



GABRIEL RIBEIRO CARVALHO

**EXTRAÇÃO AQUOSA ENZIMÁTICA DE COMPOSTOS
BIOATIVOS DO GRÃO DE CAFÉ VERDE E TORTA
RESIDUAL DA EXTRAÇÃO POR PRENSAGEM MECÂNICA**

LAVRAS

2020

GABRIEL RIBEIRO CARVALHO

**EXTRAÇÃO AQUOSA ENZIMÁTICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO GRÃO
DE CAFÉ VERDE E TORTA RESIDUAL DA EXTRAÇÃO POR Prensagem
MECÂNICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Engenharia de Processos, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Fabiana Queiroz

Orientadora

Prof. Dr. Evandro Galvão Tavares Menezes

Co-orientador

LAVRAS - MG

2020

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Carvalho, Gabriel Ribeiro.

Extração aquosa enzimática de compostos bioativos do grão de café verde e torta residual da extração por prensagem mecânica / Gabriel Ribeiro Carvalho. - 2020.

65 p.

Orientador(a): Fabiana Queiroz.

Coorientador(a): Evandro Galvão Tavares Menezes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Carboidrases. 2. Subprodutos agroindustriais. 3. Correlação de Pearson. I. Queiroz, Fabiana. II. Menezes, Evandro Galvão Tavares. III. Título.

GABRIEL RIBEIRO CARVALHO

**EXTRAÇÃO AQUOSA ENZIMÁTICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO GRÃO
DE CAFÉ VERDE E TORTA RESIDUAL DA EXTRAÇÃO POR Prensagem
MECÂNICA**

***WATER ENZYMATIC EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM GREEN
COFFEE BEANS AND RESIDUAL CAKE FROM MECHANICAL PRESSING
EXTRACTION***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Engenharia de Processos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 12 de novembro de 2020.

Profa. Dra. Fabiana Queiroz	DCA/UFLA
Prof. Dr. Evandro Galvão Tavares Menezes	UFV
Profa. Dra. Isabela Costa Guimarães	UFV
Prof. Dr. João Domingos Scalon	DES/UFLA
Profa. Dra. Joyce Maria Gomes da Costa	UFVJM

Prof. Dra. Fabiana Queiroz

Orientadora

Prof. Dr. Evandro Galvão Tavares Menezes

Co-orientador

LAVRAS – MG

2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço meus orientadores Dra. Fabiana Queiroz e Dr. Evandro Galvão, os quais me deram ideias e apoio nesse projeto. Pessoas com inúmeras qualidades, que nos passam serenidade e tranquilidade nos momentos angustiantes que enfrentamos ao longo da vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos (PPGCA) e aos órgãos financiadores dos projetos que participei durante o doutorado, em especial à Capes pela concessão da bolsa- código 001.

Aos fornecedores dos insumos e materiais, que muitas vezes foram adquiridos por doações de empresas e pessoas que acreditam na ciência brasileira e não medem esforços para auxiliar nossos trabalhos, em especial às empresas Cooxupé e Novozymes, sempre nos fornecendo produtos, protocolos e a novas ideias. A ajuda veio de todos os lados, além das empresas, amigos e professores acreditaram no projeto e também forneceram protocolo de análises, materiais, discussões para melhoria e até laboratórios para execução de experimentos. Enfatizo a colaboração direta dos professores e pesquisadores: Francisca Chagas do Amaral, Marcelo R. Malta, Marcelo Angelo Cirillo, Lizzy Ayra, Michel Cardoso, Jaime Vilela, Soraia Borges, Eduardo Valério, Eduardo Ramos, Diego Botrel e Jefferson Correa.

À Universidade Federal de Lavras, aos Departamentos de Ciência dos Alimentos (DCA), de Química (DQI), de Fitopatologia (DFP) e de Biologia (DBI), onde a maioria das análises foram realizadas, meus agradecimentos também à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), à Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Aos meus colegas que se tornaram amigos, colaboraram, dispuseram de seus tempos e em alguns momentos se sacrificaram para me ajudar. São muitas pessoas, gostaria de citar alguns que me ajudaram diretamente nos experimentos e na vida pessoal, como Carlos Ramon, Pedro Campelo, Lorrany Ramos, Érica Resende, Maria Cecília, Francisco Martins, Nathane Resende, João Renato, Ana Paula Lima, Amanda Umbelina, Paula Giarola e Jefferson Santos. Meus agradecimentos também ao pessoal dos laboratórios de Refrigeração e de Produtos Vegetais do DCA que me aturaram nesses anos.

Aos membros da banca, professores Dra. Joyce Maria, Dra. Isabela Costa e Dr. Scalon, além dos meus orientadores, que dispuseram de seus tempos e dedicação para melhorias no trabalho.

Às plataformas de pesquisas nacionais e internacionais, que têm como objetivo divulgar ciência e tecnologia para o maior número de pessoas, às vezes em situações jurídicas arriscadas, todavia, não cabe mais o anonimato, porque sua missão é justamente o oposto, a divulgação. Minha enorme gratidão e admiração pela plataforma Sci-Hub e à sua idealizadora, Alexandra Elbakyan.

Gratidão aos companheiros de república com quem morei, pelos momentos divertidos e descontraídos durante o doutorado, Hugo, Carlos Ramon, Lucas, Ronaldo, Douglas e Jurandy. Aos de mestrado e graduação também. São esses momentos que aportam nossa saúde mental, nos motivam a continuar e podemos aprender um pouco da cultura brasileira, porque essa experiência nos permite conhecer pessoas de todos os cantos desse país. Aos grandes amigos que conheci dentro da universidade, nas aulas, tutorias e/ou consultorias e todos que participaram dessa jornada.

Por fim, mas nunca menos importante, à minha família que me deu condições e apoio para a realização do projeto. Em especial aos meus pais, irmã e minhas avós, que são mães duas vezes.

RESUMO GERAL

A agroindústria gera grandes quantidades de resíduos que muitas vezes são descartados ou não são aproveitados de modo conveniente e sustentável. Durante a extração mecânica do óleo de café verde é gerada uma biomassa, na qual ainda apresenta compostos bioativos e óleo. Para a extração de compostos desejáveis, o processo aquoso se mostra como uma alternativa que visa a saúde dos manipuladores e consumidores diminuindo o uso de solventes orgânicos. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o processo de extração aquosa enzimático por *carboidrases* em grão de café verde e sua torta residual advinda da extração mecânica do seu óleo. Otimizou-se os fatores tempo, pH e temperatura, na extração de sólidos solúveis com delineamento composto central rotacional (DCCR). Após a otimização, o extrato produzido nessas condições foi caracterizado com análises físico-químicas e comparado com extração aquosa nas mesmas condições, exceto o uso das *carboidrases*. Verificou-se a correlação entre as análises físico-químicas utilizando o coeficiente de Pearson. Os resultados da otimização da extração enzimática de sólidos solúveis para o grão de café foram de 75 minutos, pH 4,5 e temperatura de 49°C, e para a torta residual de 51 minutos, pH 5 e temperatura de 46°C. A comparação com o grupo controle (extração aquosa sem uso de enzimas) mostrou que a adição de enzimas favoreceu a extração de cafeína, compostos fenólicos, óleo e as atividades antioxidantes ABTS e DPPH e com potencial de uso da torta residual frente a resultados similares e até superiores quando comparada com o grão de café. O coeficiente de correlação linear de Pearson identificou as variáveis que se correlacionam no processo enzimático e mostrou que a extração de compostos fenólicos está correlacionada com a presença de cafeína, açúcares redutores e antioxidante pela metodologia DPPH, já a turbidez está correlacionada com a presença de óleo e cafeína na fase extrato, as metodologias ABTS e DPPH para antioxidante não apresentaram correlação estatisticamente significativa entre si. O uso de enzimas aumentou a extração de compostos de interesse do grão de café e da torta, e a utilização da torta como aproveitamento de resíduos agroindustriais no mercado cafeeiro apresentou eficácia, uma vez que sua aplicação como matriz diminuiu desperdícios e consequentemente o custo com material, com resultados inclusive superiores em cafeína, compostos fenólicos e atividade antioxidante por DPPH em relação ao grão de café.

Palavras-chave: *Carboidrases*. Processo enzimático. Subprodutos agroindustriais. Compostos fenólicos. Correlação linear de Pearson.

GENERAL ABSTRACT

Agribusiness generates large amounts of waste that are often discarded or not used conveniently and sustainably. During the mechanical extraction of the green coffee oil, biomass is generated, which still contains bioactive compounds and oil. For the extraction of desirable compounds, the aqueous process is shown as an alternative that aims at the health of the manipulators and consumers, reducing the use of organic solvents. The present work was carried out with the objective of evaluating the aqueous enzymatic extraction process by carbohydrases in the green coffee bean and its residual cake resulting from the mechanical extraction of its oil. The time, pH and temperature factors were optimized in the extraction of soluble solids with a central rotational composite design (CRCD). After the optimization, the extract produced under these conditions was characterized by physical-chemical analysis and compared with aqueous extraction under the same conditions, except for the use of enzymes. The correlation between physical-chemical analyzes was verified using Pearson's coefficient. The results of the optimization of the enzymatic extraction of the soluble solids for the coffee bean were 75 minutes, pH 4.5 and temperature of 49 °C, and for the residual cake of 51 minutes, pH 5 and temperature of 46 °C. The comparison with the control group (aqueous extraction without the use of enzymes) showed that the addition of enzymes favored the extraction of caffeine, phenolic compounds, oil and the antioxidant activities ABTS and DPPH, and with the potential to use residual cake in view of similar results and even superior when compared to the coffee bean. The Pearson's linear correlation coefficient identified the parameters that correlate in the enzymatic process and showed that the extraction of phenolic compounds is correlated with the presence of caffeine, reducing sugars and antioxidants by the DPPH methodology, whereas turbidity is correlated with the presence of oil and caffeine in the extract phase. ABTS and DPPH methodologies for antioxidants did not present a statistically significant correlation between them. The use of enzymes increased the extraction of compounds of interest and cake, as a use of agro-industrial residues in the coffee market, proved effective, since its application as a matrix reduces waste and consequently the cost of material, with results even superior in caffeine, phenolic compounds and antioxidant activity by DPPH concerning the coffee bean.

Keywords: Carbohydrase. Enzymatic process. Agro-industrial waste. Phenolic compounds. Pearson's correlation.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	9
1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	Anatomia e fisiologia do café.....	11
2.2	Consolidação e perenidade do mercado cafeeiro.....	12
2.3	Compostos Bioativos, Antioxidantes e suas metodologias.....	14
2.4	Setor agroindustrial.....	17
2.4.1	Torta residual da extração do óleo de café.....	17
2.5	Extração com solventes.....	18
2.5.1	Extração aquosa enzimática.....	19
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	24
	REFERÊNCIAS.....	25
	SEGUNDA PARTE- ARTIGO.....	33
	ARTIGO 1- OTIMIZAÇÃO E ESTUDO DA EXTRAÇÃO AQUOSA ENZIMÁTICA DE CAFÉ VERDE E SUA TORTA RESIDUAL.....	33

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O café é uma cultura originária da Etiópia que começou a ser comercializada no início do século VII e se propagou por todos os continentes. Atualmente, os principais países produtores no mundo são Brasil, Colômbia e Vietnã. Grande parte da produção brasileira é mantida no mercado interno, uma vez que o consumo brasileiro de café é um dos maiores do mundo, junto com os Estados Unidos. Economicamente, a plantação das lavouras é principalmente voltada para o preparo de bebidas.

Em relação à produção de café no mundo, a safra 2018/2019 atingiu 174,5 milhões de sacas de 60 kg, um crescimento de 14% em relação à safra 2015/2016 que produziu 152,9 milhões de sacas. A espécie arábica está sendo responsável por aproximadamente 100 milhões de sacas nas safras dos últimos cinco anos (CONAB, 2019).

O surgimento de mercado para produtos à base de café tem estimulado pesquisas em desenvolvimento de produtos como os óleos de café verde e torrado, com diversas aplicações na indústria de cosméticos e farmacêutica. Os subprodutos do café apresentam substâncias com poder antioxidante e estimulante, por esse motivo as indústrias da área de saúde aumentaram o enfoque no processamento dos mesmos, que são abundantes no Brasil.

A crescente demanda industrial por aproveitamento de resíduos e subprodutos é estimulada pela diminuição de custos e materiais que antes seriam descartados, contribuindo para uma produção econômica e ambientalmente sustentável. Novas tecnologias são desenvolvidas a fim de potencializar o aproveitamento de compostos de interesse nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica, sendo essas as que apresentam maior interesse nos subprodutos advindos do café.

A busca por agregar valores em produtos, que até então, eram considerados tradicionais, vêm criando novos nichos mercadológicos. Um estudo de Oliveira et al. (2019.a) mostrou que a torta residual da extração mecânica apresentava quantidades significativas de bioativos com atividade antioxidante *in vitro*.

Apesar do mercado de café ser voltado para a produção de bebida, o grão de café tem outros potenciais industriais, como a extração de óleo e compostos bioativos usados em cosméticos. Este, absorve radiação ultravioleta proveniente da luz solar que atingiriam a pele e assim previne o foto-envelhecimento, que ocorre pela formação de radicais livres. Um estudo de Saewan e Jimtaisong (2015) concluiu que o óleo da espécie *Coffee arabica* apresentou maior

capacidade foto-protetora contra queimaduras solares, e por esse motivo, tem sido a espécie mais usada em cosméticos.

Os grãos de café verdes usados industrialmente não são submetidos ao processo de torrefação, apresentando, assim, uma constituição química bem distinta do grão torrado (XU et al., 2019), despertando interesse como matéria-prima na agroindústria por possuir um óleo rico em compostos bioativos, como cafeína, ácido clorogênico e alto potencial antioxidante (OLIVEIRA et al., 2019.b).

O ácido clorogênico apresenta função orgânica fenólica, auxiliando na redução da pressão sanguínea por inibir a ação da arginase, uma enzima que produz hormônios responsáveis pela vasoconstrição, também reduz os picos de glicose e por isso é uma substância indicada para pessoas com diabetes mellitus tipo 2. A cafeína é uma metilxantina termogênica que aumenta o estado de vigília e diminuição da fadiga, tem propriedade antioxidante, estimula a apoptose de células epiteliais cancerígenas e tem capacidade de absorver radiação ultravioleta (RADICE et al., 2016).

A extração mecânica de óleo no grão de café verde gera uma biomassa, chamada torta residual. Essa torta ainda apresenta compostos de interesse industrial, apesar de ter sido retirado parte de seu óleo. Tanto o grão de café verde quanto a torta residual da extração de óleo desse grão vêm sendo estudados com intuito de novas aplicações (OLIVEIRA et al., 2019.a).

Recentemente, houve um aumento de pesquisas com o uso de enzimas para melhorar o rendimento na obtenção de compostos bioativos, como ácidos graxos insaturados (NGUYEN et al., 2020) e em diversos óleos vegetais (HU et al., 2020; SOUZA et al., 2020). A extração aquosa com uso de enzimas apresenta-se como um processo mais seguro aos manipuladores e à saúde dos consumidores, por não utilizar outros solventes além da água, também gera danos mínimos em relação à contaminação do meio ambiente. Tradicionalmente, o hexano é um dos solventes mais usados em processos de extração de óleos, entretanto, pode acarretar consequências graves à saúde dos manipuladores (BATES et al., 2019). O processo enzimático necessita ser bem planejado e estudado por possuir um alto custo operacional e suas condições devem ser bem delimitadas, uma vez que enzimas são altamente sensíveis e atuam em faixa de temperatura e pH específicos.

Neste contexto, o trabalho teve como objetivo principal avaliar as condições da extração enzimática através de carboidrases para grãos de café verde e da torta residual gerada pela extração mecânica do óleo, otimizar o processo enzimático de acordo com pH, temperatura e tempo; caracterizar do extrato do processo otimizado e compará-lo com o obtido pela extração aquosa, sem o uso das enzimas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Anatomia e fisiologia do café

O grão de café é um cotilédone envolto pelas estruturas de exocarpo, mesocarpo e endocarpo. O exocarpo também é conhecido popularmente como casca. O mesocarpo é onde se localiza a polpa, e o endocarpo é recoberto pelo pergaminho. O fruto é resultado da polinização da flor do cafeeiro e em estado *in natura* esse fruto apresenta coloração esverdeada e formato oval. Com o amadurecimento, o exocarpo apresenta uma modificação na sua coloração e diminuição de ácidos clorogênicos. O conjunto de flores formados depende diretamente da exposição aos raios solares, assim como o desenvolvimento do fruto (RIGAL et al., 2020).

A polinização do cafeeiro não é obrigatória, ou seja, não há necessidade de agentes bióticos para que as flores se transformem em fruto, mas a produtividade da cultura se torna muito maior na presença de polinizadores. Na Figura 1, é possível observar grãos de café no estágio de anatomia quase desenvolvidos.

Figura 1- Fruto do cafeeiro da espécie arábica no estágio de desenvolvimento.



Fonte: Do autor (2020).

A maioria das plantas da espécie arábica emite as inflorescências na primavera e frutificam no mesmo ano fenológico, levando dois anos para completar o ciclo (FERREIRA et al., 2014). No primeiro ano, forma-se os ramos vegetativos, com gemas axilares nos nós durante a época com dias longos. As características anatômicas influenciam na maturação do fruto do cafeeiro, como exemplo, o maior número de vasos xilema aceleraria e anteciparia o início de processo de maturação. O processo de amadurecimento vem sendo estudado e realizadas

simulações com precisão, a fim de compreender o comportamento dos frutos (TINOCO; PEÑA, 2019).

Do ponto de vista econômico, o endosperma é a parte mais aproveitada pela agroindústria. Diversos compostos químicos estão presentes no grão, como água, proteínas, alcaloides, óleos, dextrinas, pentosanas, celulose e outros componentes em menores quantidades (PEREIRA et al., 2019). As reservas de lipídios estão dispersas em glóbulos esféricos no interior da célula com função energética, assim como as hexoses. Durante a germinação da semente há metabolização de parte da quantidade lipídica, transformando os triacilgliceróis em carboidratos, principalmente sacarose, com a finalidade de aumentar a mobilidade da fonte de carbono energético para a planta (WU et al., 2020).

O manejo inadequado dos frutos de café nas fases pré e pós-colheita estimulam a deterioração dos componentes lipídicos presentes no café, devido a degeneração das membranas desfiguradas sob os aspectos histoquímicos e morfológicos. A parede celular é uma camada resistente em aspectos mecânicos e tem como principal função, a proteção da célula do meio externo (LIMA et al., 2014).

O grão de café apresenta um alto teor de carboidratos, advindos principalmente da parede celular, com o amadurecimento, a quantidade de sacarose tende a aumentar, como uma fonte rápida de energia para a semente. Constituída por componentes celulósicos e não celulósicos, a parede celular é constituída pela parede primária que é fina, flexível e elástica, permitindo o crescimento celular e também pela parede secundária que é mais espessa e rígida.

Além da celulose, a parede celular apresenta quantidades significativas de pectinas e hemiceluloses, componentes que dificultam a extração dos componentes internos da célula. Os óleos na célula vegetal têm função de armazenagem energética em plantas que produzem sementes pequenas. Nos grãos de café, os triacilgliceróis são armazenados no citoplasma das células de endosperma, reservado em organelas chamadas oleossomos, formado por uma grande quantidade de proteínas anfipáticas, chamadas de oleosinas (BRESINSKY, 2011). Essas proteínas separam o óleo da fase aquosa no citoplasma.

2.2 Consolidação e perenidade do mercado cafeeiro

Pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*, as duas espécies mais conhecidas e cultivadas de café são denominadas arábica (*Coffea arabica*) e robusta (*Coffea canephora*). A espécie robusta, também conhecida como conilon, é responsável por quase um terço da produção mundial, contém duas vezes mais cafeína que o arábica e apresenta menor

susceptibilidade a pragas e incidências de doenças fúngicas (VILLARREYNA et al., 2020). Outra espécie que apresentou um aumento em sua produção é o café liberiano (*Coffea liberica*), entretanto, sua produção comercial se restringe a Indonésia e alguns países asiáticos.

A espécie arábica apresenta características sensoriais mais requintadas e menor amargor, com menores teores de cafeína. A desvantagem da espécie é a susceptibilidade de ataque por fitopatógenos que se aproveitam de mudanças climáticas para se instalarem nas células vegetais com facilidade (ALVES et al., 2011).

Minas Gerais é responsável por mais da metade da produção brasileira e é uma das principais fontes de cafés especiais, basicamente usando a espécie arábica (CONAB, 2019). Os estados de Espírito Santo, Rondônia, São Paulo, Bahia e Paraná também apresentam representatividade no cenário nacional, sendo o Espírito Santo, o maior produtor da espécie Conilon.

A valorização da saca de café no Brasil não acompanhou os índices referentes à inflação nos últimos 20 anos, com o preço da saca de 60 kg de café arábica oscilando entre R\$ 420 a R\$ 500 nos últimos 5 anos. A Tabela 1 mostra a cotação média da saca de 60 kg de café arábica tipo 6, referente ao preço médio do primeiro trimestre dos respectivos anos (CEPEA/ESALQ, 2020).

Tabela 1- Cotação do café arábica (tipo 6) bebida dura no primeiro trimestre dos respectivos anos.

Ano	2016	2017	2018	2019	2020
Preço (R\$)	443	476	423	477	505
Preço (US\$)	123	152	128	121	97

Fonte: CEPEA/Esalq (2020).

O café é uma das bebidas mais populares do mundo, com cerca de 400 bilhões de xícaras sendo consumidas por ano (SPENCE; CARVALHO, 2020). Existem grandes diferenças genéticas entre as espécies de café, gerando produtos distintos nos quesitos nutricionais, anatômicos, de resistência às pragas e na composição química (BABOVA; OCCHIPINT; MAFFEI, 2016).

As razões que estimulam o consumo da bebida, além do seu aroma e gosto característicos, é o efeito estimulante que o café proporciona ao consumidor, principalmente

pela cafeína presente. Na alimentação, o café tem um conjunto de substâncias com efeito hepatoprotetor em dietas com grande ingestão de lipídios (ONTAWONG et al., 2019).

O consumo interno brasileiro nos últimos anos está em expansão, ultrapassando 20 milhões de sacas anuais, sendo o segundo maior consumidor no mundo e com perspectiva de aumento nos próximos anos, e cafés de alta qualidade vêm sendo mais procurados no mercado interno (CONAB, 2019).

A produção de bebida ainda é o principal foco dos produtores de café, todavia, o aumento na oferta do café, devido ao desenvolvimento de tecnologias que garantiram maior produção, criou uma barreira na progressão do preço do café no mercado brasileiro. Atualmente, o mercado tem alcançado aceitação significativa com produtos advindos do café. O uso de café verde apresenta potencial de mercado para a indústria cosmética há mais de 20 anos, com coloração e odor suaves (GLESS, 1998).

Visando o aumento da receita dos produtores, os resíduos gerados no processamento de café têm sido estudados para sua aplicação em diversas áreas, apresentando um alto potencial para geração de energia, como o biodiesel com finalidade de combustível (KAMIL et al., 2019), além de poder ser usado para a alimentação animal e como substituto de carvão vegetal em caldeiras que são usadas como fontes energéticas nas indústrias.

2.3 Compostos Bioativos, Antioxidantes e suas metodologias

Compostos bioativos têm efeitos sobre os organismos, tecidos ou células, não sendo essenciais para a sobrevivência, porém, apresentam grande influência positiva para a saúde. Suas estruturas químicas variam bastante, bem como suas funções biológicas, esses compostos não estão relacionados diretamente com nenhuma função orgânica.

Esses compostos podem ser encontrados abundantemente nos vegetais. Geralmente, em plantas são compostos secundários relacionados com seu sistema de defesa da célula vegetal, alguns contra a radiação ultravioleta e outros a ataques de insetos e microrganismos, sendo que o uso dessas substâncias em dietas pode não atingir os resultados desejados devido à baixa bioacessibilidade dessas no trato digestivo (RIBEIRO et al., 2019).

Os compostos bioativos podem desempenhar uma série de funções à saúde do consumidor, inclusive ação antioxidante (ISLAM et al., 2020). Conceitualmente, a atividade antioxidante é a capacidade de uma matriz inibir a degradação oxidativa, por esse motivo, a determinação desse parâmetro tem sido importante na caracterização dietética de alimentos e produtos naturais. O interesse pela descoberta de antioxidantes novos e seguros de fontes

naturais tem aumentado, principalmente, para prevenir o dano oxidativo às células vivas (LIMA et al., 2010).

O café apresenta uma quantidade significativa de compostos bioativos, basicamente os fenólicos, e por isso tende a apresentar uma atividade antioxidante significativa. Estudos de Samsonowicz et al. (2019) mostrou uma alta correlação entre as metodologias para atividade antioxidante e presença de polifenóis em café.

A combinação dos compostos presentes no café faz com que seu poder rejuvenescedor na célula seja um grande aliado para a saúde. Estudos mostram que o consumo frequente de café estimula a digestão e a imunidade; previne a cirrose e diversas doenças hepáticas, como câncer de fígado; combate a obesidade e hipertensão; além de possuir funções antimicrobianas por causa dos compostos naturais do café (LACHANCE et al., 2020).

Cafeína, ácido clorogênico e trigonelina são fitoquímicos abundantes no café que conferem diversos benefícios à saúde (LIMA et al., 2013). Essas substâncias presentes no café vêm sendo estudadas com maior frequência e possuem ação antioxidante.

Estudos de Fischer et al. (2014) evidenciam que a cafeína, quando usada topicamente nas raízes do cabelo, estimulam os folículos pilosos e protegem da ação negativa das reações advindas da testosterona, e assim, fortalece os fios de cabelo. A cafeína também tem a ação de estimulação na circulação e promove a apoptose em células modificadas, por essas razões, quando usada na pele, auxilia no combate à celulite e na prevenção do câncer de pele. Há evidências que a molécula previne o câncer de pele mesmo quando é consumida via oral, independente da etnia do consumidor (CHOON CHIAT et al., 2019).

Assim como a cafeína, o ácido clorogênico é exclusivamente sintetizado pelo reino vegetal, quando ingerido, reduz a pressão sanguínea, apresenta alto poder antioxidante e ação anti-inflamatória. Além de apresentar diversos benefícios evidenciados, tem mostrado controlar os níveis de leptina nas respostas neuroendócrinas, sendo um ácido fenólico que, por consequência, regula os níveis de glicose no sangue (CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2018).

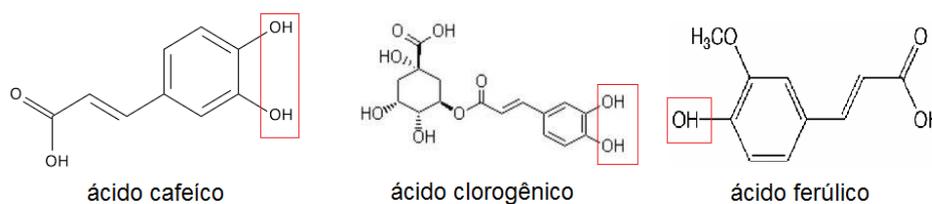
Pertencendo a classe dos alcaloides, a trigonelina sofre desmetilação durante a torrefação e forma a vitamina B₃ (niacina), que também tem importância nutricional (SALDAÑA; MAZZAFERA; MOHAMED, 1997), auxiliando a circulação sanguínea e evitando a formação de trombos indesejáveis. A trigonelina tem capacidade antioxidante, aumenta e melhora as condições metabólicas dos hepatócitos, auxilia na produção de bile e em combinação com outras substâncias reduz a obesidade, diabetes e inflamações crônicas (COSTA et al., 2020).

Os métodos FRAP, ABTS e DPPH usualmente utilizados para determinar a capacidade antioxidante (MADUWANTHI; MARAPANA, 2021). A aplicação de mais de uma metodologia se torna interessante, a fim de comparação e confirmação dos resultados, isso porque o método de reação é diferente entre as metodologias. Quando uma metodologia é aplicada isoladamente, pode não fornecer resultados seguros, devido principalmente, à complexidade dos compostos (SUCUPIRA, 2012).

A extração de compostos bioativos apresenta desafios no processo enzimático. Um desses obstáculos é a desnaturação enzimática que pode ocorrer devido a temperaturas elevadas, o que pode acarretar também o comprometimento da qualidade e na bioatividade dos compostos (ZHANG et al., 2020.a). Dentre as categorias de bioativos fitoquímicos, merecem destaque as dos compostos fenólicos, considerados os principais componentes antioxidantes presentes nos vegetais, podendo ser moléculas sensíveis ao meio externo (KHOSHNOUDI-NIA et al., 2020). Os compostos fenólicos, presentes em pequenas quantidades, podem exercer efeitos preventivos e curativos em distúrbios fisiológicos nos seres humanos. Não podem ser considerados vitaminas por não serem elementos essenciais para o organismo.

Esses compostos apresentam função orgânica de fenol, consistindo em um grupo hidroxilo ligado diretamente a um hidrocarboneto aromático. Existem inúmeros compostos fenólicos, na Figura 2 pode-se observar as moléculas majoritárias presentes no café, com destaque na hidroxila ligada ao composto aromático que os tornam fenólicos.

Figura 2- Moléculas de compostos fenólicos encontradas no café



Fonte: Do autor (2020).

A polaridade, o tamanho da cadeia e as interações com o meio externo dos compostos fenólicos variam de acordo com cada molécula. Para a quantificação destes compostos, estudos atribuem os resultados em equivalência em ácido gálico (GAE), porém, a classe dos compostos fenólicos é bem mais abrangente, destacando os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (ANGELO; JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos são originários do metabolismo secundário de plantas, sendo essenciais para seu crescimento e reprodução, além disso se formam em condições de estresse como, infecções, fermentos e radiações UV. Esses compostos agem como antioxidantes a partir de duas rotas, a primeira podendo doar hidrogênio ou elétrons, já a segunda, em virtude da formação de seus radicais intermediários estáveis, impedindo a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (SILVA et al., 2010).

2.4 Setor agroindustrial

A agroindústria é o conjunto de processos relacionados à transformação das matérias-primas agrícolas, que pode gerar produtos que não são usados e muitas vezes acabam descartados. No caso desses subprodutos serem bem empregados, apresentam potencial de melhorar a receita dos produtores e diminuir significativamente a quantidade de material descartado. A busca de alternativas para utilização das biomassas geradas nos processos vem crescendo dentro de vários centros de pesquisas, sabendo que há um desperdício durante toda a cadeia produtiva de 1,3 bilhão de toneladas por ano (GRESES et al., 2019).

O grão de café verde apresenta em suas células uma quantidade significativa de lipídios com fração insaponificável e saponificável, constituída essa última principalmente por esteróis, quando presentes em produtos cosméticos são princípio ativo de propriedades desejáveis como retenção de umidade, penetração na pele e aderência.

2.4.1 Torta residual da extração do óleo de café

O óleo de café verde é obtido industrialmente por prensagem a frio do grão de café verde e uma biomassa residual é gerada, conhecida também como torta. Na maioria das vezes a torta residual é descartada sem agregar valor industrial, contudo, pesquisas demonstram que há compostos bioativos presentes nessa biomassa com um grande potencial para indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, apresentando atividade antioxidante (OLIVEIRA et al., 2019.b).

Estudos ao longo dos anos estão sendo publicados com o objetivo de valorizar os resíduos gerados pela agroindústria, aproveitando para outros fins e diminuindo o desperdício (SINGH et al., 2019). Todavia, ainda há algumas dificuldades em utilizar em larga escala esses resíduos de modo rentável para os produtores, principalmente, quando as técnicas são

inovadoras e ainda estão na fase de estudo, como é o caso do uso de resíduos agroindustriais para imobilização enzimática (GIRELLI, 2020).

A torta residual obtida na extração de óleo apresentou em estudos de Oliveira et al. (2019.b) a mesma quantidade de ácidos clorogênicos, fibra alimentar, minerais e proteínas que o grão de café verde *in natura*. A quantidade de fenólicos e cafeína da torta foram superiores, provavelmente, por não apresentar a fração lipídica que foi extraída. Essa caracterização evidencia um potencial do uso da torta para a indústria alimentícia e cosmética. Os apelos econômicos e ambientais do aproveitamento de resíduos gerados na extração de óleos justificam estudos desses materiais para outros fins, como foi observado em um estudo de Franca et al. (2010), onde a torta residual apresentou uma eficiência significativa como adsorvente de azul de metileno, proporcionando apelo ambiental.

2.5 Extração com solventes

Os óleos vegetais são lipídeos extraídos de plantas com presença de ácidos graxos insaturados, onde em temperatura ambiente, são encontrados no estado líquido, sendo essas as principais diferenças com as gorduras. Apesar de outras partes vegetais, como raízes, galhos e folhas, poderem ser utilizadas na obtenção de óleo, a extração ocorre na maioria das vezes a partir das sementes. Os óleos são formados basicamente por triglicerídeos, quimicamente sendo a união de três ácidos graxos e uma molécula de glicerol e, devido a essa natureza química apolar, são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Ácidos graxos são ácidos carboxílicos, diferenciando entre si pelo número de carbonos e suas insaturações.

A diversidade de fontes de óleos vegetais leva a uma grande variabilidade dos percentuais de extração. As tecnologias mais usuais são as de extração por prensagem mecânica, com escalas e ordens de investimento menores, e de extração química, com escalas e investimentos maiores, que utilizam solventes para isso, e novas tecnologias estudam a extração utilizando fluido supercrítico e enzimas.

Os processos com solventes apresentam dificuldades como o preço elevado de equipamentos, perigos referentes ao solvente como prejuízos a saúde dos manipuladores, risco de incêndio e elevado gasto energético.

Pesquisas com solventes verdes vêm sendo desenvolvidas visando a substituição do hexano por alternativas menos prejudiciais ao ambiente, entretanto, nos últimos anos, alguns trabalhos revelaram que mesmo os solventes considerados inofensivos, como é o caso do etanol,

apresentavam níveis de toxicidade, sendo justificado estudos com novas tecnologias de extração (TOLEDO HIJO et al., 2016).

O método mais utilizado para a extração de óleo de café verde nas indústrias é o de prensagem dos grãos verdes, entretanto, estudos mostram possibilidades de otimizar a extração por solventes. Não apenas o óleo pode ser extraído do grão de café, mas extratos ricos em antioxidantes e substâncias lipídicas também podem ser obtidos da torta do processo de prensagem, conforme o solvente utilizado. Um processo alternativo exequível seria extrair o óleo do café verde por prensagem e, posteriormente, um extrato rico em compostos bioativos da biomassa residual por extração com solventes.

Geralmente, o processo de extração de antioxidantes naturais constitui em um mecanismo complexo envolvendo várias etapas. O uso de solventes pode ser de grande eficiência, até podendo ser usado em análises para quantificação. Contudo, muitas vezes, é agressivo ao meio ambiente e exige controle rigoroso de fatores os quais podem provocar perda do poder antioxidante (ANDREO; JORGE, 2006).

2.5.1 Extração aquosa enzimática

A diminuição da energia de ativação é um dos principais mecanismos da enzima em uma reação química, o que resulta em um aumento na velocidade da reação. Em engenharia bioquímica é muito utilizada, devido a sua capacidade catalítica que é aplicada nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxtil, de papel e celulósica. Enzimas são proteínas com função catalizadora de reações químicas, onde sem sua presença essas reações dificilmente aconteceriam em um curto período.

Em relação à estrutura, as enzimas podem ser classificadas em simples, alostéricas, complexas ou isoenzimas. Normalmente, as enzimas são específicas, transformando um determinado substrato em um produto específico, sendo que a atividade de conversão nos produtos depende do pH, temperatura e presença de outras substâncias como cofatores e/ou inibidores no meio. Por serem proteínas, a atividade da enzima pode ser anulada irreversivelmente, caso sejam submetidas a um aumento substancial da temperatura ou grandes variações de pH, pois podem ser desnaturadas. Na desnaturação, o arranjo tridimensional da proteína é desfeito e assim não apresenta mais sua atividade biológica original.

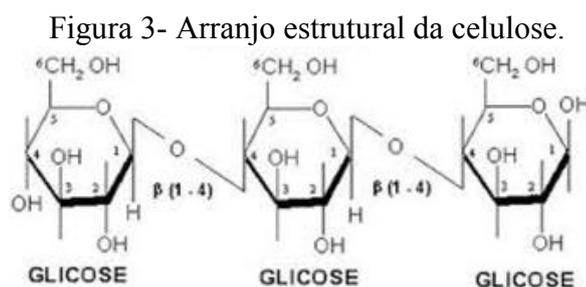
A nomenclatura das enzimas é determinada por um comitê especializado da União Internacional de Bioquímica (KENNEDY; LLOYD, 1994), que também estipula um *EC number* inicial para cada nível. As classes enzimáticas são divididas em: oxirredutase,

transferase, hidrolase, liase, isomerase e ligase, onde cada classe tem um *modus operandi* de transformar as moléculas.

A multinacional Novozymes® é líder mundial em produção enzimática, com origem dinamarquesa e há mais de 70 anos se dedicando à síntese de enzimas e microrganismos. A empresa realoca recursos para alcançar inovação de grande impacto, principal responsável pela produção industrial biotecnológica, produzindo diversas *carboidrases*. A celulase, pectinase e hemicelulase são exemplos que pertencem à classe das hidrolases, por utilizarem a molécula de água como receptor de grupos funcionais em outras moléculas.

As *carboidrases* são enzimas que catalisam a clivagem de carboidratos, hidrolisando as ligações glicosídicas entre os monossacarídeos que formam os polissacarídeos. Assim como toda enzima, as *carboidrases* são específicas com relação aos monossacarídeos envolvidos na ação, a posição de ligação, a configuração ou tipo de ligação (α ou β) e massa molecular do substrato.

Dentre os carboidratos presentes no reino vegetal, a celulose é considerada um polissacarídeo, devido ao tamanho de sua cadeia, apresenta β ligações entre glicoses (FIGURA 3). A pectina é um heteropolissacarídeo estrutural ramificado, estando presente em abundância na parede celular primária e na lamela média das células vegetais, não apresentando uma massa molar definida, podendo ter diferentes graus de metoxilação (GM). Outros carboidratos presentes na parede celular vegetal são lignina e hemiceluloses, que podem ser lineares ou ramificadas e de diferentes graus de polimerização.



Fonte: Edição do autor (2020).

Vários seres vivos são capazes de sintetizar as *carboidrases*, como animais, vegetais e diversos microrganismos. Os microrganismos têm sido usados para obter esse tipo de enzima em escala industrial, uma vez considerada a maior facilidade do processo de separação.

Um terço da massa da planta é constituído por celulose, esse composto não pode ser hidrolisado pelo sistema digestório de seres humanos (REIS et al., 2020). Componente estrutural para a célula vegetal, apresenta alta resistência mecânica, dificultando a difusão de compostos do meio externo para o interno e o contrário. O grão de café verde é constituído por

41-43 % de celulose e 5-10 % de hemicelulose (DURAN et al., 2017). Os teores médios de pectina total no grão de café variam de 1,59 a 1,92% e pectina solúvel entre 1,18 a 1,51%, sendo que esses valores não variam significativamente durante o armazenamento do grão (PIMENTA; VILELA, 2000; PIMENTA; VILELA; JUNIOR, 2004).

Celulases são enzimas responsáveis pela degradação de celulose, três enzimas fazem parte dessa classe, são elas: endoglucanases, exoglucanases e β -glucanases, todas capazes de clivar apenas β ligações. Essas enzimas podem ser sintetizadas por bactérias, fungos, alguns animais e pelas próprias plantas (ZHOU et al., 2021).

As pectinases são enzimas que degradam substâncias pécticas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Podem ser despolimerizantes ou desesterificantes e constantemente usada na indústria de alimentos para amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos. O seu uso proporciona um amolecimento no vegetal por desestruturar as substâncias que promovem sustentação ao fruto (DURAN et al., 2017).

Hemicelulases são enzimas capazes de hidrolisar as hemiceluloses, que constituem parede celular vegetal, dentre as mais conhecidas estão as xilanases, as arabanases e β – glicanases. Tem sido empregada na produção de etanol, aumento da digestibilidade de fibras alimentares da parede celular vegetal. Assim *carboidrases* têm grande importância industrial, hidrolisando açúcares compostos em menores, contribuindo para aperfeiçoamento de processos na biotecnologia.

Em relação à produção enzimática, existem diferentes origens das matérias-primas. O uso e a produção de enzimas, em diferentes áreas da agroindústria, mostram perspectivas promissoras devido ao caráter inerte das enzimas ao meio ambiente e saúde do manipulador, sendo produtos naturais e não contaminantes (SANTOS; FERRARI, 2005; MARATHE et al., 2019). Alguns estudos mostraram que enzimas são promissoras na contribuição de extração de óleo, principalmente, quando combinadas com processos mecânicos. Diversos compostos bioativos também podem ser extraídos, conforme podem ser conferidos alguns exemplos de estudos na Tabela 2.

Tabela 2- Estudos de extração de compostos bioativos com auxílio de enzimas em matrizes vegetais.

Estudo	Compostos bioativos	Resumo/Metodologia
Jiang <i>et al.</i> (2020)	Antocianinas presentes na espécie <i>Akebia trifoliata</i>	Placket-Burman para avaliar pH, pré-tratamento, razão sólido-líquido, razão entre <i>carboidrases</i>
Gorguç; Ozer; Yilmaz (2020)	Compostos fenólicos e atividade antioxidante no farelo de gergelim	Comparação entre extração por ultrassom com e sem uso de enzimas e otimização do processo
Hamdi <i>et al.</i> (2020)	Carotenóides na espécie <i>Portunus seignis</i>	Comparação dos métodos tradicionais com uso de solventes (isopropanol/hexano) e método enzimático
Zhang <i>et al.</i> (2020.b)	Antocianinas no resíduo de vinho da amoreira	Box-Behnker com três níveis para avaliar condições ótimas de processo como temperatura, quantidade de enzima e tempo de incubação das enzimas.
Alexandre <i>et al.</i> (2019)	Compostos fenólicos e atividade antioxidante na casca de romã.	Avaliação de pressão e das enzimas pectinase e celulase na extração de compostos fenólicos, atividade antimicrobiana.

Fonte: Compilado de estudos do autor (2020).

A estrutura microscópica das células vegetais é formada por uma parede rígida, composta basicamente de celulose associada a outros polissacarídeos como hemiceluloses e pectina. Uma das maneiras de provocar a ruptura desta parede celular é a hidrólise, utilizando enzimas como *carboidrases* e em alguns casos *proteases*, as quais liberam substâncias presentes na célula, tais como compostos fenólicos (OLIVEIRA, 2009).

Fatores que determinam a atividade enzimática são: pH, temperatura e relação substrato/enzima/produto. A velocidade de reação, geralmente, é baseada no modelo matemático, em que as enzimas estão sujeitas às leis da termodinâmica e cinética dos catalisadores químicos, isto é, alteram a velocidade da reação. O uso de enzimas favorece a

extração aquosa, porque acelera a quebra dos carboidratos na parede celular do vegetal, o que facilita a transferência dos compostos intracelulares.

Extrações aquosas sem uso de enzimas tendem a ser otimizadas em temperaturas mais elevadas, sendo a decomposição térmica apontada como uma causa para a redução do conteúdo de polifenóis em matrizes vegetais (ISLAM et al., 2020). Estudos apontam uma influência significativa e positiva da temperatura em extração não enzimática de compostos fenólicos (OKE et al., 2020; SANTOS et al., 2012). Entretanto, a temperatura aumenta a volatilização desses compostos, o que acaba reduzindo o teor dos mesmos em processos de temperaturas mais elevadas (GORGUÇ; OZER; YILMAZ 2020).

As *carboidrases* apresentam potencial para serem usadas em extração de óleo, compostos bioativos, entre outros compostos que são armazenados em organelas vegetais distribuídas no citoplasma celular.

Um estudo de Jiang et al. (2020) encontrou as condições ideais para a extração de antocianinas usando pectinase e celulase na razão 1:1, mostrando um método mais rápido e eficiente na espécie *Akebia trifoliata*, atingindo resultados superiores à extração aquosa convencional na temperatura de 100°C por 30 minutos. Entretanto, para extração de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante em casca de romã não houve aumento significativo quando foram usadas as enzimas pectinase e celulase, assim como a variação da pressão no processo não se mostrou eficaz para o aumento do rendimento (ALEXANDRE et al., 2019).

O foco atual das pesquisas na área de extração enzimática tem sido proporcionar um aumento do rendimento dos compostos desejáveis em matrizes vegetais, uma vez que a quebra da parede celular auxiliaria na liberação dos compostos intracelulares para o meio aquoso.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A otimização e o reaproveitamento dos resíduos em processos agroindustriais vêm se tornando estratégias fundamentais para uma produção mais sustentável no âmbito econômico e ambiental, visando uma melhor qualidade no ecossistema e utilização de recursos que antes eram subaproveitados. Com o reaproveitamento de materiais, há uma redução na demanda de novos recursos naturais e aumento na funcionalidade dos resíduos. O estudo com resíduos alternativos da cadeia cafeeira, como a torta gerada da extração mecânica do óleo, se mostra promissor e apresenta potencial de uso em indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos.

O mercado procura novas aplicações e nichos mercadológicos para a cultura cafeeira. Por tais pretextos, o presente estudo busca otimizar, em relação a sólidos solúveis, a extração enzimática com *carboidrases* de duas matrizes, o grão de café verde e a torta residual. Posteriormente, realizar análises físico-químicas dos extratos e comparar com grupos controle, onde as extrações ocorrem em mesmas condições, porém sem uso das enzimas.

Uma combinação de substâncias benéficas presentes no café verde e seus compostos bioativos, aliado com uma cadeia produtiva consolidada e estabilizada no Brasil, faz com que a aplicação do estudo possa se tornar uma realidade mercadológica ao longo do tempo a fim de valorizar a cultura cafeeira no país. As hipóteses do trabalho são: 1) as enzimas contribuem para o processo de extração aquosa, aumentando rendimento de compostos desejáveis por auxiliar na quebra da parede celular vegetal e que 2) a torta residual atinja resultados iguais ou superiores ao grão de café verde, uma vez que apresenta teores consideráveis de compostos bioativos, de acordo com estudos prévios.

Como sugestões para trabalhos posteriores e complementares:

- a) Aplicação do extrato em produtos cosméticos, farmacêuticos e posterior avaliação sensorial.
- b) Microencapsulação do extrato enzimático, avaliando distintos materiais de parede para uso em indústrias de cosméticos e farmacêutica.
- c) Avaliar outras enzimas e proporções, a fim de otimizar o processo.
- d) Verificar o potencial de compra de acordo com as características do produto.
- e) Estudo de viabilidade econômica e ambiental no aproveitamento da torta residual como matriz da extração enzimática.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, E. M. C. *et al.* Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and enzymatic assisted extraction. **Food Research International**, [Amsterdam], v. 115, p. 167-176, Jan. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096399691830680X>. Acesso em: 15 jul. 2020.
- ALVES, M. de C. *et al.* Ecological zoning of soybean rust, coffee rust and banana black sigatoka based on Brazilian climate changes. **Procedia Environmental Sciences**, [New York], v. 6, p. 35-49, Dec. 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878029611001071>. Acesso em: 20 ago. 2020.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, mar. 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/273026202_Antioxidantes_naturais_Tecnicas_de_extrao. Acesso em: 19 out. 2020.
- ANGELO P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, p. 1-9, jul. 2007. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v66n1/v66n1a01.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2020.
- BABOVA, O.; OCCHIPINT, A.; MAFFEI, M. E. Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. **Phytochemistry**, [Kidlington], v. 123, p. 33-39, Mar. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26837609/>. Acesso em: 22 out. 2020.
- BATES, M. N. Hexane exposure and persistent peripheral neuropathy in automotive technicians. **Neurotoxicology**, [Kidlington], v. 75, p. 24-29, Dec. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31445054/>. Acesso em: 30 jul. 2020.
- BRESINSKY, A. **Tratado de botânica de Strasburger**. 36. ed. São Paulo: Artmed, 2011. 1184 p.
- CEPEA/ESALQ - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **Preço dolarizado**. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/cafe.aspx>. Acesso em: 01 set. 2020.
- CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Herbal beverages: Bioactive compounds and their role in disease risk reduction - A review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, [New York], v. 8, n. 4, p. 451-458, Oct. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2225411017300986>. Acesso em: 17 set. 2020.

CHOON CHIAT, O. *et al.* Coffee, tea, caffeine, and risk of nonmelanoma skin cancer in a Chinese population: The Singapore Chinese Health Study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [New York], v. 81, n. 2, p. 395-402, Aug. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30731173/>. Acesso em: 11 jul. 2020.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO. **Acompanhamento da saca brasileira de café**. Brasília, 2019. Disponível em: conab.gov.br/info-agro/safra/cafe. Acesso em: 27 out. 2020.

COSTA, M. C. *et al.* Trigonelline and curcumin alone, but not in combination, counteract oxidative stress and inflammation and increase glycation product detoxification in the liver and kidney of mice with high-fat diet-induced obesity. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [New York], v. 76, p. 1-34, Feb. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955286319304504>. Acesso em: 13 ago. 2020.

DURAN, C. A. A. *et al.* Café: Aspectos gerais e seu aproveitamento para além da bebida. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, n. 1, Jan. 2017. Disponível em: <http://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/1970>. Acesso em: 22 set. 2020.

FERREIRA, I. N. M. *et al.* Caracterização anatômica dos órgãos vegetativos do cafeeiro arábica (*Coffea arabica* L.). **Fragments de Cultura**, Goiânia, v. 24, n. 1, p. 153-161, jan./mar. 2014. Disponível em: <https://docplayer.com.br/60617232-Characterizacao-anatomica-dos-orgaos-vegetativos-do-cafeeiro-arabica-coffee-arabica-l.html>. Acesso em: 27 ago. 2020.

FISCHER, T. W. *et al.* Differential effects of caffeine on hair shaft elongation, matrix and outer root sheath keratinocyte proliferation, and transforming growth factor- β 2/insulin-like growth factor-1-mediated regulation of the hair cycle in male and female human hair follicles in vitro. **British Journal of Dermatology**, [Malden], v. 171, n. 5, p. 1031-1043, Nov. 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24836650/>. Acesso em: 30 out. 2020.

FRANCA, A. S. *et al.* Microwave assisted thermal treatment of defective coffee beans press cake for the production of adsorbents. **Bioresource Technology**, [Kidlington], v. 101, n. 3, p. 1068-1074, Feb. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852409011687>. Acesso em: 16 out. 2020.

GIRELLI, A. M.; ASTOLFI, M. L.; SCUTO, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, [Kidlington], v. 244, p. 1-42, Apr. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653519326086>. Acesso em: 17 out. 2020.

GLESS, V. **Indústria usa óleo de café verde para fabricação de cosméticos**. Marketing Folha, 1998. Disponível em: <https://www1.folha.uol.com.br/fsp/agrofolh/fa28079806.htm>. Acesso em: 13 jul. 2020.

GORGUÇ, A.; OZER, P.; YILMAZ, F. M. Simultaneous effect of vacuum and ultrasound assisted enzymatic extraction on the recovery of plant protein and bioactive compounds from sesame bran. **Journal of Food Composition and Analysis**, [Kidlington], v. 87, Jan. 2020.

Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/319566952_Simultaneous_optimization_of_the_ultrasound-assisted_extraction_for_phenolic_compounds_content_and_antioxidant_activity_of_Lycium_ruthenicum_Murr_fruit_using_response_surface_methodology. Acesso em: 28 jul. 2020.

GRESES, S. *et al.* Agroindustrial waste as a resource for volatile fatty acids production via anaerobic fermentation. **Bioresource Technology**, [Kidlington], v. 297, Feb. 2020.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096085241931716X>. Acesso em: 22 ago. 2020.

HAMDI, M. *et al.* Development of novel high-selective extraction approach of carotenoproteins from blue crab (*Portunus segnis*) shells, contribution to the qualitative analysis of bioactive compounds by HR-ESI-MS. **Food Chemistry**, [Kidlington], v. 302, Jan. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31419773/>. Acesso em: 17 ago. 2020.

HU, B. *et al.* Oil extraction from tiger nut (*Cyperus esculentus* L.) using the combination of microwave-ultrasonic assisted aqueous enzymatic method - design, optimization and quality evaluation. **Journal of Chromatography A**, [Amsterdam], v. 1627, Sept. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967320306579>. Acesso em: 22 out. 2020.

ISLAM, M. Z. *et al.* Influence of selenium biofortification on the bioactive compounds and antioxidant activity of wheat microgreen extract. **Food Chemistry**, [Kidlington], v. 309, Mar. 2020. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814619318941>. Acesso em: 27 ago. 2020.

JIANG, Y. *et al.* Radio frequency-assisted enzymatic extraction of anthocyanins from *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. flowers: Process optimization, structure, and bioactivity determination. **Industrial Crops and Products**, [Amsterdam], v. 149, July 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669020302430>. Acesso em: 21 out. 2020.

KAMIL, M. *et al.* Comprehensive evaluation of the life cycle of liquid and solid fuels derived from recycled coffee waste. **Resources, Conservation and Recycling**, [New York], v. 150, p. 1044, Nov. 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921344919303416>. Acesso em: 17 ago. 2020.

KENNEDY, J. F.; LLOYD, L. L. **Enzyme nomenclature — Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 23, p. 291-292, 1994. Disponível em: qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme. Acesso em: 23 set. 2020.

- KHOSHNOUDI-NIA, S. *et al.* Loading of phenolic compounds into electrospun nanofibers and electrosprayed nanoparticles. **Trends in Food Science and Technology**, [New York], v. 95, p. 59-74, Jan. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092422441930127X>. Acesso em: 12 ago. 2020.
- LACHANCE J. C. *et al.* Targeting hallmarks of cancer with a food-system–based approach. **Nutrition**, [New York], v. 69, Jan. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0899900718306543>. Acesso em: 22 ago. 2020.
- LIMA, A. R. *et al.* Coffee bioactive compounds: in vitro antioxidant activity of green and roasted coffees before and after decaffeination. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, Sept. 2010. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0100-40422010000100004&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 19 ago. 2020.
- LIMA, R. B. *et al.* Heat stress causes alterations in the cell-wall polymers and anatomy of coffee leaves (*Coffea arabica L.*). **Carbohydrate Polymers**, [Kidlington], v. 93, n. 1, p. 135-143, Mar. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23465912/>. Acesso em: 12 set. 2020.
- LIMA, R. B. *et al.* Salt stress alters the cell wall polysaccharides and anatomy of coffee (*Coffea arabica L.*) leaf cells. **Carbohydrate Polymers**, [Kidlington], v. 112, p. 686-694, Nov. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861714006183>. Acesso em: 15 ago. 2020.
- MADUWANTHI, S. D. T.; MARAPANA, R. A. U. J. Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of banana (*Musa acuminata*, AAB) as affected by induced ripening agents. **Food Chemistry**, [Kidlington], v. 339, Mar. 2021. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814620317714?dgcid=rss_sd_all. Acesso em: 12 jul. 2020.
- MARATHE, S. J. *et al.* Improvements in the extraction of bioactive compounds by enzymes. **Current Opinion in Food Science**, [Netherlands], v. 25, p. 62-72, Feb. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214799318301474>. Acesso em: 19 set. 2020.
- NGUYEN, H. C. *et al.* Aqueous enzymatic extraction of polyunsaturated fatty acid–rich sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*) seed oil: An eco-friendly approach. **LWT - Food Science and Technology**, [Amsterdam], v. 133, Nov. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820309816>. Acesso em: 12 nov. 2020.
- OKE, E. O. *et al.* Phenolic compound extraction from Nigerian *Azadirachta Indica* leaves: response surface and neuro-fuzzy modelling performance evaluation with cuckoo search multi-objective optimization. **Results in Engineering**, [England], v. 29, 100160, Dec. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590123020300669>. Acesso em: 14 ago. 2020.

OLIVEIRA, E. R. *et al.* An investigation into green coffee press cake as a renewable source of bioactive compounds. **International Journal of Food Science and Technology**, [Malden], v. 54, n. 4, p. 1187-1196, Jan. 2019b. Disponível em: <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.14074>. Acesso em: 13 jul. 2020.

OLIVEIRA, J. A. R. **Extração de polifenóis das folhas do murucizeiro (*Byrsonima crassifolia*) por via enzimática**. 2009. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

OLIVEIRA, E. R. *et al.* Potential of alternative solvents to extract biologically active compounds from green coffee beans and its residue from the oil industry. **Food and Bioproducts Processing**, [England], v. 115, p. 47-58, May 2019a. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960308518305339>. Acesso em: 15 out. 2020.

ONTAWONG, A. *et al.* Hepatoprotective effect of coffee pulp aqueous extract combined with simvastatin against hepatic steatosis in high-fat diet-induced obese rats. **Journal of Functional Foods**, [Netherlands], v. 54, p. 568-577, Mar. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464619300738>. Acesso em: 23 jul. 2020.

PEREIRA G. V. M. *et al.* Exploring the impacts of postharvest processing on the aroma formation of coffee beans – A review. **Food Chemistry**, [Kidlington], v. 272, p. 441-452, Jan. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814618314663>. Acesso em: 30 set. 2020.

PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R.; CARVALHO JUNIOR, C. Componentes de parede celular de grãos de frutos de café (*Coffea arabica* L.) submetidos a diferentes tempos à espera da secagem. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 203-209, abr. 2004. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/1884>. Acesso em: 23 ago. 2020.

PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R. Qualidade do café (*Coffea arábica* L.) lavado e submetido a diferentes tempos de amontoa no terreiro. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 2, p. 3-10, 2000. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542003000600016. Acesso em: 13 set. 2020.

RADICE, M. *et al.* Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. **Fitoterapia**, [Amsterdam], v. 114, p. 144-162, Oct. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X1630377X>. Acesso em: 13 ago. 2020.

REIS, R. S. *et al.* Characterization of coffee parchment and innovative steam explosion treatment to obtain microfibrillated cellulose as potential composite reinforcement. **Journal of Materials Research and Technology**, [England], v. 9, n. 4, p. 9412-9421, July/Aug. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2238785420313685>. Acesso em: 21 set. 2020.

RIBEIRO, V. R. Bringing together *Saccharomyces cerevisiae* and bioactive compounds from plants: A new function for a well-known biosorbent. **Journal of Functional Foods**, [Netherlands], v. 60, June 2019. Disponível em: <https://www.x-mol.com/paper/5744880>. Acesso em: 13 out. 2020.

RIGAL, C. *et al.* Coffee production during the transition period from monoculture to agroforestry systems in near optimal growing conditions, in Yunnan Province. **Agricultural System**, [Kidlington], v. 177, Jan. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308521X18313842>. Acesso em: 13 set. 2020.

SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Natural products as photoprotection. **Journal of Cosmetic Dermatology**, [United States], v. 14, n. 1, p. 47-63, Mar. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25582033/>. Acesso em: 22 jul. 2020.

SALDAÑA, M. D. A.; MAZZAFERA, P.; MOHAMED, R. S. Extração dos alcalóides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com c supercrítico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, p. 371-376, dez. 1997. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611997000400005&lang=pt. Acesso em: 22 out. 2020.

SAMSONOWICZ, M. *et al.* Antioxidant properties of coffee substitutes rich in polyphenols and minerals. **Food Chemistry**, [Kidlington], v. 278, p. 101-109, Apr. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814618319915>. Acesso em: 13 jul. 2020.

SANTOS, D. T. *et al.* Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. **Journal of Food Engineering**, [Kidlington], v. 108, n. 3, p. 444-452, Feb. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877411004675>. Acesso em: 27 set. 2020.

SANTOS, R. D.; FERRARI, R. A. Extração aquosa enzimática de óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 132-138, mar. 2005. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612005000100022&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 17 set. 2020.

SILVA, M. L. C. *et al.* Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina-Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, July 2010. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/6510/0>. Acesso em: 13 set. 2020.

SINGH, R. S.; KAUR, N.; KENNEDY, J. H. Pullulan production from agro-industrial waste and its applications in food industry: A review. **Carbohydrate Polymers**, [Kidlington], v. 217, p. 46-57, Aug. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861719304436>. Acesso em: 14 ago. 2020.

SOUZA, T. S. P. *et al.* Effects of enzymatic extraction of oil and protein from almond cake on the physicochemical and functional properties of protein extracts. **Food and Bioproducts Processing**, [England], v. 122, p. 280-290, July 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960308520304375>. Acesso em: 19 set. 2020.

SPENCE, C.; CARVALHO F. M. The coffee drinking experience: Product extrinsic (atmospheric) influences on taste and choice. **Food Quality and Preference**, [Kidlington], v. 80, Mar. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0950329319304240>. Acesso em: 19 out. 2020.

SUCUPIRA, N. R. *et al.* Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, [England], v. 14, n. 4, p. 263-269, jul. 2012. Disponível em: <https://revista.pgskroton.com/index.php/JHealthSci/article/view/885>. Acesso em: 19 out. 2020.

TINOCO, H. A.; PEÑA, F. M. Mechanical and geometrical characterization of fruits *Coffea arabica* L. var. Colombia to simulate the ripening process by finite element analysis. **Engineering in Agriculture, Environment and Food**, [New York], v. 12, n. 3, p. 367-377, July 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1881836619301041>. Acesso em: 19 out. 2020.

TOLEDO HIJO, A. A. C. *et al.* Applications of ionic liquids in the food and bioproducts industries. **ASC Sustainable Chemistry and Engineering**, [England], v. 4, n. 10, p. 5347-5369, Aug. 2016. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssuschemeng.6b00560>. Acesso em: 19 set. 2020.

VILLARREYNA, R. *et al.* Economic constraints as drivers of coffee rust epidemics in Nicaragua. **Crop Protection**, [Kidlington], v. 127, Jan. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219419303266>. Acesso em: 9 out. 2020.

WU, Z. *et al.* Effect of cutting and storage temperature on sucrose and organic acids metabolism in postharvest melon fruit. **Postharvest Biology and Technology**, [Amsterdam], v. 161, Mar. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925521419304296>. Acesso em: 15 out. 2020.

XU, J. L. *et al.* Simultaneous roasting and extraction of green coffee beans by pressurized liquid extraction. **Food Chemistry**, [Kidlington], v. 281, p. 261-268, May 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814618321654>. Acesso em: 19 ago. 2020.

ZHANG, J. *et al.* Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review. **Trends in Food Science and Technology**, [England], v. 95, p. 183-195, Jan. 2020a. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224419303668>. Acesso em: 18 jul. 2020.

ZHANG, L. *et al.* Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and identification of anthocyanin components from mulberry wine residues. **Food Chemistry**, [Kidlington], v. 323, Sept. 2020b. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814620305768>. Acesso em: 19 out. 2020.

ZHOU, Z. *et al.* Charge-oriented strategies of tunable substrate affinity based on cellulase and biomass for improving in situ saccharification: A review. **Bioresource Technology**, [Kidlington], v. 319, 124159, Jan. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852420314334>. Acesso em: 19 out. 2020.

SEGUNDA PARTE- ARTIGO**OTIMIZAÇÃO E ESTUDO DA EXTRAÇÃO AQUOSA ENZIMÁTICA DE CAFÉ VERDE E SUA TORTA RESIDUAL****OPTIMIZATION AND STUDY OF THE ENZYMATIC WATER EXTRACTION OF GREEN COFFEE BEAN AND ITS RESIDUAL CAKE**

Artigo nas normas do periódico: *Journal of Cleaner Production*

ISSN: 0959-6526

Gabriel Ribeiro Carvalho¹, Maria Cecília Evangelista Vasconcelos Schiassi¹, Érica Resende de Oliveira², Soraia Vilela Borges, Jefferson dos Santos Oliveira¹, Evandro Galvão Tavares Menezes³; Fabiana Queiroz¹

- 1- Department of Food Science, Federal University of Lavras, Av. Dr. Sylvio Menecucci, 1001, Lavras, Brazil
- 2- Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiania, Brasil
- 3- Universidade Federal de Viçosa, Rodovia BR230 km 7, Rio Paranaíba, Brasil

Versão preliminar do artigo formado de acordo com as normas do periódico *Journal of Cleaner Production*

Original article

Highlights

- O aproveitamento de resíduos associado a uma tecnologia limpa são pilares para uma produção sustentável.
- A agroindústria gera uma série de subproduto contendo compostos bioativos e a extração aquosa é considerada uma alternativa limpa.
- A utilização da torta residual proveniente da prensagem do grão de café verde apresentou potencial para extração aquosa.
- Enzimas *carboidrases* aumentaram significativamente a extração de compostos de interesse comercial.

RESUMO

Os processos na agroindústria estão cada vez mais focados em sustentabilidade e assim há uma demanda de estudos relacionados ao aproveitamento de resíduos e também na busca por tecnologias mais limpas para o aproveitamento dos mesmos. A prensagem do grão de café verde gera um subproduto, conhecido como torta residual. Neste sentido o estudo avaliou o efeito da extração aquosa enzimática com *carboidrases* do grão de café verde e da torta residual. Foram avaliadas as variáveis ideais de pH, temperatura e tempo para a extração aquosa enzimática de sólidos solúveis totais no grão de café verde (GCe) e da torta residual (TRe) utilizando um delineamento central rotacional (DCCR). Na condição otimizada, foram caracterizados os extratos do grão de café verde e da torta, comparando-os com os resultados da extração aquosa sem enzimas, sob as mesmas condições. Para o grão de café a condição otimizada para extração enzimática aquosa foi de 75 minutos, pH 4,5 e temperatura de 49 °C, sendo para a torta 51 minutos, pH 5,0 e temperatura 46 °C. Os extratos obtidos da extração aquosa enzimática, quando comparados aos respectivos grupos controle, apresentaram aumento estatisticamente significativo na extração de cafeína por 100 g da matriz usada no processo (GCe: 0,32 g/100g TRe: 0,73g/ 100 g), compostos fenólicos (GCe: 3,06 g/100g, TRe: 3,85 g/100g), óleo (GCe: 0,44g/100g, TRe: 0,32 g/100g) e na atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS. Os açúcares redutores foram capazes de serem quantificados apenas nos extratos onde foi usado enzimas durante a extração. Esses resultados também mostraram o potencial da torta oriunda da prensagem do café verde como matéria-prima na produção do extrato rico em compostos bioativos. O uso de tecnologia limpa utilizando extração aquosa enzimática mostrou eficiente para extração de compostos desejáveis do café verde e da torta oriunda da prensagem.

Palavras-chave: *Carboidrases*; Compostos Fenólicos; Antioxidantes; Subprodutos.

1. Introdução

O café tem uma enorme importância na economia brasileira com tendência de crescimento e geração de renda. A *comoditie* é uma das bebidas mais consumidas no mundo, e atualmente tem se tornado também uma das culturas agrícolas com as mais diversas aplicações, podendo ser utilizado de matéria prima para produtos alimentícios (Iriondo-DeHond *et al.* 2019), veterinários, farmacêuticos (Bom, Jorge, Ribeiro, and Marto, 2019) e energético (Kamil *et al.* 2019; Chain-Guadarrama *et al.* 2019). Apesar das inovações de aplicação em uso para diversos fins, a produção de café arábica (*Coffea arabica*) ainda tem intuito econômico principalmente voltado para a produção da bebida (Kamiloglu, 2019). Entretanto, cresce no mercado a demanda de outros produtos do café, com alto valor agregado, entre estes tem-se, o óleo de café verde, além de extratos e compostos bioativos, como a cafeína, compostos fenólicos, entre outros.

A cultura do café é estável, consolidada e conta com uma ampla rede de agricultores e empresários, fazendo com que haja um grande potencial para aproveitamento alternativo dos grãos de café verde, ricos em compostos considerados bioativos, como ácidos clorogênicos e cafeína (Palmieri *et al.* 2018). Uma das alternativas de destino para o grão verde é a extração mecânica do seu óleo, que contém triglicerídeos e compostos bioativos lipofílicos (McNutt, and He, 2019).

O óleo de café verde tem sido extraído por prensagem a frio e sem uso de solventes, o que gera um produto de alta qualidade para indústria de cosmético e/ou farmacêutica, entretanto, com a desvantagem de baixo rendimento. Após a extração do óleo, a matéria residual chamada de torta ainda contém uma fração de óleo, além de compostos bioativos (Oliveira, Carvalho, Santos, and Queiroz, 2019), uma vez que essa extração mecânica não é capaz de retirar integralmente a fração oleosa do grão. Na indústria, essa torta prensada tem sido estudada para que seu destino não seja apenas o descarte (Franca, Oliveira, Nunes, and Alves, 2010). Uma alternativa, após a extração mecânica do óleo, seria a utilização de enzimas para extrair compostos bioativos desta torta residual.

As extrações sólido-líquido usando água como solvente são conhecidas como aquosa, havendo uma resistência à operação tecnológica para extrair compostos apolares (Zhao *et al.*, 2020), nesse sentido o uso de enzimas se mostra interessante, uma vez que a parede celular do café é rompida e facilita assim a difusão dos componentes para a fase extrato. Estudos mostram melhores rendimentos e eficiência no processo ao se introduzir enzimas na extração aquosa de compostos bioativos, como antocianinas (Jiang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020) e compostos

fenólicos (Gorguç, 2020) em matrizes vegetais. A utilização de enzimas para extração aquosa de óleo (Liu et al., 2019) e compostos bioativos (Marathe et al., 2019) vem sendo empregada com intuito de aumentar o rendimento sem uso de solventes orgânicos e sem modificar as moléculas desejáveis.

Enzimas *carboidrases* hidrolisam polímeros de carboidratos presentes na parede celular vegetal, facilitando o seu rompimento e a passagem de compostos do interior da célula para o meio aquoso. A extração enzimática de óleos vegetais pode ser afetada por pH, temperatura, tempo de exposição, razão sólido-solvente (Marathe, Jadhav, Bankar, Dubey, and Singhal, 2019). Existe acumulação do óleo nos espaços intracelulares em vegetais, assim as enzimas são capazes de afetar a estrutura das células com objetivo de melhorar a extração de óleo. Entretanto, a aplicação de um tratamento enzimático requer uma estratégia específica para cada caso (Santos, and Ferrari, 2005).

O objetivo desse estudo foi otimizar a extração aquosa enzimática de sólidos solúveis presentes no grão de café verde e na torta residual obtida por prensagem avaliando as variáveis independentes pH, tempo de exposição às enzimas e temperatura. Os extratos obtidos nas condições otimizadas foram caracterizados e comparados com a extração aquosa sem adição de enzimas.

2. Material e métodos

2.1. Preparação das matrizes: grão de café verde (GC) e torta residual (TR)

Grãos de café (GC) foram colhidos em Guaxupé (Minas Gerais, Brasil) no ano de 2017 e sua respectiva torta residual (TR) proveniente da extração mecânica de óleo passada por prensa contínua a 550 kg h^{-1} (Ecirtec, MPE-500 AC, Bauru, Brasil). Ambas matérias primas são da mesma espécie *Coffea arabica* e fornecidas pela mesma empresa (Cooxupé). Para realizar as extrações enzimáticas em GC e TR, as matrizes foram submetidas a nitrogênio líquido e moídas (IKA, A-11, Xangai, China). O pó obtido da moagem foi peneirado e para a extração utilizou-se o material com granulometria inferior a Mesh 28 (abertura de 0,6 mm). Posteriormente a peneiração, GC e TR foram secos na temperatura de $40 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e pressão de 16,8 kPa em estufa à vácuo (Tecnal, TE-395, Piracicaba, Brasil) por 7 dias e armazenados em dessecador com sílica para realização das análises.

2.2. Identificação das enzimas *carboidrases*

Para realizar a hidrólise da parede celular do café (GC) e torta residual (TR) foram selecionadas três enzimas para o estudo, classificadas como *carboidrases* pelo seu poder de atuação em quebrar macromoléculas de carboidratos. Todas as enzimas foram cedidas pela empresa Novozymes® (Bagsvaerd, Dinamarca) e mantidas constantemente refrigeradas a 5°C até o estudo. As enzimas foram usadas simultaneamente no processo, sabendo que misturas e complexos de atividades múltiplas são mais eficientes que enzimas isoladas (Sineiro, Dominguez, and Nuñez, 1998). A quantificação de proteína presente por mL de solução enzimática foi aferida de acordo com metodologia de Bradford (1976).

De acordo com a determinação de proteína pela metodologia de Bradford, a enzima Celluclast® 1.5 L apresentou 32,94 g de proteína por 100 mL de solução, Viscozyme® L com 15,6 g por 100 mL e a Pectinex® Ultra SP-L foram observados 5 g de proteína por 100 mL. As outras informações abaixo foram fornecidas pela empresa fornecedora das soluções enzimáticas.

A enzima Celluclast® 1.5 L é uma celulase com EC number 3.2.1.4 e atividade declarada de 700 EGU (Endoglucanase Unit) /g, pH de atuação ideal entre 4 e 6, e temperatura entre 50°C e 60°C. Produzida por *Trichoderma reesei* não modificado geneticamente, apresentada na forma líquida com densidade de 1,22 g/mL.

Visando o rompimento das ligações (1,3) e (1,4) nas beta-D-glucanas foi usada a enzima endo-beta-glucanase com atividades secundárias de xilanase e hemicelulase, comercialmente conhecida como Viscozyme® L. O produto é produzido pelo microrganismo *Aspergillus aculeatus* com EC number 3.2.1.6, atividade declarada de 100 FBC (Fungal Beta-Glucanase)/g. Sua atividade é ideal entre pH 3,3 e 5,5 e temperaturas entre 25 e 50°C.

Para diminuir a sustentação celular gerada pela pectina, foi usada a enzima poligalacturonase com atividade declarada de 3300 PGNU (Polygalacturonase Unit) /g. Com nome comercial de Pectinex® Ultra SP-L apresentando forma líquida e densidade de 1,17 g/mL, produzida pelo fungo *Aspergillus aculeatus* com EC number 3.2.1.15.

2.3. Processo de extração enzimática e quantificação de sólidos solúveis

Para controle do pH foram feitas 20 mL de soluções tampão a partir de ácido cítrico (0,1 M) e fosfato de sódio (0,2 M), de acordo com McIlvaine (1921), onde a proporção de cada solução era determinada através do pH do tratamento, no qual se objetivava e medido no instrumento próprio para conferência do meio onde ocorreria o processo. O procedimento de

extração e quantificação do extrato foi dividido em 3 etapas (etapa 1- agitação na incubadora com temperatura controlada; etapa 2- agitação mecânica; e etapa 3- centrifugação para separação das fases). A etapa do processo de extração enzimática e posterior etapa de quantificação de sólidos solúveis obtidos podem ser observadas na Figura 1.

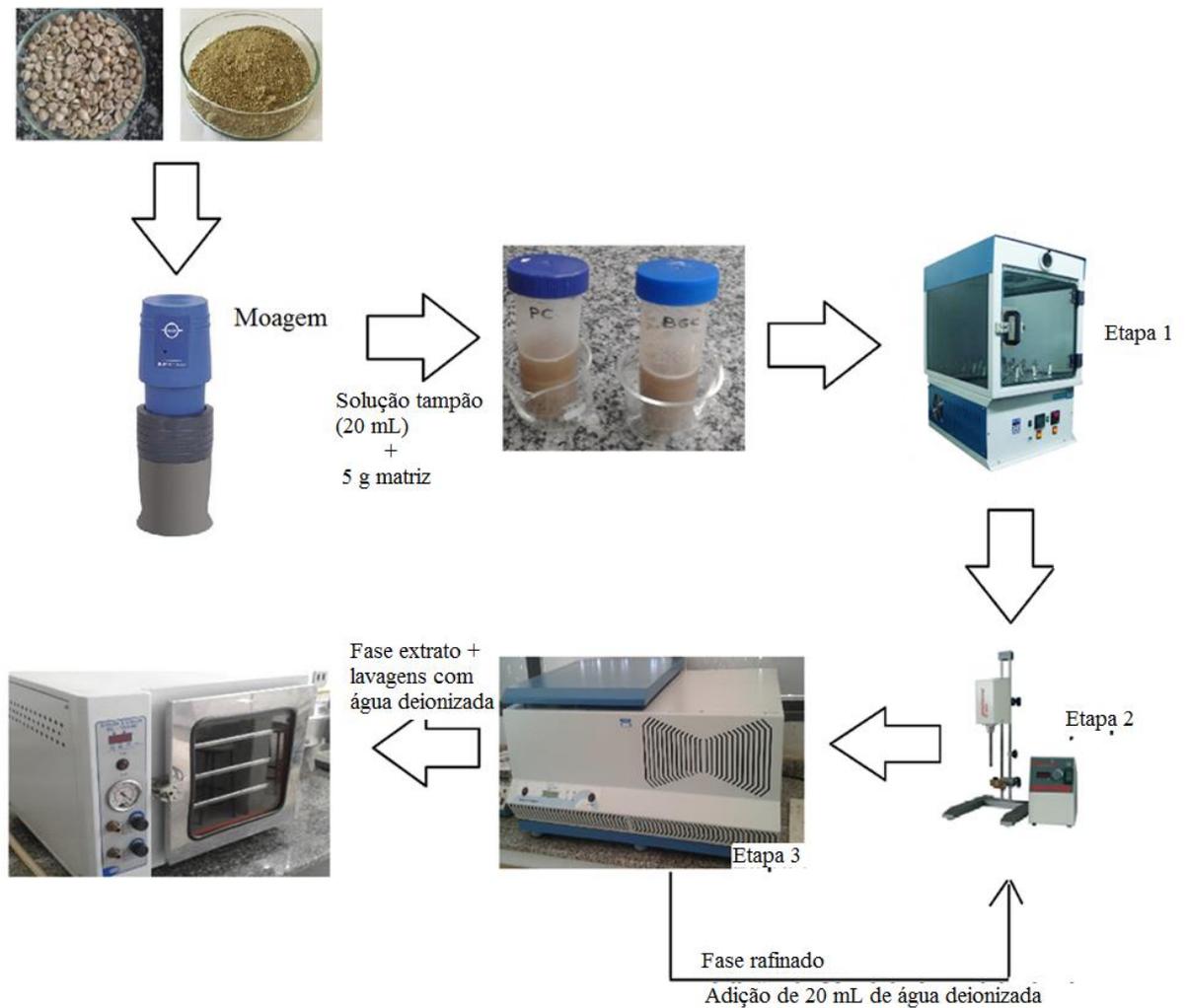


Figura 1- Processo enzimático e quantificação de sólidos solúveis na fase extrato.

A etapa 1 consistiu em adicionar 20 mL da solução tampão e 5 g da matriz seca moída (GC ou TR). Foi inserido 1 mL de cada enzima especificada no item 2.2 (correspondendo a 0,32 g de Celluclast®, 0,15 g de Viscozyme® L e 0,05 g de Pectinex® Ultra SP-L); o tubo foi submetido a agitação rotacional de 3,8 Hz na incubadora com a temperatura controlada de acordo com cada tratamento (Marconi MA 820/A, Piracicaba, Brasil), a partir dessa etapa foi considerado o início do processo enzimático que foi inspecionado com auxílio de cronômetro.

Após finalizado o tempo do tratamento foi realizada a etapa 2, onde se abriu o tubo e com auxílio de uma probe realizou-se processo mecânico de agitação por 120 segundos a 67 Hz (Politron TE102, Tecnal, Piracicaba, Brasil).

Posteriormente à agitação mecânica (etapa 2), o tubo foi fechado e colocado em um béquer com gelo e água, levando-o para a centrifugação a 6000 RPM por 10 minutos em centrífuga refrigerada (SP Labor Comércio, modelo SP-701, Presidente Prudente, Brasil). O sobrenadante foi separado e filtrado para cálculo de sólidos solúveis, determinado por secagem em placas de petri (etapa 3).

Ao isolar a fase extrato restou uma biomassa, com aparência de uma mistura pastosa e marrom, designada de fase refinado onde nessa fase foram adicionados 20 mL de água deionizada a 25°C para permear mais sólidos solúveis e voltou esse novo sistema para as etapas 2 e 3, repetindo tal processo por três vezes, a fim de exaurir os sólidos solúveis do refinado, porém sem utilização de enzimas. Para finalizar e quantificar a extração, a fase líquida adquirida foi seca em estufa a 105°C por 24 horas. O rendimento de sólidos solúveis do processo foi calculado por 100 g de matriz (GC ou TR), conforme Equação 1.

$$SS(\%) = \frac{m_{ss}}{m_m} \times 100 \quad (1)$$

Onde m_{ss} é a massa de sólidos solúveis na placa de petri, correspondente da extração e das etapas de lavagem e m_m é a massa de matriz usada no processo (aproximadamente 5 g). Devido aos materiais (grão de café e torta) terem passado pelo processo de secagem à vácuo e colocados em dessecador, foi considerado que esses materiais estariam isentos de umidade e assim os resultados obtidos são considerados em base seca.

2.4. Planejamento experimental e análise de resultados

Através do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) as variáveis tempo, pH e temperatura foram estudadas para prever a extração de sólidos solúveis para a fase extrato, a proporção das enzimas não foi objeto de estudo, sendo usada a quantidade recomendada pelo fornecedor. Um modelo matemático de segunda ordem foi gerado e

observou-se as suas superfícies respostas. Os pontos críticos (estacionários) foram encontrados com auxílio do mesmo software que os classificaram em máximo, mínimo ou de sela.

Na Tabela 1 é observado a transformação das variáveis reais para codificadas (Rodrigues and Iemma, 2014), os experimentos realizados e os resultados obtidos para as duas matrizes. A região do processo avaliada foi entre os tempos de 20 a 80 minutos, pH de 3 a 6 e temperatura de 30 a 60 °C.

Tabela 1- Transformação das variáveis reais em codificadas e delineamento utilizado.

Variável	-1,67	-1	0	1	1,67
t (min)	20	32	50	68	80
pH	3	3,6	4,5	5,4	6
T (°C)	30	36	45	54	60

Na Tabela 2 o delineamento experimental usando as variáveis codificadas podem ser observados para compreensão dos pontos experimentais, que a partir dos resultados em sólidos solúveis (SS%) foram gerados os modelos matemáticos e consequentemente as superfícies respostas.

Tabela 2- Delineamento experimental com as variáveis codificadas.

Tratamento (run)	tempo (min)	pH	T (°C)
1	-1	-1	-1
2	-1	1	1
3	1	-1	1
4	1	1	-1
5	0	0	0
6	-1	-1	1
7	-1	1	-1
8	1	-1	-1
9	1	1	1
10	0	0	0
11	-1.67	0	0
12	1.67	0	0
13	0	-1.67	0
14	0	1.67	0
15	0	0	-1.67
16	0	0	1.67
17	0	0	0

Os dados foram obtidos em duas repetições para cada corrida (*run*), gerando os modelos matemáticos e suas respectivas superfícies respostas para extrações aquosas enzimáticas de GC e TR com variável resposta sendo a média percentual de sólidos solúveis por massa de matriz (SS%) após a extração.

Posteriormente a validação da predição nas condições ótimas de cada material avaliou-se qualitativamente a presença de óleo na fase extrato em microscópio de luz, com imagens geradas em aumento total de 100x (modelo E100 LED, Nikon Instruments, Tóquio, Japão) e utilização do corante sudan III para identificação lipídica.

Os modelos gerados para GC e TR foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA), associando com os coeficientes lineares (β_i), quadráticos (β_i^2) e de interações entre dois fatores (β_{ij}) que tiveram seus p-valores calculados e classificados em significativos ($p < 0,05$) ou não significativos ($p > 0,05$). Após geração dos modelos matemáticos e superfícies respostas, foram encontrados os pontos estacionários para as duas matrizes (GC e TR) pela derivada parcial de primeira ordem e determinado se tal ponto é máximo, mínimo ou de sela pela derivada parcial de segunda ordem, com auxílio do software Statistica 10.0® (StatSoft, 2010).

Ao encontrar os pontos otimizados, as extrações aquosas enzimáticas foram realizadas usando essas variáveis de tempo, pH e temperatura a fim de equiparar com os valores preditos. As análises físico-químicas posteriores foram realizadas nos pontos otimizados para GC e TR, onde após realização da extração enzimática o extrato foi inserido em um balão volumétrico de 100 mL com volume completado com água deionizada e posteriormente armazenado em recipientes âmbar para futuras análises, também seguindo metodologia da Figura 1. As enzimas foram adicionadas apenas na etapa 1, sendo que o restante do processo aconteceu apenas com água deionizada.

2.5 Análises físico-químicas do extrato nas variáveis otimizadas

Foram determinadas as características dos extratos produzidos usando as enzimas (tratamentos GCe e TRe) e comparou-se com as características dos grupos controle, onde não havia uso das enzimas (tratamentos GCc e TRc). Os dados das análises foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e posterior teste de média, usando Scott-Knott ($p < 0,05$), sendo que os grupos controle (GCc e TRc) passaram pelo mesmo tratamento e variáveis de extração, com a única diferença de não ter sido usado enzimas no processo. As análises físico-químicas realizadas foram: teor de cafeína, fenólicos totais, poder antioxidante pelos radicais ABTS e DPPH, turbidez, quantificação do óleo e açúcares redutores, sendo realizadas em triplicata ($n=3$) e posterior estudo da correlação de Pearson.

2.5.1 Cafeína

A determinação de cafeína foi realizada utilizando espectrofotômetro (Spectrophotometer SP2000 UV, BelPhotonics, Piracicaba, Brasil) com comprimento de onda 273 nm, metodologia adaptada de Li et al. (1990). A princípio foram preparadas soluções padrão de cafeína em água nas concentrações: 10, 20, 50, 100 e 150 mg L⁻¹ para a construção da curva concentração *versus* absorbância.

Foram adicionados 0,3 g de óxido de magnésio (MgO) para remoção de taninos em 100 mL do extrato, aquecendo por 30 minutos a 90°C, completando vagarosamente com água deionizada para reposição da água evaporada, impedindo que houvesse grande diminuição no volume. Em seguida esperou esfriar o conteúdo para sua filtração, colocando o líquido em um balão volumétrico de 100 mL, a cafeína foi extraída com lavagens sucessivas de clorofórmio.

Após a extração clorofórmica ser completada em balão de 100 mL, uma alíquota de 4 mL da solução clorofórmica com auxílio de uma pipeta, foi adicionada em aproximadamente 30 mL de água deionizada em um béquer, colocando a mistura em uma chapa e misturando até todo clorofórmio evaporar, adicionando água aos poucos. Após esse procedimento a solução foi completada com água deionizada em um balão volumétrico de 50 mL. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro em cubetas de quartzo a 273 nm e inseridas no modelo gerado pela curva de calibração nas diferentes concentrações de cafeína para calcular a quantidade de cafeína extraída.

2.5.2 Compostos Fenólicos Totais

A determinação de fenólicos totais seguiu metodologia descrito em Waterhouse (2002) usando Folin-Ciocalteu (10%) com leitura realizada no espectrofotômetro (SP 22, VIS 325-1000 nm, Biospectro, Taboão da Serra, Brasil) a 750 nm de comprimento de onda e resultado expresso em mg de ácido gálico por 100 gramas da matriz usada no processo (mg GAE/100 g amostra), calculado baseando na curva de calibração.

Para construir a curva de calibração foram obtidas diferentes concentrações de ácido gálico em álcool etílico a partir da solução mãe (200 ug/mL). Para curva foram usados 0,5 mL de solução + 2,5 mL de Folin-Ciocalteu + 2 mL de carbonato de sódio (4%). Para zerar o espectrofotômetro foi usado 0,5 mL de álcool etílico puro. Os extratos foram diluídos para que suas leituras estivessem dentro da curva.

2.5.2.1 Identificação de compostos fenólicos por cromatografia

Foi usada pipeta para retirar 0,1 mL do extrato e diluir em metanol PA, a diluição foi centrifugada e filtrada para retirada de possíveis sólidos. Retirou-se, então, uma alíquota de 1 mL para ser previamente filtrada em micro membrana apolar (0,45µm) para ser introduzida na cromatografia HPLC de fase reversa (Shimadzu, GCMA-QP 2010Plus, Tóquio, Japão) com coluna C₁₈ Nova Pak, com medidas 7,8 x 30 cm. Soluções de compostos fenólicos foram

previamente usadas na mesma coluna como padrões cromatográficos para calcular a concentração dos compostos na fase extrato.

Os compostos fenólicos foram identificados de acordo com o tempo de retenção no equipamento e as áreas relativas dos picos foram calculadas usando soluções padrões dos compostos de interesse (Garzón et al., 2020).

De acordo com a área do pico para cada concentração do composto isolado foi construído um modelo onde a área do pico correspondia a determinada concentração do composto (mol/L), multiplicando pela massa molar do composto específico obtinha-se a concentração em massa (g/L), e de acordo com a diluição do extrato em metanol determinava-se a quantidade do composto presente na matriz (g do composto fenólico em 100 g da matriz).

2.5.3 Quantificação de óleo

A quantificação do óleo na fase extrato foi calculada através da diferença entre o óleo presente na matriz antes de passar pelo processo e depois, sendo usado éter de petróleo em aparato Soxhlet para quantificar a quantidade de óleo na fase refinado. Primeiramente foram analisadas a quantidade de extrato etéreo nas matrizes sem passar pelo processo de extração. Após processo de extração aquoso, as fases refinadas foram conduzidas para estufa à vácuo na pressão 16 kPa e temperatura de 50°C por 7 dias como pré-tratamento para a sua análise de extrato etéreo. O óleo na fase refinado após extração foi quantificado pela mesma metodologia em que as matrizes e a diferença foi considerada a quantidade de óleo na fase extrato.

2.5.4 Quantificação de açúcar redutor

As soluções de Fehling A e B, a solução padrão de glicose e a metodologia foram obtidas de acordo com Instituto Adolfo Lutz (2005).

Para determinação de açúcares redutores na fase extrato foi usado metodologia de Lane and Eynon, onde em um béquer 5 mL da solução de Fehling A (sulfato de cobre) e 5 mL da solução B (tartarato de sódio-potássio e hidróxido de sódio) e 10 mL de água destilada em chapa mantendo em ebulição para ser titulado e o corante azul de metileno foi usado para facilitar a identificação do ponto de viragem. A solução padrão de glicose (10 g/L) foi titulada para determinar a massa de açúcar redutor necessária para reduzir a solução de sulfato de cobre (Fehling A), através do volume do extrato gasto e comparando com a quantidade necessária para reduzir o cobre da solução de Fehling necessária para reduzir a mesma solução.

Determinando-se o volume da amostra que é convertido em concentração, usando a solução padrão de glicose.

2.5.5 Turbidez do extrato

A análise de turbidez do extrato seguiu metodologia adaptada de Meher et al. (2013), usando pipeta para coletar 2 mL do extrato e adicionar em balão volumétrico de 50 mL, completando com água deionizada. A leitura ocorreu em espectrofotômetro (SP 22, VIS 325-1000 nm, Biospectro, Taboão da Serra, Brasil) com radiação UV-vis de 600 nm e a solução sendo aplicada em cubeta de vidro, encontrando assim a transmitância (%) (Deotale, Dutta, Moses, and Anandharamakrishnan, 2019), com branco sendo usado água deionizada. Para determinação da turbidez foi usada a Equação 1 a partir do valor da transmitância.

$$\text{Turbidez (\%)} = 100 - \text{Transmitância(\%)} \quad (1)$$

2.5.6 Poder antioxidante com radical ABTS

A análise foi adaptada de Re et al. (1999), em que no presente trabalho o extrato já estava pronto, sendo que para determinar a capacidade antioxidante pelo método do radical ABTS•+ foi para comparar a quantidade de Trolox (antioxidante) que corresponde a 1 g da matriz, dessa maneira os resultados foram expressos em $\mu\text{mol Trolox/g}$ de matriz.

A curva de calibração foi determinada usando diferentes concentrações de solução Trolox em álcool etílico e a solução de ABTS manteve-se em ambiente escuro por 16 horas e foi diluída em álcool etílico até atingir absorvância na faixa de 0,65 até 0,75 em comprimento de onda de 734 nm lidas no espectrofotômetro.

A partir da equação encontrada no gráfico Absorvância x concentração de trolox, determinou-se a absorvância correspondente a 1000 μM Trolox. O extrato a ser avaliado foi diluído em diferentes concentrações para gerar a equação da absorvância em função da concentração do extrato usado, com leituras realizadas em comprimento de onda 734 nm. De acordo com a equação determinou-se a quantidade de Trolox correspondente a massa usada de matriz na fase extrato.

2.5.7 Poder antioxidante com radical DPPH por EC₅₀

O radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi estimado pelo método Blois (1958). A princípio foi determinada a absorvância do radical •DPPH como controle. Para determinação do poder antioxidante, uma alíquota de 3,9 mL da solução •DPPH (60µM) foi adicionada em 0,1 mL de extrato diluído (foram usadas 3 diluições distintas). O resultado foi expresso em EC₅₀ representando a quantidade de matriz necessária para reduzir a concentração do radical •DPPH pela metade (50%).

Para a curva de DPPH foram realizadas leituras em diferentes concentrações da solução de DPPH em álcool metílico em espectrofotometria a 515 nm. Determinou-se assim a curva Absorvância por concentração de DPPH (µM). Uma medição controle foi realizada para conhecimento de quanto corresponde a absorvância da solução de DPPH sem reação com antioxidante, para isso foi usado 0,1 mL de solução controle + 3,9 mL de DPPH e esperou-se 30 minutos para a leitura.

O extrato foi então diluído em três concentrações diferentes, sendo 0,1 mL dos extratos em diferentes concentrações adicionados em 3,9 mL e aguardou-se 30 minutos para a leitura, com os resultados construir a curva absorvância por concentração da matriz. A partir da equação encontrada, foi usado o valor da metade da concentração controle de DPPH, determinando a quantidade de matriz necessária para diminuir metade da concentração do radical DPPH (Curi et al., 2019).

2.6 Coeficiente de correlação linear de Pearson

Através dos resultados foi gerada uma Tabela de Correlação entre resultados obtidos no trabalho, sendo os atributos investigados: cafeína, fenólicos totais, turbidez, óleo, açúcar redutor e poder antioxidante (ABTS e DPPH) nas amostras, essa análise teve objetivo de compreender a dependência entre essas variáveis estudadas na fase extrato.

Esses coeficientes variam entre -1 a 1, sendo o sinal positivo uma colinearidade paralela, quando há uma tendência do aumento de um atributo estar relacionado com aumento do outro, já o sinal negativo é conhecido pela colinearidade oposta, ou seja, o aumento de um atributo tende a implicar a diminuição do outro atributo. Quanto maior aproximação do zero mais fraca é a correlação entre os atributos, onde o coeficiente r com módulo inferior a 0,3 é considerado fraco, entre 0,3 e 0,6 moderado, de 0,6 a 0,9 forte e maiores que 0,9 há correlação muito forte (Rodrigues and Lemma, 2014).

2.7 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram secas antes do preparo e das fases refinadas obtidas nas extrações do grão de café e da torta foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura a fim de identificar modificações morfológicas em detrimento do processo enzimático.

A morfologia das partículas foi realizada no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) do Departamento de Fitopatologia (Universidade Federal de Lavras). O material foi seco em estufa à vácuo e previamente colocados em stubs usando fita adesiva dupla face. As amostras passaram por banho de ouro em câmara anteriormente, para depois serem analisadas no equipamento LEO EVO 40 XVP (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), operando a 20 kV com taxa de magnitude entre 500 e 1000.

3. Resultados e discussão

3.1 Otimização do processo de extração enzimática

A Equação 2 refere-se ao modelo para grão de café verde (GC) e a Equação 3 para torta residual (TR), ambas sendo sólidos solúveis a variável resposta. Os modelos usados foram completos, ou seja, todos os termos (coeficientes) estão presentes, todavia, apenas os termos estatisticamente significantes ($p < 0,05$) estão em negrito. O coeficiente de determinação (R^2) do modelo para GC obtido no experimento foi de 0,96, enquanto para o modelo TR de 0,63.

$$SS.GC(\%) = \mathbf{47,2} + \mathbf{6,0}x_1 - \mathbf{2,2}x_1^2 + 0,2x_2 - \mathbf{2,1}x_2^2 + \mathbf{2,4}x_3 - \mathbf{4,1}x_3^2 - 0,4x_{12} + 0,5x_{13} + 0,7x_{23} \quad (2)$$

$$SS.TR(\%) = \mathbf{24,9} + 0,2x_1 - \mathbf{0,9}x_1^2 + \mathbf{0,7}x_2 - \mathbf{0,6}x_2^2 + 0,5x_3 - \mathbf{1,5}x_3^2 - 0,1x_{12} + 0,3x_{13} - 0,1x_{23} \quad (3)$$

Em que os termos codificados são para as seguintes variáveis:

x_1 é para o tempo,

x_2 para o pH e

x_3 para a temperatura.

Observou-se que quando foi usado grãos de café (GC) como matriz, obteve-se maior média de extração de sólidos solúveis, evidenciando que a torta residual (TR) apresentava menor concentração de sólidos a serem difundidas para o extrato, principalmente por ter sido processada anteriormente para extração de óleo, consequentemente menor quantidade de matéria para transferir (Oliveira, Carvalho, Santos, and Queiroz, 2019).

De acordo com as derivadas de primeira ordem, realizadas com auxílio do software Statistica 10®, apenas um ponto estacionário para cada matriz (GC e TR) foi encontrado e de acordo com a derivada de segunda ordem esses pontos estacionários foram identificados como máximo das regiões estudadas.

A atividade enzimática na matriz está diretamente relacionada com tempo de atuação, temperatura, pH e concentração das enzimas (Herrera, Sanchez-Chino, Corzo-Ríos, Davila-Ortiz, and Jimenez-Martinez, 2019), assim para GC, o processo que atinge maior extração de sólidos solúveis foi no tempo de 75 minutos, pH 4,5 e temperatura de 49 °C (tempo=1,4, pH=-0,01, temperatura=0,4; em variáveis codificadas), em contraponto, ao usar TR como matriz, o processo otimizado ocorre com tempo de 51 minutos, pH 5 e temperatura de 46 °C (tempo=0,1, pH=0,61, temperatura=0,16; em variáveis codificadas). As análises físico-químicas do item 2.2 foram realizadas a partir das condições operacionais otimizadas.

As superfícies respostas foram geradas para GC fixando o fator no ideal para o processo que foi encontrado para extração, conforme Figura 2. As superfícies respostas para torta residual não foram geradas, devido ao coeficiente de determinação (R^2) ser baixo.

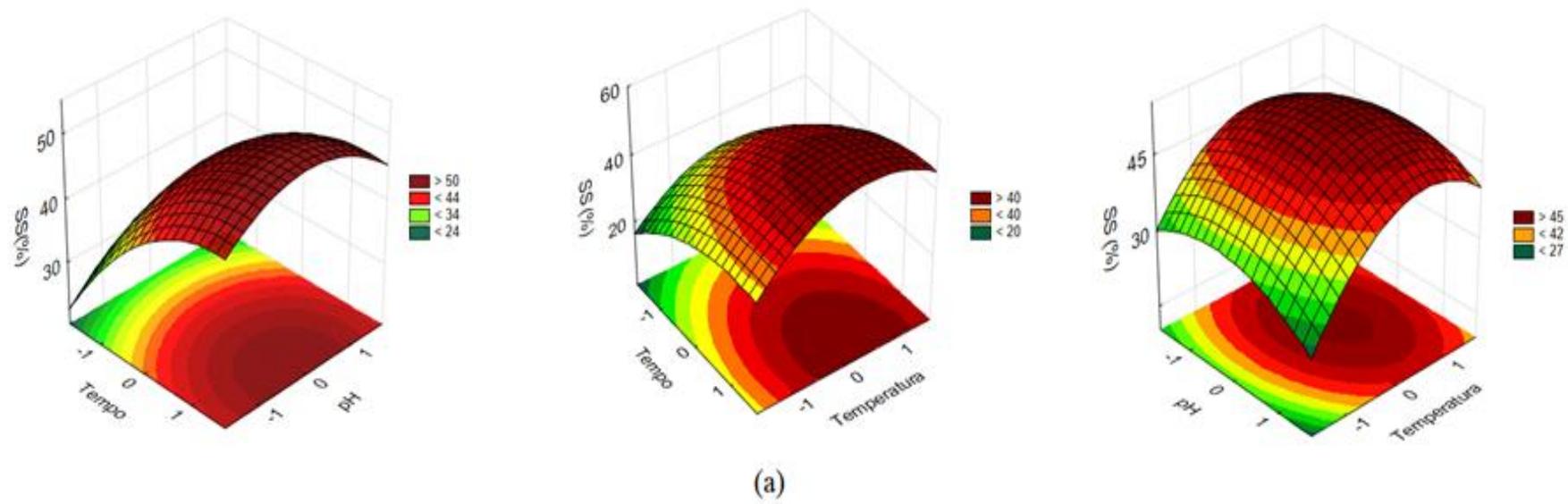


Figura 2- Superfícies Respostas em variáveis codificadas para extração enzimática em grão de café.

Na Figura 2 é possível observar o comportamento da extração de sólidos solúveis a partir do estudo de parâmetros do processo e de acordo com a micrografia foi possível identificar presença de óleo na fase extrato, em ambas as matrizes.

Processos de extração aquosa sem uso de enzimas visando obtenção de óleos aumentam o rendimento em temperaturas mais elevadas (Geng, Chen, Guo, Zhang, Li, and Yu, 2020), neste estudo não se identificou a relação direta e linearmente proporcional, uma vez que tanto para o grão de café (GCe) quanto para torta residual (TRe), os maiores resultados de sólidos solúveis ocorreram em temperaturas inferiores a 50 °C. Este fato evidencia que as enzimas hidrolisaram as moléculas presentes nas paredes celulares das matrizes em temperaturas mais brandas e contribuiu para difusão dos sólidos em direção à fase extrato.

Estudos preliminares apontaram influência do pH na atividade enzimática para as *carboidrases*. Geralmente o ponto ideal encontra-se entre 4 e 6 (Yan, Dibner, Knighnt, and Vazquez-Anon, 2017), e os pontos otimizados, tanto do grão quanto da torta, foram encontrados nessa faixa. O pH ideal para extração de sólidos solúveis no grão de café foi de 4,5 e na torta 5.

3.2 Estudo na região otimizada do processo e comparação com grupo controle

As análises físico-químicas foram realizadas nas extrações aquosas enzimáticas das duas matrizes (GCe e TRe) e comparadas com grupo controle (GCc e TRc), que foram submetidos ao mesmo procedimento, exceto por não se adicionar as enzimas. Os resultados da quantificação de cafeína (CAF), compostos fenólicos (TCF), óleo (OL) e açúcar redutor (ACR) na fase extrato, assim como percentual de turbidez (TUR) e poder antioxidante pelos métodos ABTS•+ e DPPH EC₅₀, podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3- Resultados das análises físico-químicas nas fases extratos (média \pm desvio padrão).

Tratamento	CAF (g/100g)	TCF (g/100g)	OL (g/100g)	ACR (g/100g)	TUR (%)	ABTS•+ (μmol trolox/g)	DPPH EC₅₀ (g / g DPPH)
GCe	0,32 \pm 0,02 ^c	3,06 \pm 0,30 ^b	0,44 \pm 0,02 ^a	7,7 \pm 0,4 ^b	83,4 \pm 0,3 ^a	184,1 \pm 2,5 ^a	309 \pm 7 ^b
GCc	0,14 \pm 0,02 ^d	2,27 \pm 0,21 ^c	0,37 \pm 0,01 ^a	*	56,8 \pm 0,2 ^b	114,0 \pm 2,4 ^d	338 \pm 8 ^a
TRe	0,73 \pm 0,10 ^a	3,85 \pm 0,51 ^a	0,32 \pm 0,07 ^b	8,6 \pm 0,5 ^a	32,3 \pm 0,3 ^d	153,6 \pm 8,4 ^b	238 \pm 14 ^d
TRc	0,46 \pm 0,07 ^b	3,20 \pm 0,30 ^b	0,27 \pm 0,04 ^b	*	40,2 \pm 0,2 ^c	127,3 \pm 4,7 ^c	258 \pm 4 ^c
GC**	0,83	10,1	8,61	-	-	25423	16,92
TR**	0,90	13,1	6,27	-	-	23832	18,48

Letras diferentes na mesma coluna demonstram que houve diferença significativa pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

* Não foi possível identificar presença de açúcares redutores suficientes na titulação, por não ser identificado ponto de viragem, de acordo com a metodologia adotada.

** Valores da caracterização das mesmas matrizes em estudos prévios (Oliveira et al., 2019).

A cafeína é uma metilxantina que inibe a germinação no grão, age como pesticida natural, pode estar presente na forma livre no citoplasma celular ou de forma complexada a outras moléculas (Rosa, Santos, Paiva, Melo, Veiga, and Veiga, 2006; Silveira et al., 2020). No organismo humano, quando ingerida, é metabolizada no fígado e estimula o sistema nervoso central (SNC), proporciona efeito termogênico, aumentando o metabolismo basal e diminuindo a sensação de fadiga (Londono-Hernandez et al., 2020).

O uso de enzimas aumentou significativamente a extração de cafeína na torta residual (0,73 g/100g), extraída em uma maior quantidade ao comparar-se com o grupo controle (0,46 g/100g). São encontrados 0,90 g de cafeína a cada 100 g de torta residual (Oliveira et al., 2019). O uso de enzimas na torta atingiu um rendimento de 81,1 % do total de cafeína presente, provavelmente porque o material já estava com sua parede celular desestruturada devido à prensagem mecânica, facilitando a difusão da cafeína.

Naturalmente, 100 g do grão de café verde arábica (base seca) apresenta entre 0,9 a 2,4 g de cafeína (Macheiner, Schimidt, Schreiner, and Mayer, 2019). Estudos prévios com os materiais usados no estudo apresentavam 0,83 g/100 g de cafeína no grão de café (Oliveira et

al., 2019) e a extração enzimática do presente trabalho obteve 0,32 g de cafeína para cada 100 g do grão usados (b.s.), representando 38,5% em relação à quantidade de cafeína total presente no grão.

Observou-se, assim, que mesmo com uso das enzimas não foi possível extrair toda a cafeína do grão, apesar de ter sido significativamente superior aos grupos controles. Esse resultado pode ter relação com as temperaturas nos processos, mais brandas em relação às temperaturas ideais de extração para a cafeína (Lopes et al., 2020).

Assim como a cafeína, os tratamentos que apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos foram que usaram a torta como matriz, e, o uso de enzimas extraiu maior quantidade de fenólicos totais em relação aos grupos controle. O processo de extração enzimática na torta (TRe) atingiu um extrato com níveis de 3,85 g para cada 100 g de matriz (representando 29,3% do total que poderia ser extraído da torta), enquanto o grupo controle usando torta (TRc) 3,20 g e os compostos fenólicos no grão foram extraídos em menores quantidades para cada 100g de matriz, atingindo 3,06 g (representando 30,5%) na extração enzimática do grão (GCe), significativamente superior aos 2,27 g no tratamento controle (GCc).

Os compostos fenólicos estão altamente presentes no reino vegetal como metabólitos secundários e sua ingestão oferece potenciais benefícios para a saúde de seres humanos, como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobiana e antitumoral (Khoshnoudi-Nia, Sharif, and Jafari, 2020). A presença desses compostos nos alimentos tende a aumentar a atividade antioxidante do produto (Castro, Oda, and Almeida-Cincotto, 2018).

O grão de café usado no estudo apresentava um teor de 8,61% de óleo e sua torta residual 6,27% (base seca), de acordo com metodologia de refluxo por soxhlet com solvente n-hexano (Oliveira, Carvalho, Santos, and Queiroz, 2019). Na extração aquosa, os tratamentos que usaram grão de café (GCe e GCc) apresentaram valores significativamente maiores de extração de óleo em relação aos tratamentos que tiveram a torta como matriz (TRe e TRc), mostrando que a matriz usada influenciou a quantidade de teor de óleo na fase extrato, onde o grão apresentava quantidade inicial superior em relação à torta. Os resultados se mostraram aquém da quantidade inicial de óleo presente na matriz, representando 5,1 % de rendimento tanto no grão como na torta no processo com uso de enzimas, observando assim a baixa eficiência de solventes aquosos para extração de óleo, uma vez que outros solventes e técnicas apresentam desempenhos superiores para extração de lipídios (Bitencourt et al., 2020).

O óleo de café verde traz benefícios à saúde quando usado na alimentação, como a diminuição de LDL e glicemia em níveis séricos, contudo, deve-se levar em consideração possíveis toxicidades da substância, apesar de estudos garantirem que a ingestão de doses inferiores a 2000 mg/kg/dia serem consideradas seguras (Oliveira et al., 2020). O óleo também pode ser matéria-prima para cosméticos e produtos farmacêuticos para uso tópico, apesar da pouca quantidade de óleo extraída.

De acordo com a análise realizada para quantificação de açúcares redutores não foi possível identificar pela titulação a sua presença nos grupos controle. Assim, os resultados para açúcar redutor foram considerados como zero nos tratamentos que não reduziram o cobre durante a análise de Lane and Eynon. Todavia, foi observado que para os processos enzimáticos foram identificados 7,7 com uso de grão e 8,6 g com a da torta de açúcar redutor para cada 100 g de matriz usada no processo, o que representou diferença significativa entre as matrizes ($p < 0,05$).

O processo enzimático com uso de *carboidrases* constitui em clivagem de macromoléculas de carboidratos da parede celular vegetal em moléculas menores e esses produtos resultantes apresentam a capacidade de redução pela presença de um grupo aldeído ou cetona livre (Li, Ray, Callow, Loman, Islam, and Ju, 2020). Assim, constatou-se que não houve permeação dos açúcares redutores dos materiais para o extrato aquoso nos grupos controle suficientes para reduzir o cobre, evidenciando que houve um aumento de açúcares redutores na fase extrato advindos da quebra da parede celular das matrizes pelo uso das enzimas. De acordo com estudos prévios o grão de café usado como matriz apresentava 13,05 g/100 g de açúcares totais, enquanto a torta residual 14,4g/ 100g (Oliveira, Carvalho, Santos, and Queiroz, 2019).

A turbidez é uma análise que identifica a redução da transparência e está relacionada com quantidade de materiais em suspensão que podem ser desde partículas coloidais até sólidos de dimensões macroscópicas (Deotale et al., 2019). O diâmetro das partículas influencia na turbidez observada, onde há uma tendência em que sistemas com menores gotículas são mais turbidos em relação aos que apresentam maiores gotículas (Maher et al., 2013), podendo a turbidez estar relacionada com a quantidade de óleo no extrato. Os tratamentos apresentaram resultados estatisticamente diferentes, com a TRe sendo com menor percentual de turbidez e GCe o maior.

As atividades antioxidante dos extratos foram avaliadas por duas metodologias consolidadas, a primeira usando o radical ABTS•+, correspondendo a quantidade equivalente de Trolox (μmol) no extrato para cada grama da matriz usada, sendo assim, quanto maior seu

valor, maior é a atividade antioxidante. A metodologia DPPH EC₅₀ tem seu resultado expresso em massa necessária da matriz para reduzir um grama do radical DPPH pela metade da concentração inicial. Nessa segunda metodologia, os tratamentos com maiores valores representam extratos com menores atividades antioxidantes.

De acordo com as duas metodologias avaliadas, todos os tratamentos tiveram diferença significativa ($p < 0,05$), o tratamento que usou grão de café sem enzimas (GCc) foi o que apresentou menor atividade antioxidante e também foi constatado que o uso de enzimas aumenta a atividade antioxidante do extrato.

Apesar dessas similaridades entre as metodologias empregadas, algumas diferenças foram observadas. Para ABTS•+ as maiores atividades antioxidante foram quando havia presença de enzima, primeiramente do grão de café (GCe), seguido pela torta (TRe). No caso da metodologia DPPH EC₅₀ as atividades antioxidantes que se destacaram foram devido a utilização da torta como matriz (TRe= 238 ± 14 g / g DPPH) e (TRc= 258 ± 4 g / g DPPH).

Outros estudos também mostraram que havia diferenças entre metodologias para atividade antioxidante *in vitro*, devido as rotas bioquímicas que inibem os radicais (Rafique et al., 2020; Oliveira et al., 2019). Apesar dos métodos e radicais usados para identificar a atividade antioxidante possuir suas limitações, essas análises são consideradas protocolos recomendados (Schmidt et al., 2020).

O estudo e análise de viabilidade técnica de extrações usando meios aquosos é interessante por se tratar de um solvente inócuo diminuindo o risco aos manipuladores e prejuízos ambientais causados por alguns solventes.

O processo com enzimas apresentou bons rendimentos para a extração de cafeína na torta (rendimento: 81,1%), porém ainda precisa ser aperfeiçoado para atingir melhores resultados de extração, uma vez que a quantidade de óleo (rendimento: 5,1% para grão e para torta), compostos fenólicos (rendimento: 30,5% para grão e 29,3% para torta) e atividade antioxidante foram resultados bem inferiores do que os obtidos pelos métodos tradicionais, evidenciando que havia uma quantidade interessante ainda a ser extraída de compostos desejáveis. A assistência por ultrassom tem se mostrado eficaz para extração de compostos bioativos (Gorguç, Ozer, and Yilmaz, 2020), o que poderia estar associada com aumento do rendimento do processo enzimático, sendo uma possibilidade de estudo para melhorar o desempenho do processo.

3.2.1 Perfil dos compostos fenólicos

O perfil de compostos fenólicos das extrações enzimáticas e grupos controle para grão e torta estão expressos na Tabela 4. O uso de torta residual (TR) como matriz mostrou maior eficiência em relação ao grão de café (GC) para ácidos clorogênicos e cafeíco. Na Tabela 4 tem-se os resultados da quantidade do composto fenólico extraído (g) para cada 100 g de matriz usada no processo.

Tabela 4- Perfil de compostos fenólicos nas fases extratos (g/ 100g base seca) para grão de café usando enzimas (GCe) e sem uso de enzimas (GCc) e para torta usando enzimas (TRe) e sem uso de enzimas (TRc)

Composto fenólico (CID-PubChem)	GCe	TRe	GCc	TRc
Ac. Clorogênico (1794427)	0,39	1,57	0,23	0,91
Ac. Cafeíco (689043)	0,12	0,92	*	0,67
Vanilina (1183)	0,08	0,02	0,04	0,01
p-cumárico (637542)	0,04	0,01	*	*
Ac. Ferrúlico (445858)	0,16	0,04	*	0,03
o-cumárico (1530234)	0,02	*	*	*
Resveratrol (445154)	0,01	*	*	*

* Não foi possível identificar picos em todas as leituras no cromatograma.

De acordo com resultados da cromatografia (HPLC) foi possível observar ácidos clorogênicos e vanilina em todos os tratamentos, independente do uso de enzimas. Foi possível identificar ácido cafeíco, p-cumárico e ácido ferrúlico nas matrizes que passaram pelo processo enzimático. O único tratamento que apresentou o-cumárico e resveratrol foi o enzimático com grão de café usado como matriz.

Segundo estudo de Cheong et al. (2013), o grão de café apresenta 2,9 a 3,2 g de ácidos clorogênicos e 0,02 a 0,05 g de ácido cafeíco por 100 g de grão (base seca). De acordo com estudo da extração aquosa no grão de café, sem uso de enzimas, foi possível extrair ácidos clorogênicos e vanilina em menores quantidades, porém, os outros compostos fenólicos não foram identificados na fase extrato, mostrando, portanto, a importância da atividade enzimática

no processo, uma vez que além de aumentar a quantidade de compostos fenólicos na fase extrato, também diversifica os compostos com distintas polaridades. A água é uma substância polar e por isso existe uma tendência dos compostos presentes no extrato aquoso serem substâncias mais polares. Dessa forma, a solubilidade em um determinado solvente é característica peculiar do composto fenólico, por isso a inexistência de um procedimento de extração universal (Naczka and Shahidi, 2004).

O ácido p-cumárico (CID 637542) só esteve presente na extração que se usou enzimas. Este composto apresenta efeito cicatrizante, capacidade de eliminar radicais livres e atividade anti-úlceras (Pragasam, Venkatesan, and Rasool, 2013), consumido diretamente na alimentação e em produtos de saúde, apresentando diversos benefícios aos indivíduos, como auxiliar em desintoxicação celular (Mitton et al, 2020).

3.3 Correlação linear de Pearson

Os valores dos coeficientes da correlação linear de Pearson obtidos entre as análises realizadas do estudo na fase extrato estão apresentados na Tabela 5, onde cada linha representa a correlação de um atributo com respectivos atributos estudados e referenciados nas colunas.

Tabela 5- Coeficientes de correlação linear de Pearson (*r*) entre as análises da fase extrato.

	CAF	TCF	OL	ACR	TUR	ABTS	DPPH**
CAF	1	0,891*	-0,364	0,575	-0,627*	0,308	-0,926*
TCF		1	-0,135	0,624*	-0,428	0,444	-0,812*
OL			1	0,394	0,801*	0,551	0,567
ACR				1	0,167	0,856*	-0,355
TUR					1	0,526	0,706*
ABTS						1	-0,164
DPPH							1

* coeficientes de Pearson estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

** Valores correspondentes a EC_{50} (quanto maior o valor deste atributo menor a sua atividade antioxidante).

De acordo com a Tabela 5, o teor de cafeína nos extratos apresentou correlações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) positiva forte com teor de fenólicos totais (0,891) e oposta em relação a turbidez (-0,672) e DPPH (-0,926), sendo que o coeficiente da cafeína e DPPH é considerado muito forte e quanto maior o poder antioxidante nessa análise, menor seus

valores; assim a cafeína está diretamente relacionada com poder antioxidante das amostras, obtidos pelo método de DPPH. A cafeína tem propriedades terapêuticas, estimulando sistema nervoso central, muscular e cardiovascular (Del Pozo et al., 2020) e em alguns estudos mostram evidências de sua colaboração, junto com a dos compostos fenólicos, na atividade antioxidante *in vitro* usando a redução do radical DPPH (Chen et al., 2020).

Um estudo de Vidal-Gutierrez et al. (2020) mostrou correlação muito forte entre compostos fenólicos e atividade antioxidante na espécie *Bursera microphylla*, independente da metodologia usada, assim como outros estudos evidenciam o efeito da presença de compostos fenólicos nas suas propriedades antioxidantes e até sensoriais (Barbosa, Scholz, Kitzberger, and Benassi, 2019). O presente estudo obteve uma correlação significativa e forte entre compostos fenólicos e DPPH (-0,812), todavia, para metodologia usando radical ABTS a correlação foi classificada como moderada (0,444) e sem significância estatística ($p > 0,05$). O teor de compostos fenólicos apresentou correlação significativa com a quantidade de açúcares redutores (0,624), sendo essa positiva, onde as únicas amostras que conseguiram registrar quantidades de açúcares redutores, pela metodologia empregada, foram as que utilizaram enzimas no processo (GCe e TRe).

Tanto os extratos oriundos do grão de café como os da torta apresentaram presença de óleo. Entre os atributos estudados o óleo apresenta correlação significativa ($p < 0,05$) apenas com a turbidez (0,801). A presença de óleo no extrato não formou duas fases, aparentemente uma fase homogênea, o que seria um indicativo para que o óleo não se apresentasse de forma livre, mas constituindo uma emulsão. A presença de maiores quantidades de gotículas emulsionadas no sistema tende a aumentar a turbidez do mesmo, assim como a quebra da emulsão diminuiria a turbidez do meio (Ke et al., 2020).

A presença de açúcares redutores neste estudo foi observada apenas nos tratamentos onde foram usadas as carboidrases no processo e esses foram os processos com maior poder antioxidante pelo radical ABTS, devido a esse fenômeno, o coeficiente de correlação entre ABTS e açúcar redutor foi significativo ($p < 0,05$) e forte (0,856). O grão de café e sua torta têm uma quantidade significativa de compostos bioativos que possuem poder antioxidante dentro de suas células vegetais. Portanto, o processo com uso de enzima, além de gerar açúcares redutores, faz com que os compostos bioativos sejam mais facilmente difundidos para a fase extrato.

No presente trabalho não foi possível determinar correlação estatisticamente significativa entre as duas metodologias usadas para atividade antioxidante, ABTS e DPPH.

No organismo humano a atividade antioxidante está relacionada com uma série de fatores que não são controlados nos experimentos *in vitro* (Moyo et al., 2020).

3.4 Avaliação morfológica da fase refinado

A avaliação morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) teve como objetivo identificar as mudanças morfológicas ocorridas no grão de café verde e na torta da extração por prensagem submetidas a extração aquosa com e sem enzimas.

Características e detalhes de superfície dos materiais são facilmente observados na micrografia eletrônica de varredura (Carvalho et al., 2019). De acordo com a Figura 3 o efeito das enzimas foi observado na fase refinado mostrando a abertura dos tecidos, tanto no grão quanto na torta. Esse fenômeno explica a maior transferência de cafeína, compostos fenólicos e atividade antioxidante nos tratamentos enzimáticos quando comparados com os controles.

Durante o processo com *carboidrases* há clivagem de macromoléculas de carboidratos do tecido vegetal, resultando em moléculas menores conhecidas como açúcares redutores (McCormick, Muldoon, and McCrudden, 2021) que permeiam para a fase extrato, justificando a identificação desses nos tratamentos enzimáticos na análise por titulação. Essa clivagem modificou a morfologia dos grãos de café de maneira que deixou mais aparente o interior, também é possível observar que a torta apresentou um formato esfarelado por ter sido prensada durante a extração mecânica do óleo.

A morfologia da fase refinado da torta após passar pelo processo enzimático se transforma em pequenos fragmentos, constatando presença significativa desses inferiores a 20 μm , essa fragmentação é apontada como uma das principais causas dos tratamentos enzimáticos apresentarem maiores teores das substâncias analisadas.

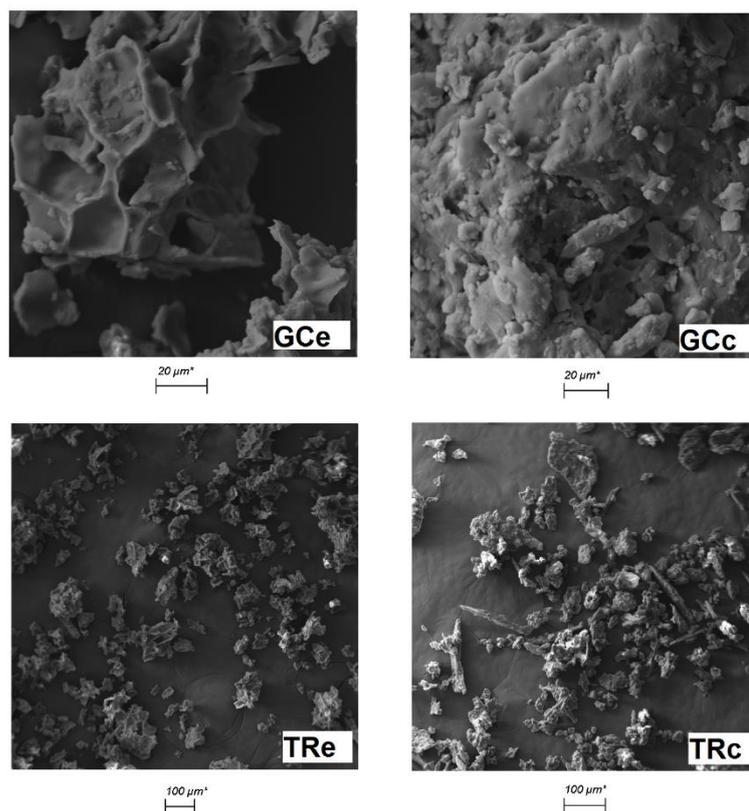


Figura 3- Micrografia eletrônica de varredura das fases refinadas após secagem do grão de café com uso de enzimas (GCe) e sem uso de enzimas (GCc) e da torta com uso de enzimas (TRe) e sem o uso (TRc)

4. Conclusão

O estudo mostrou que as condições de extração para o grão de café verde e a sua torta residual apresentaram comportamentos similares com algumas individualidades, ambas as matrizes sofreram influência de *carboidrases* que têm suas atividades modificadas de acordo com pH, temperatura e tempo, sem inferências estatísticas que haja interação entre os fatores estudados. Mostrou também que havia presença de lipídios na fase extrato após uso de enzimas, ficando evidente o potencial para extração enzimática para o grão verde e também para a torta, que em algumas variáveis apresentaram resultados superiores ao grão.

De acordo com a caracterização realizada foi possível constatar açúcares redutores no processo enzimático e aumento significativo de cafeína, compostos fenólicos e poder antioxidante, uma vez que a parede celular do grão e da torta foram clivadas e assim facilitou a transferência de tais compostos para fase extrato.

O estudo constatou que o uso de enzimas aumentou o rendimento do processo aquoso, que pode ser considerado limpo, devido a não utilizar solventes orgânicos nocivos ao ambiente e aos manipuladores e também foi observado que a torta, um resíduo da extração mecânica do óleo, tem potencial para ser usada no processo, inclusive com alguns resultados superiores ao próprio grão de café.

Agradecimentos: Os autores agradecem a FAPEMIG e a Capes (Código 001) pelo financiamento da pesquisa; a Cooxupé pelo fornecimento do café e respectiva torta; a Novozymes® pela doação das enzimas e por sempre estar disponível a oferecer informações de uso das mesmas; aos Departamentos de Fitopatologia, de Química e de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- *Barbosa, M. S. G., Scholz, M. B. S., Kitzberg, C. S. G., Benassi, M. T., 2019. Correlation between the composition of green Arabica coffee beans and the sensory quality of coffee brews. *Food Chemistry*, v. 292, p. 275-280.
- *Bitencourt, R. G., Mello, F. M. P. A., Cabral, F.A., Meirelles, A. J. A., 2020. High-pressure fractionation of spent coffee grounds oil using green solvents. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 157, 104689.
- *Blois, M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200.
- *Bom, S., Jorge, J., Ribeiro, H. M., Marto J., 2019. A step forward on sustainability in the cosmetics industry: A review. *Journal of Cleaner Production*, v. 225, p. 270-290.
- *Bradford, M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254.
- *Carvalho, G. R., Fernandes, R. V. B., Silva, P. C., Dessimoni, A. L. A., Oliveira, C. R., Borges, S. V., Botrel, D. A., 2019. Influence of modified starches as wall materials on the properties of spray-dried lemongrass oil. *Journal of Food Science and Technology*, v. 56, 4272-4981.
- *Castro, A. C. C. M., Oda, F. B., Almeida-Cincotto, M. G. J., 2018. Green coffee residue: a sustainable source of antioxidant compounds. *Food Chemistry*, v. 246, p. 48-57.

- *Chain-Guadarrama, A., Martinez-Salinas, A., Aristizabal, N., Ricketts, T. H., 2019. Ecosystem services by birds and bees to coffee in a changing climate: A review of coffee berry borer control and pollination. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 280, p. 53-67.
- *Chen, N., Han, B., Fan, X., Cai, F., Ren, F., ..., Yi, L., 2020. Uncovering the antioxidant characteristics of black tea by coupling in vitro free radical scavenging assay with UHPLC–HRMS analysis. *Journal of Chromatography B*, v. 1145, 1220.
- *Cheong, M. W., Tong, K. H., Ong, J. J. M., Liu, S. Q., Curran, P., Yu, B., 2013. Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. *Food Research International*, 51, 388–396.
- *Curi, P. N., Albergaria, F. C., Pio, R., Schiassi, M. C. E. V., Souza, V. R., 2019. Characterisation and jelly processing potential of different fig cultivars. *British Food Journal*, v. 121, p. 1686-1699.
- *Del Pozo, C., Bartroli, J., Alier, S., Puy, N., Fabregas, E., 2020. Production of antioxidants and other value-added compounds from coffee silverskin via pyrolysis under a biorefinery approach. *Waste Management*, v. 109, p.19-27.
- *Deotale, S. M., Dutta, S., Moses, J. A., and Anandharamakrishnan, C., 2019. Coffee oil as a natural surfactante. *Food Chemistry*, v. 295, p. 180-188.
- *Iriundo-DeHond, A., Aparicio, N. G., Fernandez-Gomez, B. Guisantes-Batan, E., Velazquez, E. E, and del Catillo, M. D., 2019. Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, v. 51 , p. 194-204.
- *Franca, A. S., Oliveira, L. S., Nunes, A. A., Alves, C. C. O., 2010. Microwave assisted thermal treatment of defective coffee beans press cake for the production of adsorbents. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 1068-1074.
- *Garzón, G. A., Soto, C. Y., Lopez, M., Riedl, K. M., Browmiller, C. R., Howard, L., 2020. Phenolic profile, in vitro antimicrobial activity and antioxidant capacity of *Vaccinium meridionale* Swartz pomace. *Heliyon*, v. 6, e04272.
- *Geng, Q., Chen, J., Guo, R., Zhang, L., Li, Q., and Yu, X., 2020. Salt-assisted aqueous extraction combined with Span 20 allow the obtaining of a high-quality and yield walnut oil. *LWT*, v. 121, 108956.
- *Gorguç, A.; Ozer, P.; Yilmaz, F. M., 2020. Simultaneous effect of vacuum and ultrasound assisted enzymatic extraction on the recovery of plant protein and bioactive compounds from sesame bran. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 87, 103424.

- *Herrera, J. M., Sanchez-Chino, X., Corzo-Ríos, L. J., Davila-Ortiz, G., Jimenez-Martinez, C., 2019. Comparative extraction of *Jatropha curcas* L. lipids by conventional and enzymatic methods. *Food and Bioproducts Processing*, v. 118, p. 32-39.
- *Instituto Adolfo Lutz (Sao Paulo- Brazil), 2005. Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 4ª Edição. Anvisa, 1018 pp.
- *Jiang, Y. et al., 2020. Radio frequency-assisted enzymatic extraction of anthocyanins from *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. flowers: Process optimization, structure, and bioactivity determination. *Industrial Crops and Products*, v. 149, 112327.
- *Kamil, M., Ramadan, K. M., Awad, O. I., Ibrahim, T. K. Inayat, A., Ma, X., 2019. Environmental impacts of biodiesel production from waste spent coffee grounds and its implementation in a compression ignition engine. *Science Total Environment*, v. 675, p. 13-30.
- *Kamiloglu, S., 2019. Authenticity and traceability in beverages. *Food Chemistry*, v. 277, p. 12-24.
- *Ke, L., Xu, Y., Gao, G., Wang, H., Yu, Z.,..., Yu, J., 2020. Catalase to demulsify oil-in-water fish oil-polysorbate emulsion and affect lipid oxidation. *Food Research International*, v. 133, 109169.
- *Khoshnoudi-Nia, S., Sharif, N., Jafari, S. M., 2020. Loading of phenolic compounds into electrospun nanofibers and electrosprayed nanoparticles. *Trends in Food Science and Technology*, v. 95, p. 59-74.
- *Li, S.; Berger, J.; Hartland, Uv, S., 1990. Spectrophotometric determination of theobromine and caffeine in cocoa beans. *Analytica Chimica Acta*, v. 232, n. 01, p. 409-412.
- *Li, Q., Ray, C. S., Callow, N. V., Loman, A. A., Islam, S. M. M., Ju, L. K., 2020. *Aspergillus niger* production of pectinase and α -galactosidase for enzymatic soy processing. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 134, 109476.
- *Liu, Z., Gui, M., Xu, T., Zhang, L., Kong, L., Qin, L., Zou, Z., 2019. Efficient aqueous enzymatic-ultrasonication extraction of oil from *Sapindus mukorossi* seed kernels. *Industrial Crops and Products*, v. 134, p. 124-133.
- *Londono-Hernandez, L., Ruiz, H. A., Ramirez, T. C., Ascacio, J. A., Rodriguez-Herrera, and Aguilar, C. N., 2020. Fungal detoxification of coffee pulp by solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 23, 101467.
- *Lopes, G. R., Passos, C. P., Rodrigues, C., Teixeira, J. A., Coimbra, M. A., 2020. Impact of microwave-assisted extraction on roasted coffee carbohydrates, caffeine, chlorogenic acids and coloured compounds. *Food Research International*, v. 129, 108864.

- *Macheiner, L. Schimidt, A., Schreiner, M., and Mayer, H. K., 2019. Green coffee infusion as a source of caffeine and chlorogenic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 84, 103307.
- *Marathe, S. J., Jadhav, S. B., Bankar, S. B., Dubey, K. K., Singhal, R. S., 2019. Improvements in the extraction of bioactive compounds by enzymes. *Current Opinion in Food Science*, v. 25, p. 62-72.
- *McIlvaine, T. C., 1921. A Buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chemistry*, v. 49, p. 183-186.
- *McCormick, W., Muldoon, C., McCrudden, D., 2021. Electrochemical flow injection analysis for the rapid determination of reducing sugars in potatoes. *Food Chemistry*, v. 340, 127919.
- *McNutt, J., He, Q. S., 2019. Spent coffee grounds: A review on current utilization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 71, p. 78-88.
- *Meher, J. G., Yadav, N. P., Sahu, J. J., Sinha, P., 2013. Determination of required hydrophilic-lipophilic balance of citronella oil and development of stable cream formulation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 39., p. 1540-1546.
- *Mitton, G. A., Szawarski, N., Mitton, F. M., Iglesias, A., Eguaras, M. J., Ruffinengo, S. R., Maggi, M. D., 2020. Impacts of dietary supplementation with p-coumaric acid and indole-3-acetic acid on survival and biochemical response of honey bees treated with tau-fluvalinate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 189, 109917.
- *Moyo, S. M., Serem, J. C., Bester, M. J., Mavumengwana, V., Kayitesi, E., 2020. Influence of boiling and subsequent phases of digestion on the phenolic content, bioaccessibility, and bioactivity of *Bidens pilosa* (Blackjack) leafy vegetable. *Food Chemistry*, v. 311, 126023.
- Nacz, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, v. 1054, p. 95-111.
- *Oliveira, E. R., Carvalho, G. R. Santos, P. R., Queiroz, F., 2019.a. Green coffee (*Coffea arabica*) and its Residual Biomass: Characterization for the industrial approach. *Current Nutrition and Food Science*, v. 16, p. 1072-1082.
- *Oliveira, E. R., Silva, R. F., Santos, P. R., and Queiroz, F., 2019.b. 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.
- *Oliveira, N. A., Sandini, T. M., Cornelio-Santiago, H. P., Martinelli, C. L., Raspaltini, L. E. R., ..., Fukumasu, H., 2020. Acute and subacute (28 days) toxicity of green coffee oil enriched with diterpenes cafestol and kahweol in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 110, 104517.

- *Palmieri, M. G. S., Cruz, L. T., Berteges, F. S., Hungaro, H. M., Batista, L. R., Fonseca, M. J. V., ..., Amaral, F. M. P., 2018. Enhancement of antioxidant properties from green coffee as promising ingredient for food and cosmetic industries. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.16, p. 43-48.
- *Pragasam, S. J., Venkatesan, V., Rasool, M., 2013. Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. *Inflammation*, v. 36, p. 169-176.
- *Rafique, R., Khan, K. M., Arshia, Chigurupati, S., Wadood, A., Rehman, A. U., ..., Perveen, S., 2020. Synthesis, in vitro α -amylase inhibitory, and radicals (DPPH and ABTS) scavenging potentials of new N-sulfonohydrazide substituted indazoles. *Bioorganic Chemistry*, v. 94, 103410.
- *Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, 1231–1237.
- * Rodrigues, M. I., Iemma, A. F., 2014. Planejamento de Experimentos e otimização de processos, Cárita Editora, 3ª Edição p. 305 e 306.
- *Rosa, S. D. V. F., Santos, C. G., Paiva, R., Melo, P. L. Q., Veiga, A. D., Veiga, A. D., 2006. Inhibition of in vitro development of Coffea embryos by exogen caffeine. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 28, p. 177-185.
- *Santos, R. D., Ferrari, R. A., 2005. Extração aquosa enzimática de óleo de soja. *Food Science and Technology*, v. 25, p. 132-138.
- * Schmidt, H. O., Rocket, F. C., Klen, A. V. B., Schmidt, L., Rodrigues, E.,..., Rios, A. O., 2020. New insights into the phenolic compounds and antioxidant capacity of feijoa and cherry fruits cultivated in Brazil. *Food Research International*, v. 136, 109564.
- *Silveira, J. S., Mertz, C., Morel, G., Lacour, S., Belleville, M. P., Durand, N., Dornier M., 2020. Alcoholic fermentation as a potential tool for coffee pulp detoxification and reuse: Analysis of phenolic composition and caffeine content by HPLC-DAD-MS/MS. *Food Chemistry*, v. 319, 126600.
- *Sineiro, J., Domingues, H., and Nuñez, M. J., 1998. Influencia del tratamiento enzimatico en la calidad de aceites vegetales. *Grasas y aceites*, v. 49, p. 191-202.
- *StatSoft Inc., 2010. STATISTICA (Data Analysis Software System) version 10.0 Tulsa
- *Uenojo, M., and Pastore, G. M., 2007. Pectinolytic enzymes. Industrial applications and future perspectives. *Química Nova*, v. 30, p. 388-394.

*Vidal-Gutierrez, M., Robles-Zepeda, R. E., Vilegas, W., Gonzalez-Aguiar, G. A., Torres-Moreno, H., Lopez-Romero, J. C., 2020. Phenolic composition and antioxidant activity of *Bursera microphylla* A. Gray. *Industrial Crops and Products*, v. 152, 112412.

*Waterhouse A. L., 2002. Polyphenolics: determination of total phenolics. In: Wrolstad RE, editor. *Currente protocols in food analytical chemistry*.

* Yan, F., Dibner, J. J., Knignht, C. D., Vazquez-Anon, M., 2017. Effect of carbohydrase and protease on growth performance and gut health of young broilers fed diets containing rye, wheat, and feather meal. *Poultry Science*, v. 96, p. 817-828.

*Zhang, L., Fan, G., Khan, M. A., Yan, Z., Beta, T., 2020. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and identification of anthocyanin components from mulberry wine residues. *Food Chemistry*, London, v. 323, 126714.

* Zhao, Q., Li, P., Wang, M., Zhang, W., Zhao, W., Yang, R., 2020. Fate of phospholipids during aqueous extraction processing of peanut and effect of demulsification treatments on oil-phosphorus-content. *Food Chemistry*, v. 331, 127367.