± 1,94	1,74 ^c ± 0,37	29,69	1,74 ^c ± 0,37	29,69

Nota. Os resultados estão expressos em valores médios das replicatas ± DP. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa de acordo com Teste de Tukey (p < 0,05). R_{DPPH} = razão de extração da atividade antioxidante pelo método DPPH.

Para a atividade antioxidante pelo método DPPH foi possível avaliar as fases de topo e fundo de todos os sistemas. Nesta análise, diferentemente do que ocorreu para o teor de CFT, observa-se que um maior número de sistemas apresentou valores de R_{DPPH} mais distantes de 1, ou seja, os compostos responsáveis pela atividade antioxidante nos extratos de grãos crus de café arábica particionaram preferencialmente para uma determinada fase.

Comparando os sistemas formados pelos HDES e os SDFA, nota-se que independentemente do extrato empregado os SDFA apresentaram os resultados de R_{DPPH} mais distantes de 1, indicando um ótimo desempenho na segregação dos compostos. Para ambos os extratos, no SDFA, houve uma maior afinidade dos compostos antioxidantes pela fase de topo, fase pobre em sal, e os maiores teores de atividade antioxidante foram observados para o SDFA obtido com o extrato a base de etanol 50 %.

Os sistemas contendo HDES que apresentaram os melhores desempenhos na ELL, considerando a razão de extração, foram os com o extrato a base de etanol 50 % e HDES MCAP e MLAU, onde houve uma maior afinidade pela fase hidrofílica. Dentre estes sistemas não houve diferença significativa em relação ao teor da atividade antioxidante encontrada. Assim como na análise do teor de CFT, os piores desempenhos, ainda considerando a razão de extração, foram novamente encontrados para os sistemas contendo os HDES MAA e MLAT, no entanto, para a análise de DPPH o extrato influenciou nos resultados, sendo que as razões de extração com os valores mais próximos a 1 foram observados nos sistemas que continham o extrato a base de ChCl 50 %.

Em relação aos diferentes tempos de decantação das fases, nota-se que os sistemas contendo extrato a base de ChCl 50 % e HDES MAA e MLAT apresentaram menores valores de R_{DPPH} para o tempo de 96 h e para o sistema contendo o mesmo extrato e o HDES MCAP o valor da razão de extração foi um pouco superior para o tempo de 96 h. No entanto, o perfil dos resultados permaneceu o mesmo nos diferentes tempos de decantação, apontando novamente que o período de 24 h seria suficiente para as condições de operação aplicadas.

Com o intuito de avaliar estatisticamente os resultados alcançados, aplicou-se a ANOVA para a fase de topo e fundo incluindo o tempo como um dos fatores estudados. Os resultados estão exibidos nas TABELAS 18 e 19.

TABELA 18 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH NA FASE DE TOPO DA ELL

Fatores	G.L.	Soma Quadrática	Quadrado Médio	Estat. F	p-valor
Solvente	4	2491,82	622,95	30,65	1,70E-8
Extrato	1	88,81	88,81	4,37	0,05
Tempo	1	63,33	63,33	3,11	0,09
Solvente:Extrato	3	1579,85	526,62	25,91	2,97E-7
Solvente:Tempo	4	294,81	73,70	3,63	0,02
Extrato:Tempo	1	49,97	49,97	2,46	0,13
Resíduos	21	426,84	20,32	-	-

TABELA 19 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH NA FASE DE FUNDO DA ELL

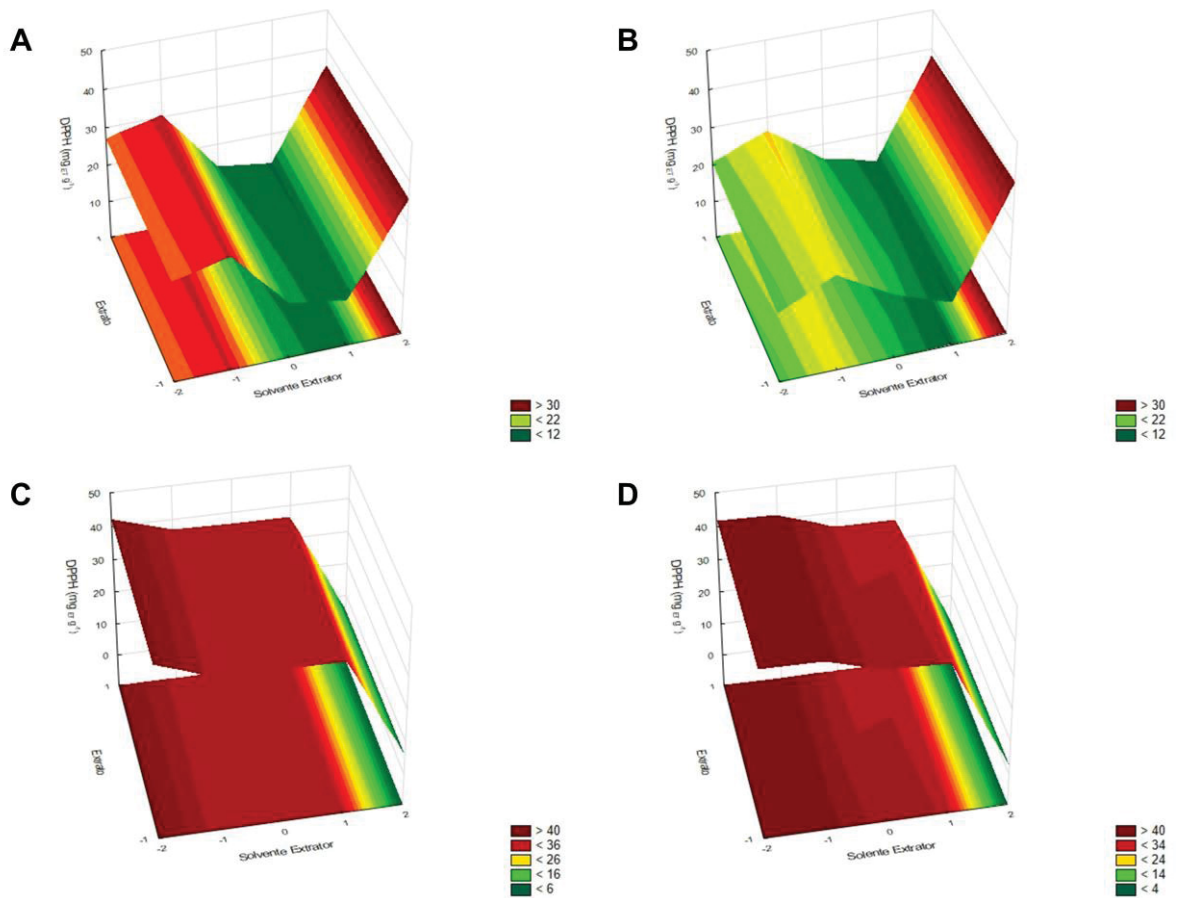
Fatores	G.L.	Soma Quadrática	Quadrado Médio	Estat. F	p-valor
Solvente	4	7764,35	1941,09	3396,93	1,17E-32
Extrato	1	10,88	10,88	19,05	2,09E-4
Tempo	1	0,76	0,76	1,32	0,26
Solvente:Extrato	4	14,61	3,65	6,39	1,19E-4
Solvente:Tempo	4	63,68	15,92	27,86	1,04E-8
Extrato:Tempo	1	3,54	3,54	6,19	0,02
Resíduos	24	13,71	0,57	-	-

Segundo a análise de variância, na fase de topo o fator independente que exerce influência no resultado é o tipo de solvente extrator, tendo que a interação deste fator com o tipo de extrato e o tempo também influenciaram no resultado, uma vez que em ambos os casos citados o p-valor obtido é inferior a 0,05.

Para a fase de fundo, exceto pelo fator independente tempo, que apresentou p-valor maior que 0,05, todos os outros fatores foram significativos. Este comportamento para a fase de topo e fundo já era esperado quando analisado e discutido o Teste de Tukey na TABELA 17.

Com o intuito de uma melhor compreensão dos resultados e visualização de como cada sistema atuou na avaliação da atividade antioxidante, fez-se o Gráfico de Superfície das fases de topo e fundo para os diferentes tempos de decantação, os quais estão apresentados na FIGURA 19.

FIGURA 19 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE DPPH OBTIDOS PARA A FASE DE TOPO E FUNDO NOS TEMPOS DE 24 E 96 HORAS



Nota. **A** e **B** são os gráficos da fase de topo no tempo de 24 e 96 horas, respectivamente. **C** e **D** são os gráficos da fase de fundo no tempo de extração de 24 e 96 horas, respectivamente. Os fatores estão representados nos gráficos por meio de seus valores codificados.

Novamente nota-se que os diferentes tempos não interferiram no perfil, nem demonstraram diferença significativa nos resultados alcançados. Outro fator que não se mostra tão relevante, comparado ao fator tipo de solvente extrator, é o tipo de extrato.

Observando os gráficos A e B, para o tempo de 24 h os resultados encontrados com os HDES MAA (-2) e MLAT (-1) foram mais expressivos quando comparados aos resultados no tempo de 96 h, uma vez que a cor avermelhada está mais presente no gráfico A (24 h). Isto ocorreu, pois a partição entre as fases é diferente nestes dois tempos, para o período de 96 h observou uma maior afinidade pela fase de fundo, logo o valor da atividade antioxidante da fase de topo tende a reduzir quando comparado ao resultado encontrado no tempo de 24 h.

Para a fase de fundo, diferente da fase de topo, os resultados foram mais elevados e homogêneos, exceto para o SDFA que apresentou resultados para a fase de fundo bem inferiores comparado aos demais sistemas. Observa-se este comportamento, visto que, nos sistemas contendo HDES os compostos que apresentam atividade antioxidante particionaram para a fase hidrofílica (fundo) e nos SDFA, para a fase pobre em sal (topo).

Avaliando os resultados, pode-se verificar uma elevada eficiência de extração dos antioxidantes pelos SDFA. Em um estudo realizado por Farias *et al.* (2020), com o mesmo SDFA aplicado neste trabalho, verificou-se que a cafeína particionou preferencialmente para a fase de topo, confirmando a capacidade seletiva deste sistema. Para os solventes hidrofóbicos, os sistemas com o extrato a base de etanol 50 % e HDES MCAP e MLAU também apresentaram resultados satisfatórios em relação à partição da atividade antioxidante.

Com o intuito de analisar diferentes mecanismos de ação antioxidante, realizou-se o método FRAP. Os resultados das fases de topo e fundo da ELL estão apresentados na TABELA 20, bem como o valor da razão de extração da atividade antioxidante pelo método FRAP.

TABELA 20 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP DAS FASES DE TOPO E FUNDO OBTIDA PELA EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO NOS TEMPOS DE 24 E 96 HORAS

Amostra	Variáveis explanatórias				FRAP (mg _{ET} g ⁻¹) 24 h		FRAP (mg _{ET} g ⁻¹) 96 h		R _{FRAP}
	Extrato	Solvente Extrator	Fase de Topo	Fase de Fundo	Fase de Topo	Fase de Fundo	Fase de Topo	Fase de Fundo	
1	ChCl 50 %	MAA	N/A	49,16 ^d ± 2,86	N/A	N/A	50,77 ^{c,d,e} ± 1,20	N/A	
2	ChCl 50 %	MLAT	12,28 ^c ± 0,15	37,49 ^e ± 3,21	0,33	15,52 ^{c,d} ± 0,89	40,75 ^e ± 0,20	0,38	
3	ChCl 50 %	MCAP	N/A	60,66 ^{b,c} ± 0,06	N/A	N/A	55,86 ^{b,c,d} ± 1,50	N/A	
4	ChCl 50 %	MLAU	N/A	46,07 ^d ± 3,26	N/A	N/A	45,42 ^{d,e} ± 3,05	N/A	
5	ChCl 50 %	SDFA	26,20 ^a ± 1,36	14,99 ^f ± 1,32	1,75	26,73 ^a ± 3,89	13,48 ^f ± 4,88	1,98	
6	Etanol 50 %	MAA	11,39 ^c ± 0,51	59,23 ^c ± 1,05	0,19	13,04 ^d ± 0,30	57,85 ^{b,c} ± 1,22	0,22	
7	Etanol 50 %	MLAT	19,43 ^b ± 3,85	43,05 ^{d,e} ± 1,30	0,45	24,04 ^{a,b} ± 0,83	40,13 ^e ± 0,12	0,60	
8	Etanol 50 %	MCAP	5,16 ^d ± 1,26	68,24 ^b ± 2,99	0,08	4,46 ^e ± 0,57	66,06 ^{a,b} ± 4,39	0,07	
9	Etanol 50 %	MLAU	N/A	78,16 ^a ± 0,12	N/A	N/A	70,95 ^a ± 2,47	N/A	
10	Etanol 50 %	SDFA	21,21 ^{a,b} ± 0,33	8,08 ^f ± 0,49	2,63	19,30 ^{b,c} ± 0,31	8,18 ^f ± 4,70	2,36	

Nota. Os resultados estão expressos em valores médios das replicatas ± DP. Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa de acordo com Teste de Tukey (p < 0,05). R_{FRAP} = razão de extração da atividade antioxidante pelo método FRAP.

Como pode-se observar, não foi possível obter o resultado para todas as amostras da fase de topo, principalmente para os sistemas contendo extrato a base de ChCl 50 %, pois durante o procedimento da análise da atividade antioxidante pelo método FRAP, as amostras turvaram ao adicionar os reagentes utilizados na metodologia empregada.

Os sistemas, os quais foram possíveis de analisar a fase de topo e fundo, apresentaram resultados satisfatórios para a ELL. Diferentemente das análises anteriores de CFT e DPPH, os sistemas obtidos pelo HDES MLAT apresentou bons resultados para ambos os extratos, com R_{FRAP} distantes de 1. Observou-se o particionamento dos antioxidantes para a fase de fundo nos sistemas contendo HDES e para a fase de topo nos SDFA, fases características pela sua hidrofiliidade mais elevada. Este comportamento se repetiu em todas as análises anteriores, CFT e DPPH, e já era esperado, visto que os principais compostos bioativos presentes nos grãos crus de café arábica, cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos, possuem caráter mais hidrofílico com $\log(K_{OW})$ de -0,55, -3,5 e -0,27, respectivamente.

Confrontando os resultados encontrados nas diferentes fases, tem-se que para a fase de topo os maiores valores de atividade antioxidante foram obtidos pelo SDFA, uma vez que os compostos apresentaram menor afinidade pela fase rica em sal. Para a fase de fundo obteve-se os maiores resultados para o sistema obtido a partir do extrato a base de etanol 50 % e HDES MLAU, seguido do sistema composto pelo mesmo extrato e HDES MCAP. Estes comportamentos foram observados para os dois tempos de decantação das fases, indicando que o resultado alcançado independe dos tempos avaliados.

Com o intuito de avaliar estatisticamente os resultados encontrados, aplicou-se a ANOVA para as fases de topo e fundo da ELL realizada.

TABELA 21 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP NA FASE DE TOPO DA ELL

Fatores	G.L.	Soma Quadrática	Quadrado Médio	Estat. F	p-valor
Solvente	3	1010,45	336,82	110,90	1,64E-9
Extrato	1	2,63	2,63	0,86	0,37
Tempo	1	9,17	9,17	3,02	0,37
Solvente:Extrato	1	197,35	197,35	64,98	2,06E-6
Solvente:Tempo	3	25,78	8,59	2,83	0,07
Extrato:Tempo	1	0,28	0,28	0,09	0,76
Resíduos	13	39,48	3,04	-	-

TABELA 22 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP NA FASE DE FUNDO DA ELL

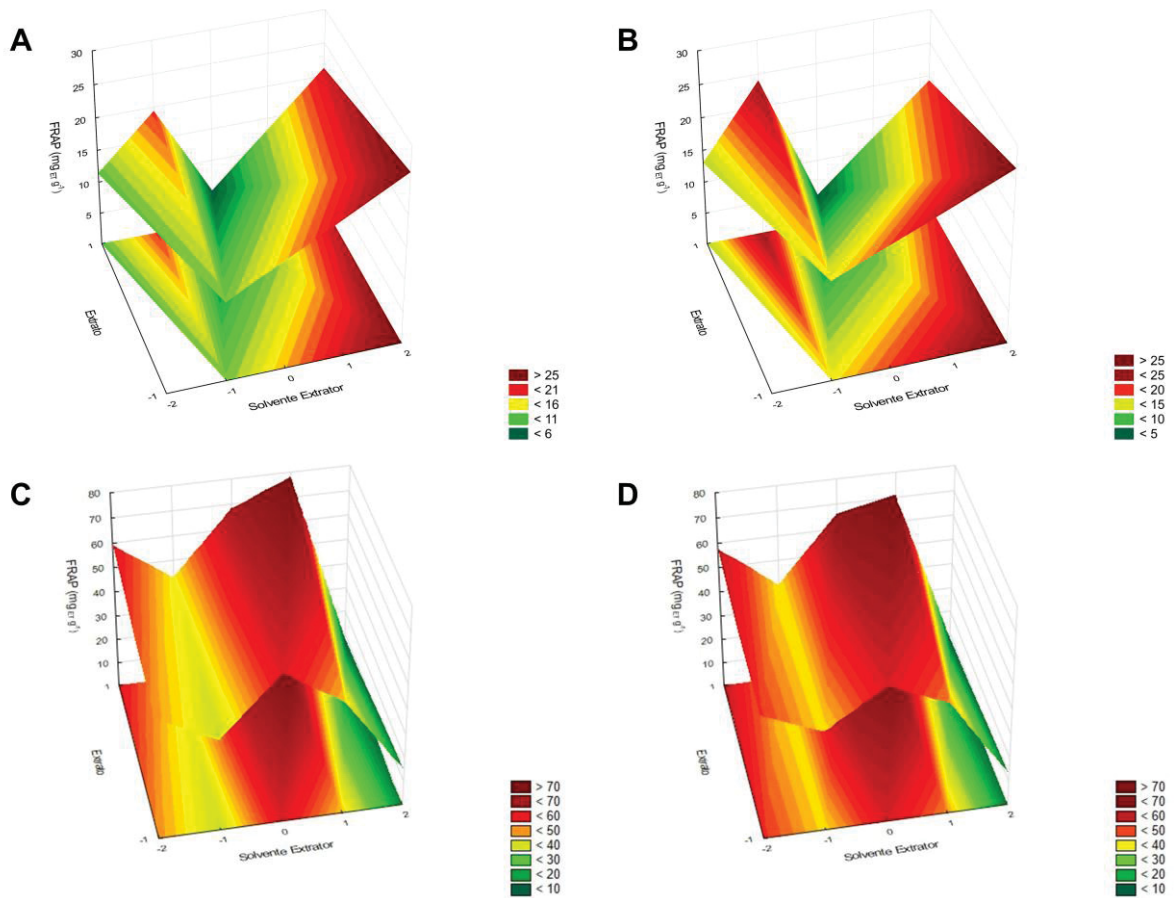
Fatores	G.L.	Soma Quadrática	Quadrado Médio	Estat. F	p-valor
Solvente	4	14329,06	3582,27	519,75	6,28E-23
Extrato	1	727,06	727,06	105,49	2,91E-10
Tempo	1	24,49	24,49	3,55	0,07
Solvente:Extrato	4	1324,63	331,16	48,05	4,09E-11
Solvente:Tempo	4	31,73	7,93	1,15	0,36
Extrato:Tempo	1	13,24	13,24	1,92	0,18
Resíduos	24	165,41	6,89	-	-

Observando os resultados apresentados pela ANOVA para a fase de topo, o fator solvente e a sua interação com o tipo de extrato são os únicos fatores que apresentam p-valor menor que 0,05, ou seja, de alguma forma interferem na busca pelos melhores parâmetros de extração. Pode-se observar isto com os resultados presentes na TABELA 20, visto que as amostras de topo, que foram passíveis de serem caracterizadas, seguiram o mesmo comportamento independente do tempo ou do tipo de extrato empregado.

Avaliando a ANOVA da fase de fundo, percebe-se que tanto o solvente extrator, quanto o tipo de extrato, bem como a interação destes dois fatores influenciaram no resultado (p-valor < 0,05). Isto pôde ser verificado tendo que o extrato a base de etanol 50 % apresentou valores mais elevados quando comparado aos sistemas contendo o mesmo HDES e extrato a base de ChCl 50 %.

Para facilitar na visualização dos resultados, montou-se o Gráfico de Superfície para as fases de topo e fundo nos diferentes tempos de extração, como está apresentado pela FIGURA 20.

FIGURA 20 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP OBTIDOS PARA A FASE DE TOPO E FUNDO NOS TEMPOS DE 24 E 96 HORAS



Nota. **A** e **B** são os gráficos da fase de topo no tempo de 24 e 96 horas, respectivamente. **C** e **D** são os gráficos da fase de fundo no tempo de extração de 24 e 96 horas, respectivamente. Os fatores estão representados nos gráficos por meio de seus valores codificados.

Assim como observado nos Gráficos de Superfície das análises anteriores, para ambos os tempos de extração o perfil dos resultados é o mesmo. Logo o tempo de 24 h é suficiente para alcançar o equilíbrio das fases.

Avaliando a fase de topo, os melhores resultados foram encontrados para o SDFA (2) seguido do HDES MLAT (-1) para o extrato a base de etanol 50 %. Nota-se que que o HDES MLAT (-1) apresentou resultados um pouco mais expressivos para o tempo de extração de 96 horas.

Analisando a fase de fundo, os melhores resultados foram obtidos para o DES hidrofóbico MCAP (0), seguido do HDES MLAU (1), ambos com o extrato a base de etanol 50 %. O HDES MAA (-2) também apresentou resultado elevado quando empregado com o extrato a base de etanol 50 %, entretanto, seu valor é um pouco inferior aos dois primeiramente citados, visto que, a cor do seu pico apresenta

um vermelho menos intenso. Já, os piores resultados foram apresentados pelo SDFA, assim como na avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH, este comportamento já era esperado o que confirma a afinidade dos antioxidantes pela fase pobre em sal K_2HPO_4 (fase de topo).

Avaliando os resultados estatísticos para a atividade antioxidante pelo método FRAP, os sistemas que apresentaram os melhores resultados foram os obtidos pelo extrato a base de etanol 50 % e HDES MCAP, seguido pelo sistema contendo o mesmo extrato e HDES MLAU.

Após o período de extração e decantação das fases, observou-se que todos os sistemas que continham solvente hidrofóbico apresentaram diferenças volumétricas entre as fases de topo e fundo, as quais inicialmente foram preparadas na proporção volumétrica de 50:50. As maiores diferenças foram apresentadas pelos sistemas que continham os HDES MAA e MLAT, sendo que para os sistemas com o extrato a base de $ChCl$ 50 % as diferenças volumétricas entre as fases de topo e fundo foram ainda mais pronunciadas com os sistemas contendo estes dois HDES.

Em um trabalho realizado por Florindo, Branco e Marrucho. (2017), foi avaliado a estabilidade de alguns HDES em água, entre eles os formados com mentol e ácido acético, caprílico e láurico. A metodologia aplicada para a verificação da estabilidade compreendia a análise dos espectros das fases por RMN H, apontando a estabilidade dos HDES MCAP e MLAU e não estabilidade do HDES MAA.

Isto indica que pode ter ocorrido uma quebra dos HDES quando colocados na presença dos extratos, por isso a diferença volumétrica entre as fases. Principalmente para os sistemas com HDES MAA e MLAT, o que também pode justificar os resultados similares entre as fases de topo e fundo observada nas caracterizações.

As caracterizações demonstraram que, apesar de terem diferentes capacidades de separação dos compostos, todos os sistemas empregados são capazes de realizá-lo, mostrando-se promissores para o estudo como substituintes dos solventes orgânicos convencionais. Entre os sistemas aplicados, destaca-se o desempenho dos HDES MCAP e MLAU, principalmente na presença do extrato a base de etanol 50 %, que além de apresentarem valores de razão de extração distantes de 1, indicando boa partição entre as fases, com preferência pela fase hidrofílica, demonstraram elevados valores de CFT e AA apontando capacidade de

conservação dos compostos bioativos presentes nos extratos de café cru.

PARTE III

Considerações Finais

Nesta parte serão apresentadas as conclusões, referências bibliográficas utilizadas, sugestões para trabalhos futuros e apêndice.

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

6.1 CONCLUSÕES

Na primeira etapa deste trabalho, tinha-se como objetivo obter o melhor extrato a ser aplicado na ELL. Para isso, os extratos foram caracterizados em relação à composição fenólica e atividade antioxidante. Verificou-se que os resultados se equipararam aos encontrados na literatura, destacando o café como uma fonte de compostos com elevada atividade antioxidante.

Dentre os solventes, o que apresentou os melhores resultados foi o etanol 50 %. Estabeleceu a temperatura de extração em 25 °C, este fator interferiu apenas na análise FRAP, no entanto, para o solvente etanol 50 % não se verificou diferença significativa quando comparada à temperatura de 40 °C, contudo aplicar uma temperatura mais baixa no processo, implica em menor gasto energético e menor risco de degradação dos biocompostos presentes na matriz. A razão 1:20 (m/v) foi empregada por apresentar o melhor desempenho para o solvente na temperatura escolhida. Na etapa de ELL também foi empregado um segundo extrato obtido a partir da solução aquosa de ChCl 50 % (m/m), a 65 °C e razão 1:20 (m/m), agitado durante 7,5 minutos no Ultra-Turrax, devido a resultados promissores alcançados em estudo paralelo no grupo de pesquisa, e com o intuito de comparar o potencial de extração entre solventes convencionais e solventes verdes.

Utilizando os dois extratos selecionados, a segunda etapa do trabalho tinha como objetivo avaliar a ELL empregando HDES. Desta forma, foi estudado a atuação de diferentes HDES como solventes extratores para a partição dos compostos bioativos presentes nos extratos dos grãos crus de café arábica. Sendo avaliado em relação à composição fenólica e atividade antioxidante nas fases de topo e fundo.

As variáveis estudadas no planejamento foram o tipo de extrato, selecionados na primeira etapa, e o solvente extrator, quatro HDES formados a partir de mentol e ácidos carboxílicos e um SDFA. O SDFA foi adicionado ao estudo com o intuito de confrontar os resultados encontrados para os sistemas hidrofóbicos com um sistema hidrofílico. Fixou-se a temperatura de extração em 25 °C e o tempo de mistura entre as fases de 1 min em vórtex.

Verificou-se que todos os sistemas foram capazes de desempenhar o papel de separar os biocompostos presentes nos extratos dos grãos crus de café arábica. Observou-se que houve uma maior afinidade dos compostos fenólicos e dos antioxidantes pelas fases que apresentaram maior hidrofiliabilidade, fase de fundo nos sistemas com HDES e fase de topo para o SDFA. Isto ocorreu, pois os principais compostos bioativos presentes no café arábica possuem caráter mais hidrofílico.

Confrontando os resultados encontrados entre os diferentes solventes extratores, percebeu-se que os HDES formados com ácidos acético e ácido láctico apresentaram teores de CFT e AA semelhantes entre as fases de topo e fundo. Ou seja, apesar de não inviabilizar o processo, não apresentaram desempenho satisfatórios na ELL. Por outro lado, os SDFA e os sistemas formados com HDES de ácidos caprílico e láurico apresentaram bons resultados, tendo que os maiores valores das análises foram observados para os sistemas formados com os HDES.

Quando avaliado os resultados em relação ao tipo de extrato, tem-se que os sistemas formados com o extrato a base de etanol 50 % apresentou os maiores resultados em todas as análises de caracterização. Além disso, durante o processo analisou-se diferentes tempos de decantação das fases, 24 e 96 h, com o intuito de garantir o equilíbrio das fases nas condições de operação aplicadas. No entanto, não houve diferença significativa entre estes períodos apontando que o tempo de 24 h é suficiente para que o equilíbrio seja alcançado.

Também houve uma dificuldade para se avaliar a fase de fundo dos SDFA na análise de CFT e a fase de topo (hidrofóbica), principalmente dos extratos a base de cloreto de colina, para a metodologia FRAP, mostrando a necessidade da busca de uma metodologia que melhor se adeque às características destes sistemas.

Após avaliação estatística em torno destes resultados, infere-se que os solventes eutéticos profundos que apresentam maior potencial de aplicação na separação dos compostos bioativos dos extratos dos grãos crus de café arábica é o MCAP e MLAU, tendo que os melhores resultados foram alcançados aplicando o extrato obtido com etanol 50 %.

Neste trabalho, obteve-se resultados promissores na aplicabilidade dos DES hidrofóbicos para a partição de biomoléculas presentes nos extratos de grãos crus de café arábica. A possibilidade da formação dos DES hidrofóbicos com ácidos carboxílicos de cadeias carbônicas de diferentes tamanhos se mostra como um ponto favorável do emprego deste solvente, o qual tem a capacidade de se moldar

conforme o interesse da aplicação. No entanto, para trabalhos futuros, sugere-se que fatores como tempo de extração e proporção entre extrato e solvente extrator sejam analisados com o intuito de melhor avaliar a partição, a seletividade e a eficiência de extração dos sistemas.

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Após todo o estudo realizado ainda restam alguns pontos que podem ser trabalhados futuramente para um melhor entendimento dos sistemas empregados na etapa de ELL. Faz-se interessante caracterizar as fases obtidas por cromatografia com o intuito de verificar de qual forma os compostos bioativos como a cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos realmente se comportam dentro dos sistemas. Quanto ao processo de ELL, sugere-se verificar outros potenciais fatores que interfiram na extração, como a temperatura de operação, tempo de extração e a proporção entre o extrato e o solvente extrator. Ainda em relação ao processo, para melhor avaliar a capacidade de extração dos DES hidrofóbicos nestes sistemas, é válido realizar extrações em múltiplos estágios, aplicando sempre uma nova solução do DES hidrofóbico para verificar o quanto é possível segregar os biocompostos aplicando este solvente verde.

Este trabalho ainda abre espaço para o estudo da estabilidade dos DES hidrofóbicos na presença de meios aquosos, com o intuito de certificar se houve ou não a quebra dos solventes eutéticos profundos hidrofóbicos e como isto interfere no processo de extração.

CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS E APÊNDICES

REFERÊNCIAS

ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications**, , n. 1, p. 70–71, 2003.

ABOLGHASEMI, M. M.; PIRYAEI, M.; IMANI, R. M. Deep eutectic solvents as extraction phase in head-space single-drop microextraction for determination of pesticides in fruit juice and vegetable samples. **Microchemical Journal**, v. 158, n. December 2019, p. 105041, 2020. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105041>>.

ABRAHAM, M. H.; ZISSIMOS, A. M.; HUDDLESTON, J. G.; et al. Some novel liquid partitioning systems: Water-ionic liquids and aqueous biphasic systems. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 42, n. 3, p. 413–418, 2003.

ABRAHÃO, S. A.; GUALBERTO, R.; ALVARENGA, F.; LIMA, A. R. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, n. 1, p. 1799–1804, 2008.

AGÊNCIA BRASIL. Pandemia mudou consumo de café, dizem especialistas do setor. 2021. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2021-11/pandemia-mudou-consumo-de-cafe-dizem-especialistas-do-setor>>. Acesso em: 25 nov 2021.

ALBERTSSON, P. Å. Partition of Proteins in Liquid Polymer-Polymer Two-Phase Systems. **Nature**, v. 182, p. 709–711, 1958.

ALBERTSSON, P. Å.; CAJARVILLE, A.; BROOKS, D. E.; TJERNELD, F. Partition of proteins in aqueous polymer two-phase systems and the effect of molecular weight of the polymer. **BBA - General Subjects**, v. 926, n. 1, p. 87–93, 1987.

ALSAUD, N.; SHAHBAZ, K.; FARID, M. Evaluation of deep eutectic solvents in the extraction of β -caryophyllene from New Zealand Manuka leaves (*Leptospermum scoparium*). **Chemical Engineering Research and Design**, v. 166, p. 97–108, 2021.

ASHIHARA, H. Metabolism of alkaloids in coffee plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2006.

ASHIHARA, H. **Plant Biochemistry: Trigonelline Biosynthesis in *Coffea arabica* and *Coffea canephora***. Elsevier Inc., 2015.

ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Caffeine: A well known but little mentioned compound in plant science. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 9, p. 407–413, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. A Expansão do café no Brasil. 2007. Disponível em: <<https://www.abic.com.br/o-cafe/historia/a-expansao-do->

cafe-no-brasil/>. Acesso em: 13 jul. 2020.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>>.

BABOVA, O.; OCCHIPINTI, A.; MAFFEI, M. E. Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. **Phytochemistry**, v. 123, p. 33–39, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.01.016>>.

BAKIRTZI, C.; TRIANTAFYLLIDOU, 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, n. 3, p. 120–127, 2016. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.03.003>>.

BARBOSA, M. DE S. G.; SCHOLZ, M. B. DOS S.; KITZBERGER, C. S. G.; BENASSI, M. DE T. Correlation between the composition of green Arabica coffee beans and the sensory quality of coffee brews. **Food Chemistry**, v. 292, n. April, p. 275–280, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.072>>.

BASTOS DE MARIA, C. A.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586–592, 2004.

BEE, S.; BRANDO, C. H. J.; BRUMEN, G.; CARVALHAES, N.; KÖLLING-SPEER, I.; SPEER, K.; LIVERANI, F.S.; TEIXEIRA, A. A.; TEIXEIRA, R.; THOMAZIELLO, R. A.; VIANI, R.; VITZTHUM, O. G.. Espresso Coffee: The Science of Quality; ILLY, A.; VIANI, R., 2 ed; Elsevier's Science: Oxford, UK, 2005, pp. 87 – 140.

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

BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. **Affinity ATPS Strategies for the Selective Fractionation of Biomolecules**. 2017.

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

BESSADA, S. M. F.; ALVES, R. C.; COSTA, A. S. G.; NUNES, M. A.; OLIVEIRA, M. B. P. P. *Coffea canephora* silverskin from different geographical origins: A comparative study. **Science of the Total Environment**, v. 645, p. 1021–1028, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.201>>.

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

CAGLIANI, L. R.; PELLEGRINO, G.; GIUGNO, G.; CONSONNI, R. Quantification of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* var. *robusta* in roasted and ground coffee blends. **Talanta**, v. 106, p. 169–173, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.003>>.

CANO-MARQUINA, A.; TARÍN, J. J.; CANO, A. The impact of coffee on health. **Maturitas**, v. 75, n. 1, p. 7–21, 2013. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.02.002>>.

CAO, J., CHEN, L., LI, M., CAO, F., ZHAO, L., SU, E., 2018. Two-phase systems developed with hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents for simultaneously extracting various bioactive compounds with different polarities. **Green Chem.** 20, 1879–1886. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C7GC03820H>>

CAO, J.; SU, E. Hydrophobic deep eutectic solvents: the new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry. **Journal of Cleaner Production**, v. 314, n. June, 2021.

CAO, J., YANG, M., CAO, F., WANG, J., SU, E., 2017. Tailor-made hydrophobic deep eutectic solvents for cleaner extraction of polyphenyl acetates from ginkgo biloba leaves. **J. Clean. Prod.** 152, 399–405. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcpro.2017.08.005>>.

CARRIERI, M. P.; PROTOPOPESCU, C.; MARCELLIN, F.; et al. Protective effect of coffee consumption on all-cause mortality of French HIV-HCV co-infected patients. **Journal of Hepatology**, v. 67, n. 6, p. 1157–1167, 2017. European Association for the Study of the Liver. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.08.005>>.

CHENG, B.; FURTADO, A.; SMYTH, H. E.; HENRY, R. J. Influence of genotype and environment on coffee quality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 57, p. 20–30, 2016.

CHENG, K.; DONG, W.; LONG, Y.; et al. Evaluation of the impact of different drying methods on the phenolic compounds, antioxidant activity, and in vitro digestion of green coffee beans. **Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 3, p. 1084–1095, 2019.

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. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.058>>.

DAI, Y.; VAN SPRONSEN, J.; 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. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>>.

DWAMENA, A. K. Recent advances in hydrophobic deep eutectic solvents for extraction. **Separations**, v. 6, n. 1, 2019.

DZIKI, D.; GAWLIK-DZIKI, U.; PECIO, Ł.; et al. Ground green coffee beans as a functional food supplement - Preliminary study. **Lwt**, v. 63, n. 1, p. 691–699, 2015.

EQUIPE ESTATCAMP (2014). Software Action. Estatcamp- Consultoria em estatística e qualidade, São Carlos - SP, Brasil. URL: <http://www.portalaction.com.br/>

EMBRAPA. Consumo mundial de café deverá atingir 167 milhões de sacas de 60 kg. 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/64841382/consumo-mundial-de-cafe-devera-atingir-167-milhoes-de-sacas-de-60kg>>. Acesso em: 25 nov 2021.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 488–495, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>>.

FACCHIN, I.; PASQUINI, C. Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 60–68, 1998.

FAN, X. H.; WANG, L. T.; CHANG, Y. H.; et al. Application of green and recyclable menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents aqueous for the extraction of main taxanes from *Taxus chinensis* needles. **Journal of Molecular Liquids**, v. 326, 2021.

FANALI, C.; DELLA POSTA, S.; DUGO, L.; et al. Choline-chloride and betaine-based deep eutectic solvents for green extraction of nutraceutical compounds from spent coffee ground. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 189, n. April, p. 113421, 2020. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113421>>.

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

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.

FARAH, A.; DE PAULIS, T.; TRUGO, L. C.; MARTIN, P. R. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1505–1513, 2005.

FARIAS, F. O.; PASSOS, H.; COUTINHO, J. A. P.; MAFRA, M. R. PH Effect on the Formation of Deep-Eutectic-Solvent-Based Aqueous Two-Phase Systems. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 57, n. 49, p. 16917–16924, 2018.

FARIAS, F. O.; PEREIRA, J. F. B.; COUTINHO, J. A. P.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Understanding the role of the hydrogen bond donor of the deep eutectic solvents in the formation of the aqueous biphasic systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 503, 2020.

FARIAS, F. O.; SOSA, F. H. B.; IGARASHI-MAFRA, L.; COUTINHO, J. A. P.; MAFRA, M. R. Study of the pseudo-ternary aqueous two-phase systems of deep eutectic solvent (choline chloride:sugars) + K₂HPO₄ + water. **Fluid Phase Equilibria**, v. 448, p. 143–151, 2017.

FLORINDO, C.; BRANCO, L. C.; MARRUCHO, I. M. Development of hydrophobic deep eutectic solvents for extraction of pesticides from aqueous environments. **Fluid Phase Equilibria**, v. 448, p. 135–142, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fluid.2017.04.002>>.

FLORINDO, C.; BRANCO, L. C.; MARRUCHO, I. M. Quest for Green-Solvent Design: From Hydrophilic to Hydrophobic (Deep) Eutectic Solvents. **ChemSusChem**, v. 12, n. 8, p. 1549–1559, 2019.

FLORINDO, C.; MONTEIRO, N. V.; RIBEIRO, B. D.; BRANCO, L. C.; MARRUCHO, I. M. Hydrophobic deep eutectic solvents for purification of water contaminated with Bisphenol-A. **Journal of Molecular Liquids**, v. 297, p. 111841, 2020. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111841>>.

GARCÍA, G.; APARICIO, S.; ULLAH, R.; ATILHAN, M. Deep eutectic solvents: Physicochemical properties and gas separation applications. **Energy and Fuels**, v. 29, n. 4, p. 2616–2644, 2015.

GE, D.; ZHANG, Y. D.; YANG, S. Air-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on a new hydrophobic deep eutectic solvent for the preconcentration of benzophenone-type UV filters from aqueous samples. **Journal of Separation Science**, p. 1–32, 2017.

GOUTHAMCHANDRA, K.; SUDEEP, H. V.; VENKATESH, B. J.; SHYAM PRASAD, K. Chlorogenic acid complex (CGA7), standardized extract from green coffee beans exerts anticancer effects against cultured human colon cancer HCT-116 cells. **Food Science and Human Wellness**, v. 6, n. 3, p. 147–153, 2017. Beijing Academy of Food Sciences. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.06.001>>.

HATTI-KAUL, R. Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols (Methods in Biotechnology), 1st ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2000.

HATZOLD, T.; Coffee. Emerging Health Effects and Disease Prevention; Chu, Y. F., ed.; John Wiley & Sons: Oxford, UK, 2012, pp. 1-20.

HU, G. L.; WANG, X.; ZHANG, L.; QIU, M. H. The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee. **Food and Function**, v. 10, n. 6, p. 3113–3126, 2019.

HUDDLESTON, J. G.; WILLAUER, H. D.; BOAZ, K. R.; ROGERS, R. D. Separation and recovery of food coloring dyes using aqueous biphasic extraction chromatographic resins. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 711, n. 1–2, p. 237–244, 1998b.

HUDDLESTON, J. G.; WILLAUER, H. D.; SWATLOSKI, R. P.; VISSER, A. E.; ROGERS, R. D. Room temperature ionic liquids as novel media for “clean” liquid-

liquid extraction. **Chemical Communications**, , n. 16, p. 1765–1766, 1998a.

JESZKA-SKOWRON, M.; FRANKOWSKI, R.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A. Comparison of methylxantines, trigonelline, nicotinic acid and nicotinamide contents in brews of green and processed Arabica and Robusta coffee beans – Influence of steaming, decaffeination and roasting processes on coffee beans. **Lwt**, v. 125, n. September 2019, 2020.

JI, Y.; ZHAO, M.; LI, A.; ZHAO, L. Hydrophobic deep eutectic solvent-based ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of trace cadmium and arsenic in wine samples. **Microchemical Journal**, v. 164, n. November 2020, p. 1–7, 2021.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328–2375, 2013.

KŘÍŽEK, T.; BURSOVÁ, M.; HORSLEY, R.; et al. Menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Towards greener and efficient extraction of phytocannabinoids. **Journal of Cleaner Production**, v. 193, p. 391–396, 2018.

LEMOS, M. F.; PEREZ, C.; DA CUNHA, P. H. P.; et al. Chemical and sensory profile of new genotypes of Brazilian *Coffea canephora*. **Food Chemistry**, v. 310, n. July 2019, 2020.

Li, G., Row, K.H., 2020. Air assisted dispersive liquid–liquid microextraction (aa-dllme) using hydrophilic–hydrophobic deep eutectic solvents for the isolation of monosaccharides and amino acids from kelp. *Anal. Lett.* 53, 188–202. Disponível em: <<http://doi.org/10.1080/00032719.2019.1643358>>.

LIMA, A. R.; GUALBERTO, R.; ALVARENGA, F.; et al. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 20–24, 2010.

LIU, R. H. Nutritional health: Strategies for disease prevention: Third edition. **Nutritional Health: Strategies for Disease Prevention: Third Edition**, p. 293–310, 2012.

LIYANA-PATHIRANA, C. M.; SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C. Antioxidant activity of cherry laurel fruit (*Laurocerasus officinalis* Roem.) and its concentrated juice. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 121–128, 2006.

MA, C.; LAAKSONEN, A.; LIU, C.; LU, X.; JI, X. The peculiar effect of water on ionic liquids and deep eutectic solvents. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 23, p. 8685–8720, 2018. Royal Society of Chemistry.

MACHEINER, L.; SCHMIDT, A.; SCHREINER, M.; MAYER, H. K. Green coffee infusion as a source of caffeine and chlorogenic acid. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 84, n. April, p. 103307, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103307>>.

MALAEKE, H.; HOUSAINDOKHT, M. R.; MONHEMI, H.; IZADYAR, M. Deep eutectic solvent as an efficient molecular liquid for lignin solubilization and wood delignification. **Journal of Molecular Liquids**, v. 263, p. 193–199, 2018.

MARINHO, M. R. M.; CASTRO, W. B. DE. PLANEJAMENTO FATORIAL : UMA FERRAMENTA PODEROSA PARA OS PESQUISADORES. **XXXIII - Congresso Brasileiro de Ensino de Engenharia**, p. 1–9, 2005.

MARTINS, A. L.. História do Café. 2 ed. São Paulo: Editora Contexto, 2012, p. 318
MARTINS, M. A. R.; PINHO, S. P.; COUTINHO, J. A. P. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. *Journal of Solution Chemistry*, v. 48, n. 7, p. 962–982, 2019.

MARTINS, M. A. R.; PINHO, S. P.; COUTINHO, J. A. P. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. **Journal of Solution Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 962–982, 2019.

MARTINS, M. Q.; PARTELLI, F. L.; GOLYNSKI, A.; et al. Adaptability and stability of *Coffea canephora* genotypes cultivated at high altitude and subjected to low temperature during the winter. **Scientia Horticulturae**, v. 252, n. July 2018, p. 238–242, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.044>>.

MEJIA, E. G.; RAMIREZ-MARES, M. V. Impact of caffeine and coffee on our health. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 25, n. 10, p. 489–492, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2014.07.003>>.

MEIRELES, M. Angela A. Extracting bioactive compounds for foods product: theory and applications. CRC press, 2009.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH- assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036–1043, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>>.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 637–641, 2005.

MONTGOMERY, D. C.; Design and Analysis of Experiments, 3rd ed., John Wiley: New York, 1991.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; BASTOS DE MARIA, C. A. Componentes voláteis do café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 195–203, 2000.

NARITA, Y.; INOUYE, K. **Chlorogenic Acids from Coffee**. Elsevier Inc., 2015.

NAVEED, M.; HEJAZI, V.; ABBAS, M.; et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, n. October 2017, p. 67–74, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>>.

NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **COMO FAZER EXPERIMENTOS: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 1º ed. Campinas, 2001.

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, n. 2, p. 296–299, 2003.

OLIVEIRA, É. R.; SILVA, R. F.; SANTOS, P. R.; QUEIROZ, F. Potential of alternative solvents to extract biologically active compounds from green coffee beans and its residue from the oil industry. **Food and Bioproducts Processing**, v. 115, p. 47–58, 2019. Institution of Chemical Engineers. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.02.005>>.

OLIVEIRA, G.; MARQUES, C.; DE OLIVEIRA, A.; et al. Extraction of bioactive compounds from *Curcuma longa* L. using deep eutectic solvents: In vitro and in vivo biological activities. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 70, n. December 2020, 2021.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. Coffee Development Report 2019. **United Nations, New York and Geneva**, p. 1–84, 2019. Disponível em: <http://scholar.google.co.za/scholar?hl=en&q=UNCTAD+trade+and+development+report&btnG=&as_sdt=1,5&as_sdtp=#1>.

OVIEDO, M. N.; FIORENTINI, E. F.; LLAYER, M.; WUILLOUD, R. G. Alternative solvent systems for extraction and preconcentration of trace elements. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 137, 2021.

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

PERDANI, C. G.; PRANOWO, D.; QONITATILAH. Total phenols content of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) in East Java. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 230, n. 1, p. 6–11, 2019.

PENDERGRAST, M. *Uncommon Grounds: The History of Coffee and How It Transformed Our World*. 2 ed. Nova York: Basic Books, 2010.

PERRY, R.H; GREEN, D. *Perry's Chemical Engineering Handbook*, 6 ed, 1984.

PRUVOT-WOEHL, S.; KRISHNAN, S.; SOLANO, W.; et al. Authentication of *Coffea arabica* Varieties through DNA Fingerprinting and its Significance for the Coffee Sector. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 103, n. 2, p. 325–334, 2020.

REVISTA CAFEICULTORES. **História do Café – A Importância Sócio-Econômica**. 2006. Disponível em: <<http://revistacafeicultura.com.br/?mat=5548>> Acesso em: 13 jul. 2020.

RIBEIRO, B. D.; FLORINDO, C.; IFF, L. C.; COELHO, M. A. Z.; MARRUCHO, I. M. Menthol-based eutectic mixtures: Hydrophobic low viscosity solvents. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 3, n. 10, p. 2469–2477, 2015.

ROGERS, R. D.; BOND, A. H.; BAUER, C. B.; ZHANG, J.; GRIFFIN, S. T. Metal ion separations in polyethylene glycol-based aqueous biphasic systems: Correlation of partitioning behavior with available thermodynamic hydration data. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 680, n. 1–2, p. 221–229, 1996.

ROGERS, R. D.; WILLAUER, H. D.; GRIFFIN, S. T.; HUDDLESTON, J. G. Partitioning of small organic molecules in aqueous biphasic systems. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 711, n. 1–2, p. 255–263, 1998.

RONKO, L. Z. Extração de compostos bioativos de grãos de café crus empregando solventes verdes. 2021. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2021.

SANTANA-GÁLVEZ, J.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A. Chlorogenic Acid: Recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 7–9, 2017.

SANTOS-SÁNCHEZ, Norma Francenia et al. **Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism**. London, UK: IntechOpen, 2019.

ŞEMEN, S.; MERCAN, S.; YAYLA, M.; AÇIKKOL, M. Elemental composition of green coffee and its contribution to dietary intake. **Food Chemistry**, v. 215, p. 92–100, 2017.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757–781, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>>.

SHLONSKY, A. K.; KLATSKY, A. L.; ARMSTRONG, M. A. Traits of persons who drink decaffeinated coffee. **Annals of Epidemiology**, v. 13, n. 4, p. 273–279, 2003.

SILVA, C. R. DA; SANT'ANNA, A. P. Uma aplicação do planejamento de experimentos na indústria farmacêutica. **Sistemas & Gestão**, v. 2, n. 3, p. 274–284, 2007.

SILVA, Y.P.A., FERREIRA, T.A.P.C., JIAO, G., BROOKS, M.S., 2019c. Sustainable approach for lycopene extraction from tomato processing by-product using hydrophobic eutectic solvents. *J. Food Sci. Technol.* 56, 1649–1654. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03618-8>>.

SILVESTRE, C. I. C.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C.; ZAGATTO, E. A. G. Liquid-liquid extraction in flow analysis: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, n. 1–2, p. 54–65, 2009.

SMITH, E. L.; ABBOTT, A. P.; RYDER, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 11060–11082, 2014.

SMITH, R. F.. Coffee: Botany, Biochemistry and Production os Beans and Beverage; Clifford, M. N.; Willson, K. C.; ed.; **THE AVI PUBLISHING COMPANY**, ICN: Westport, Connecticut, 1985, pp. 1 - 13.

SOLTANI, S.; SERESHTI, H.; NOURI, N. Deep eutectic solvent-based clean-up/vortex-assisted emulsification liquid-liquid microextraction: Application for multi-residue analysis of 16 pesticides in olive oils. **Talanta**, v. 225, n. September 2020, 2021.

SOSA-HERNÁNDEZ, J. E.; ESCOBEDO-AVELLANEDA, Z.; IQBAL, H. M. N.; WELTI-CHANES, J. State-of-the-art extraction methodologies for bioactive compounds from algal biome to meet bio-economy challenges and opportunities. **Molecules**, v. 23, n. 11, 2018.

STEFANELLO, N.; SPANEVELLO, R. M.; PASSAMONTI, S.; et al. Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 123, n. September 2018, p. 298–313, 2019.

STELMACH, E.; POHL, P.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A. The content of Ca, Cu, Fe, Mg and Mn and antioxidant activity of green coffee brews. **Food Chemistry**, v. 182, p. 302–308, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.105>>.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L. C. Effect of decaffeination using dichloromethane on the chemical composition of arabica and robusta raw and roasted coffees. **Quimica Nova**, v. 29, n. 5, p. 965–971, 2006.

TOLEDO, M. O.; FARIAS, F. O.; IGARASHI-MAFRA, L.; MAFRA, M. R. Salt Effect on Ethanol-Based Aqueous Biphasic Systems Applied to Alkaloids Partition: An Experimental and Theoretical Approach. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 64, n. 5, p. 2018–2026, 2019. research-article, American Chemical Society.

TRIPETCH, P.; BOROMPICHAICHARTKUL, C. Effect of packaging materials and storage time on changes of colour, phenolic content, chlorogenic acid and antioxidant activity in arabica green coffee beans (*Coffea arabica* L. cv. Catimor). **Journal of Stored Products Research**, v. 84, p. 101510, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jspr.2019.101510>>.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. Chlorogenic Acid Composition of Instant Coffees. **ANALYST**, v. 109, n. March, p. 263–266, 1984.

TZIA, C.; LIADAKIS, G. Extraction optimization in food engineering. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003.

VANDA, H.; DAI, Y.; WILSON, E. G.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. **Comptes Rendus Chimie**, v. 21, n. 6, p. 628–638, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.04.002>>.

VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, M.; FERNÁNDEZ-PRIOR, Á.; BERMÚDEZ ORIA, A.; et al. Utilization of strawberry and raspberry waste for the extraction of bioactive compounds by deep eutectic solvents. **Lwt**, v. 130, p. 109645, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109645>>.

VENTURA, S. P. M.; E SILVA, F. A.; QUENTAL, M. V.; et al. Ionic-Liquid-Mediated Extraction and Separation Processes for Bioactive Compounds: Past, Present, and Future Trends. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 10, p. 6984–7052, 2017.

VOLSI, B.; TELLES, T. S.; CALDARELLI, C. E.; DA CAMARA, M. R. G. The dynamics of coffee production in Brazil. **PLoS ONE**, v. 14, n. 7, p. 1–15, 2019.

WAGEMAKER, T. A. L.; CARVALHO, C. R. L.; MAIA, N. B.; BAGGIO, S. R.; GUERREIRO FILHO, O. Sun protection factor, content and composition of lipid fraction of green coffee beans. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 469–473, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.026>>.

WANDERLEY, A. B.; CAMPESATTO, E. A.; PORTO, I. C. C. DE M.; et al. Functional Benefits of Green Coffee in Metabolic Syndrome Prevention: A Review Study. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 9, p. 5–12, 2017. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/5eba/2d953d8d5aff60ba3966e339c085a188e041.pdf>>.

WELDEGEBREAL, B.; REDI-ABSHIRO, M.; CHANDRAVANSI, B. S. Development of new analytical methods for the determination of caffeine content in aqueous solution of green coffee beans. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2017. Springer International Publishing. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13065-017-0356-3>>.

XU, K.; XU, P.; WANG, Y. Aqueous biphasic systems formed by hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents for the partitioning of dyes. **Talanta**, v. 213, p. 120839, 2020. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120839>>.

YISAK, H.; REDI-ABSHIRO, M.; CHANDRAVANSI, B. S. Selective determination of caffeine and trigonelline in aqueous extract of green coffee beans by FT-MIR-ATR spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 97, n. May, p. 33–38, 2018.

ZAINAL-ABIDIN, M. H.; HAYYAN, M.; WONG, W. F. Hydrophobic deep eutectic solvents: Current progress and future directions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 97, p. 142–162, 2021.

ZENG, Q.; WANG, Y.; HUANG, Y.; et al. Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning. **Analyst**, v. 139, n. 10, p. 2565–2573, 2014.

ZEVIANI, W. M.; MAYER, F. P.. Controle de Processos Industriais. Notas de aulas. Disponível em: <<http://web.leg.ufpr.br/ensino/CPI/apostila/index.html>>. Acesso em: 17 dez 2021.

ZHANG, J.; WANG, Y.; STEVENS, G. W.; FEI, W. A state-of-the-art review on single drop study in liquid–liquid extraction: Experiments and simulations. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 12, p. 2857–2875, 2019. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cjche.2019.03.025>>.

ZHANG, Q.; DE OLIVEIRA VIGIER, K.; ROYER, S.; JÉRÔME, F. Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 21, p. 7108–7146, 2012.

APÊNDICE 1 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO E EFEITO MATRIZ

Para o cálculo do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante foi necessária a construção de curvas de calibração, as quais estão apresentadas a seguir. Estas foram feitas utilizando água e etanol com a intenção de verificar a ocorrência de interferência na leitura espectrofotométrica devido ao uso de diferentes solventes para as amostras hidrofílicas e hidrofóbicas.

Na TABELA 23 está apresentado os resultados de absorvância das soluções-padrão de ácido gálico utilizando água e etanol.

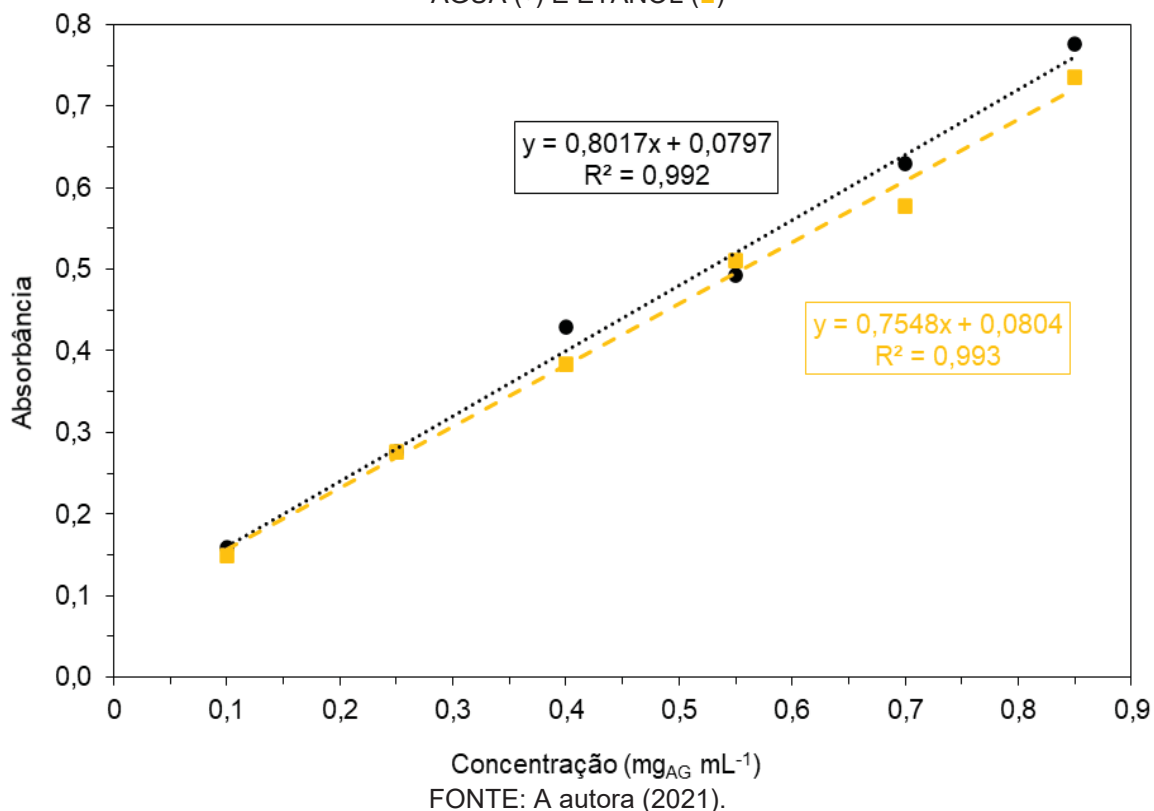
TABELA 23 – DADOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO PARA A ANÁLISE DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Concentração (mg _{AG} mL ⁻¹)	Abs ₁		Abs ₂		Abs ₃		Abs _{média}	
	Água	Etanol	Água	Etanol	Água	Etanol	Água	Etanol
0,85	0,794	0,668	0,807	0,791	0,727	0,748	0,776	0,736
0,70	0,638	0,540	0,703	0,611	0,547	0,581	0,629	0,577
0,55	0,514	0,472	0,503	0,515	0,463	0,547	0,493	0,511
0,40	0,414	0,353	0,433	0,383	0,441	0,414	0,429	0,383
0,25	0,239	0,263	0,308	0,280	0,281	0,286	0,276	0,276
0,10	0,168	0,141	0,155	0,150	0,154	0,157	0,159	0,149

FONTE: A autora (2021).

Em posse dos valores de concentração e absorvância das soluções-padrão, construiu-se as curvas de calibração do ácido gálico para a análise de compostos fenólicos totais empregando água e etanol (FIGURA 21).

FIGURA 21 – COMPARATIVO ENTRE AS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO COM ÁGUA (●) E ETANOL (■)



Observa-se que as curvas apresentaram boa linearidade e o ponto da água na concentração de $0,25 \text{ mg}_{\text{AG}} \text{ mL}^{-1}$ foi sobreposto pelo ponto do etanol na mesma concentração, por isso não aparece. Para avaliar se há algum comprometimento na leitura espectrofotométrica da amostra caso ela seja diluída com água ou etanol, foi aplicado o teste-t de Student com nível de significância (α) de 0,05. Este é um teste de hipótese que possibilita a comparação da média entre duas amostras presumindo variâncias diferentes. A TABELA 24 traz os resultados do comparativo das curvas de calibração do ácido gálico.

TABELA 24 – TESTE-T PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO (COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS)

	Água	Etanol
Média	0,460	0,439
Variância	0,051	0,045
Observações	6	6
Hipótese da diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	-0,171	
P(T<=t) bi-caudal	0,868	
t crítico bi-caudal	2,228	

Por meio destes resultados temos que o valor de P bi-caudal é maior que o valor de α , ou seja, não se pode rejeitar a hipótese nula, isto indica que não há diferença significativa entre os resultados encontrados com a água e o etanol. Outra observação que nos mostra que é possível rejeitar a hipótese nula é o valor do módulo de Stat t. Como o valor é menor que o valor de t tabelado (t crítico bi-caudal), pode-se dizer, com 95 % de confiança, que as curvas são semelhantes, logo não existe efeito matriz.

Para a curva de calibração do Trolox na análise de DPPH, os resultados de absorvância e porcentagem de inibição da atividade antioxidante das soluções-padrão utilizando água e etanol estão apresentados na TABELA 25.

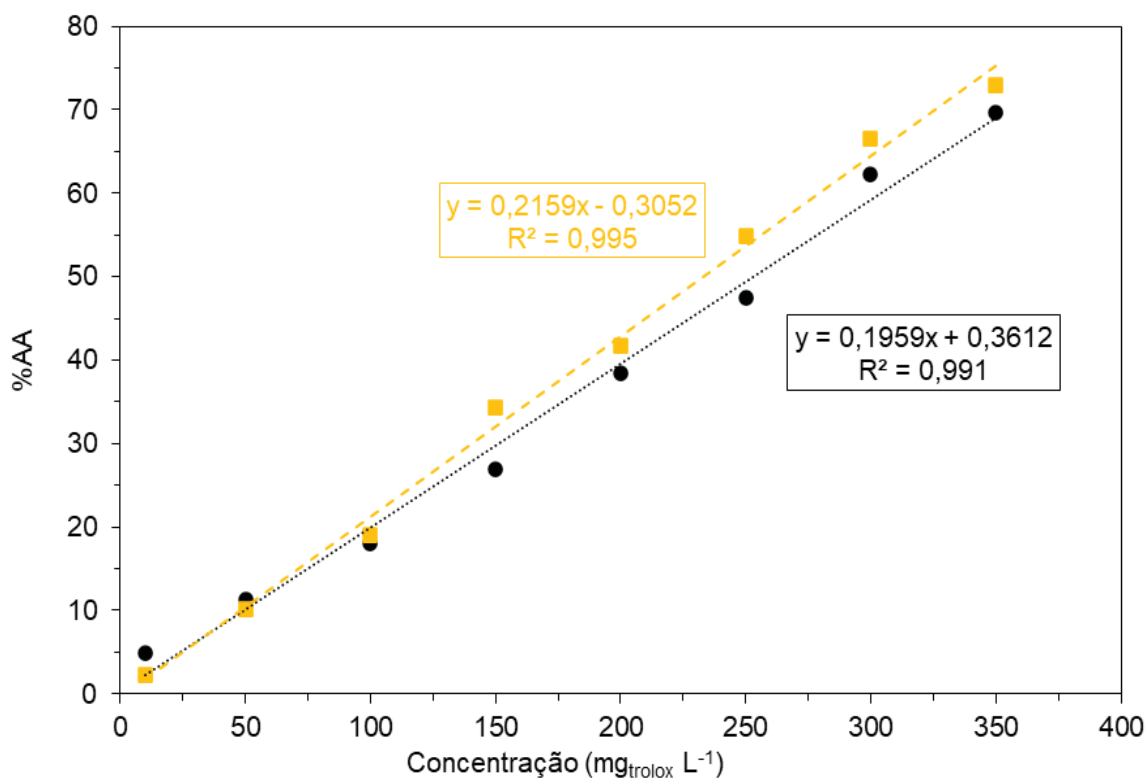
TABELA 25 – DADOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH

Concentração (mg _{Trolox} L ⁻¹)	Abs ₁		Abs ₂		Abs ₃		Abs _{média}		%AA	
	Água	Etanol	Água	Etanol	Água	Etanol	Água	Etanol	Água	Etanol
350	0,358	0,212	0,264	0,212	0,268	0,248	0,297	0,224	69,625	73,023
300	0,415	0,268	0,344	0,314	0,345	0,251	0,368	0,278	62,321	66,560
250	0,559	0,390	0,495	0,362	0,485	0,373	0,513	0,375	47,474	54,837
200	0,619	0,503	0,594	0,482	0,589	0,468	0,601	0,484	38,498	41,670
150	0,729	0,587	0,708	0,497	0,704	0,554	0,714	0,546	26,928	34,243
100	0,792	0,678	0,809	0,672	0,799	0,667	0,800	0,672	18,089	19,029
50	0,865	0,738	0,889	0,747	0,845	0,751	0,866	0,745	11,297	10,237
10	0,945	0,784	0,947	0,817	0,895	0,832	0,929	0,811	4,881	2,328
Branco	0,961	0,825	0,967	0,834	1,002	0,832	0,997	0,830	-	-

FONTE: A autora (2021).

Com os valores de concentração e porcentagem de inibição da atividade antioxidante, construiu-se as curvas de calibração do Trolox para a análise de DPPH utilizando água e etanol (FIGURA 22).

FIGURA 22 – COMPARATIVO ENTRE AS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX PARA O MÉTODO DPPH COM ÁGUA (●) E ETANOL (■)



FONTE: A autora (2021).

Com o intuito de avaliar se há diferença significativa no uso da água ou do etanol na construção da curva de calibração do Trolox para a análise de DPPH, o teste-t de Student foi aplicado e o resultado está exibido na TABELA 26.

TABELA 26 – TESTE-T PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX (DPPH)

	Água	Etanol
Média	34,889	37,741
Variância	561,884	679,427
Observações	8	8
Hipótese da diferença de média	0	
gl	14	
Stat t	0,229	
P(T<=t) bi-caudal	0,822	
t crítico bi-caudal	2,145	

Tendo o valor de P bi-caudal significativamente maior que 0,05 e o valor de Stat t menor que o t crítico bi-caudal, não é possível rejeitar a hipótese nula, desta forma, tem-se que as curvas obtidas com a água e o etanol não apresentam diferença significativa entre elas.

Os resultados de absorvância das soluções-padrão utilizando água e etanol para a curva de calibração do Trolox na análise de antioxidante pelo método FRAP estão apresentados na TABELA 27.

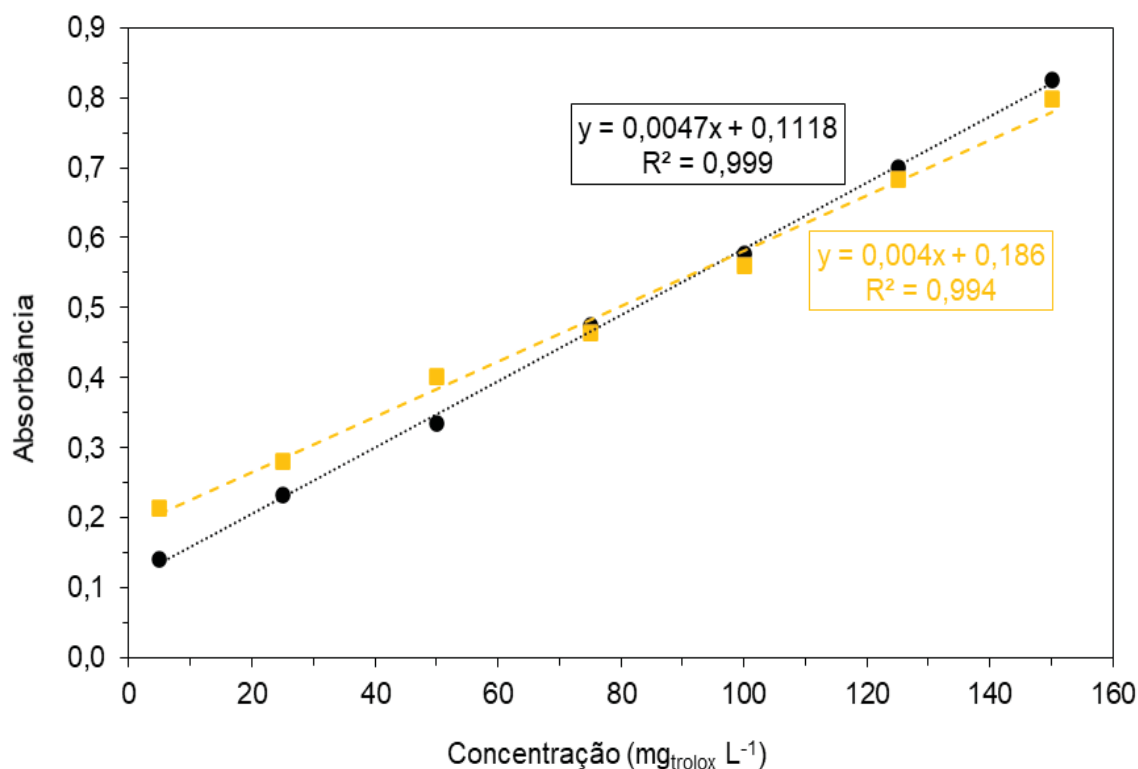
TABELA 27 – DADOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX PARA A ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP

Concentração (mg _{Trolox} L ⁻¹)	Abs ₁		Abs ₂		Abs ₃		Abs _{média}	
	Água	Etanol	Água	Etanol	Água	Etanol	Água	Etanol
150	0,779	0,765	0,840	0,808	0,859	0,822	0,826	0,798
125	0,671	0,653	0,732	0,685	0,697	0,709	0,700	0,682
100	0,557	0,491	0,574	0,589	0,597	0,599	0,576	0,560
75	0,464	0,466	0,485	0,437	0,478	0,491	0,476	0,465
50	0,335	0,391	0,336	0,387	0,333	0,427	0,335	0,402
25	0,232	0,252	0,231	0,270	0,234	0,321	0,232	0,281
5	0,150	0,182	0,137	0,225	0,134	0,236	0,140	0,214

Fonte: A autora (2021).

A partir dos dados de concentração e absorvância, construiu-se as curvas de calibração do Trolox para a análise FRAP utilizando água e etanol (FIGURA 23).

FIGURA 23 – COMPARATIVO ENTRE AS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX PARA O MÉTODO FRAP COM ÁGUA (●) E ETANOL (■)



FONTE: A autora (2021).

Assim como realizado anteriormente para as curvas de calibração das análises de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método DPPH, aplicou-se o teste-t de Student para verificar o efeito de se empregar a água ou o etanol. A TABELA 28 apresenta os resultados do comparativo das curvas de calibração do Trolox para a análise de antioxidante pelo método FRAP.

TABELA 28 – TESTE-T PARA A CURVA DE CALIBRAÇÃO DO TROLOX (FRAP)

	Água	Etanol
Média	0,469	0,486
Variância	0,062	0,044
Observações	7	7
Hipótese da diferença de média	0	
gl	12	
Stat t	0,135	
P(T<=t) bi-caudal	0,894	
t crítico bi-caudal	2,179	

Por meio deste resultado, temos que o valor de Stat t é menor que o t calculado (t crítico bi-caudal) e P bi-caudal é maior que 0,05, indicando que não é possível rejeitar a hipótese nula, isto implica que independentemente se for aplicado água ou etanol isto não influenciará nos resultados obtidos pela análise de antioxidantes pelo método de FRAP.

Como foi discutido para todas as análises de caracterização realizadas, verificou-se que independentemente do uso da água ou do etanol isto não influenciará o resultado espectrofotométrico. Desta forma, com o intuito de padronizar os cálculos para a obtenção do teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante pelos métodos FRAP e DPPH, utilizou-se a equação obtida pelas curvas de calibração com água, independente se foi empregado etanol para a diluição das fases hidrofóbicas.