



GIOVANNA VICTORIA VIEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA
PARA A DETERMINAÇÃO DO NEURO PRECURSOR
L-DOPA EM FOLHAS DE CAFÉ POR HPLC-DAD**

**LAVRAS – MG
2024**

GIOVANNA VICTORIA VIEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A
DETERMINAÇÃO DO NEURO PRECURSOR L-DOPA EM FOLHAS DE CAFÉ
POR HPLC-DAD**

Dissertação de Mestrado submetida à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do Programa de Pós Graduação em
Agroquímica, área de concentração
Química/Bioquímica, para obtenção do título de
Mestre.

Prof^a. Dr^a. Adelir Aparecida Saczk
Orientadora

**LAVRAS – MG
2024**

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

Vieira, Giovanna Victoria.

Desenvolvimento e validação de metodologia para a
determinação do neuro precursor l-dopa em cafeeiro utilizando
HPLC-DAD / Giovanna Victoria Vieira. - 2024.

55 p.

Orientador(a): Adelir Aparecida Saczk.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. L-dopa. 2. café. 3. análise traço. I. Saczk, Adelir Aparecida.
II. Título.

GIOVANNA VICTORIA VIEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A
DETERMINAÇÃO DO NEURO PRECURSOR L-DOPA EM FOLHAS DE CAFÉ
POR HPLC-DAD**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODOLOGY FOR
DETERMINATION OF NEURO PRECURSOR L-DOPA IN COFFEE LEAVES BY
HPLC-DAD**

Dissertação de Mestrado submetida à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do Programa de Pós-graduação em
Agroquímica, área de concentração
Química/Bioquímica, para obtenção do título de
Mestre.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2024

Dr.^a Daiane Cássia Pereira Abreu – Seara Alimentos LTDA
Dr. Antonio Chalfun Júnior – ICN/UFLA
Dr. Wilder Douglas Santiago – INCT-Café/UFLA

Prof.^a Dr.^a Adelir Aparecida Saczk
Orientadora

**LAVRAS – MG
2024**

Para Titi, Fred e Cata

AGRADECIMENTOS

A universidade pública e gratuita, em especial a Universidade Federal de Lavras, pelo acesso ao conhecimento e pelas infinitas possibilidades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro ao longo do mestrado, possibilitando a pesquisa e a escrita dessa dissertação.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo fornecimento e suporte de equipamentos indispensáveis a pesquisa científica.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro na pós graduação.

À todas as mulheres cientistas que trilharam o caminho para que eu pudesse chegar também.

À minha orientadora, Adelir, por toda a contribuição ao longo da realização dessa pesquisa.

Ao professor Chalfun pelo imenso apoio e colaborações.

Ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica por todo o suporte e vivência ao longo desses dois anos.

Aos colegas do Departamento de Química, do setor de Fisiologia Vegetal e do Laboratório Multiusuários de Análises Instrumentais pela jornada compartilhada.

A todos os meus amigos, que se tornaram minha casa desde o primeiro dia.

A toda a minha família, responsáveis pelos maiores momentos de manifestação de amor e respiro, sejam eles no meio da floresta amazônica, em São Paulo ou no velho continente.

À mamãe e papai, por tudo.

Impactos sociais, tecnológicos, econômicos e culturais

O trabalho desenvolvido foi baseado na importância socioeconômica do café no contexto brasileiro e sobretudo no contexto do sul do estado de Minas Gerais. Além de ser um produto altamente consumido mundo a fora, sendo o Brasil o maior produtor e exportador em nível mundial, o café está intrinsecamente ligado a cultura mineira. A bebida é feita a partir da torra do grão do café, no entanto, outros componentes morfológicos do cafeeiro também possuem grande relevância medicinal e tecnológica. As folhas de café são um resíduo agrícola com alto valor agregado, isto é, em sua composição existem diversos compostos de imensa importância medicinal e ou farmacológica. A composição química total dessas folhas ainda é pouco conhecida, no entanto, um estudo recente indicou a presença da L-dopa como um metabólito natural nessas plantas. A L-dopa é a molécula precursora da dopamina, neurotransmissor responsável principalmente por funções motoras, de cognição e aprendizagem e funções do sono nos seres humanos. Em algumas doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, a produção de dopamina no cérebro é seriamente comprometida, e o tratamento para o distúrbio se dá por meio de fármacos cujo princípio ativo é a L-dopa. Dessa forma, o presente trabalho propôs uma metodologia de extração da L-dopa em folhas de *C. arabica* e posterior quantificação. Os resultados demonstraram que os maiores teores de L-dopa puderam ser encontrados em folhas jovens, seguidos por folhas maduras. Em folhas senescentes foram encontradas as menores concentrações da espécie química. Também foram analisadas folhas de outras duas espécies de cafeeiro, a *C. canephora* e a *C. eugenioides*. Nas folhas jovens da *C. eugenioides* foram encontradas as menores concentrações expressas de L-dopa, contudo, o estudo mostrou que o teor de L-dopa nessa espécie vegetal se mantém ligeiramente constante mesmo com o progresso da idade biológica. A *C. canephora* apresentou concentrações semelhantes, ora ligeiramente menores que a *C. arabica* para as folhas jovens e maduras, ora ligeiramente maiores para folhas senescentes, mantendo a tendência do comportamento íngreme com o avanço da idade vegetal. A descoberta e confirmação da presença da L-dopa nesses tecidos é indiscutivelmente de grande relevância, embora ainda não se possa afirmar que o consumo das folhas ou de seu chá possa contribuir diretamente no aumento de L-dopa no organismo humano.

Social, technological, economic and cultural impacts

The work developed was based on the socio-economic importance of coffee in the Brazilian context and especially in the southern context of the state of Minas Gerais. Besides being a highly consumed product worldwide, Brazil being the largest producer and exporter in the

world, coffee is closely linked to the culture of Minas Gerais. The drink is made from the roasting of the coffee bean, however, other morphological components of the coffee also have great medicinal and technological relevance. Coffee leaves are an agricultural waste with high added value, that is, in their composition there are several compounds of immense medicinal and or pharmacological importance. The total chemical composition of these leaves is still unknown, however, a recent study indicated the presence of L-dopa as a natural metabolite of these plants. L-dopa is the precursor molecule of dopamine, neurotransmitter responsible mainly for motor functions, cognition and learning and sleep functions in humans. In some neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease, dopamine production in the brain is seriously compromised, and treatment for the disorder is by means of drugs whose active principle is L-dopa. Thus, the present work proposed a methodology of extraction of L-dopa in leaves of *C. arabica* and subsequent quantification. The results showed that the highest levels of L-dopa could be found in young leaves, followed by mature leaves. In senescent leaves the lowest concentrations of the chemical species were found. Leaves of two other coffee species, *C. canephora* and *C. eugenioides*, were also analyzed. In the young leaves of *C. eugenioides* were found the lowest expressed concentrations of L-dopa, however, the study showed that the content of L-dopa in this plant species remains slightly constant even with the progress of biological age. *C. canephora* showed similar concentrations, sometimes slightly lower than *C. arabica* for young and mature leaves, sometimes slightly higher for senescent leaves, maintaining the tendency of steep behavior with the advance of plant age. The discovery and confirmation of the presence of L-dopa in these tissues is undoubtedly of great relevance, although it can not yet be said that the consumption of the leaves or their tea can directly contribute to the increase of L-dopa in the human body.

O idealismo é a posição que considera que só podemos conhecer aquilo que aparece à nossa consciência, essa entidade semidivina que nos salva da bestialidade (M. Barbery).

RESUMO GERAL

O café, além de maior commodity do mundo, possui também uma extensa literatura em torno de seus efeitos benéficos a saúde humana. Entretanto, a composição do cafeeiro em sua totalidade ainda é desconhecida. Dessa forma, o uso de dados transcriptômicos aplicado à inferência e reconstrução de vias metabólicas têm se destacado por fornecer uma sólida base na descoberta de importantes compostos em tecidos vegetais. Assim, a partir da análise *in sílico* das folhas de café, foi descoberta a presença da L-dopa nesses tecidos. A L-dopa é um aminoácido fenólico de inestimável importância farmacológica, que atua principalmente no tratamento da Doença de Parkinson, além de ser um metabólito secundário natural das plantas. Nesse trabalho, foram estudadas as melhores condições de extração da L-dopa utilizando folhas maduras de *Coffea arabica*. O desenvolvimento da metodologia de extração foi baseado no estudo univariado da influência de três parâmetros, dentre os quais, proporção entre a massa de material vegetal seco e volume de solvente extrator, concentração do solvente extrator e tempo de extração. A análise das amostras e determinação de espécie química foi realizada pela técnica de cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). A metodologia desenvolvida foi validada e aplicada na determinação de L-dopa nas folhas jovens, maduras e senescentes de três espécies de café, *Coffea arabica*, *Coffea eugenoides* e *Coffea canephora*.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *Coffea eugenoides*. *Coffea canephora*. Aminoácido fenólico. Análise traço.

GENERAL ABSTRACT

Coffee, in addition to being the world's largest commodity, also has extensive literature surrounding its beneficial effects on human health. However, the composition of the coffee plant in its entirety is still unknown. Therefore, the use of transcriptomic data applied to the inference and monitoring of metabolic pathways stands out for providing a solid basis for the discovery of important compounds in plant tissues. Thus, from *in silico* analysis of coffee leaves, the presence of L-dopa in these tissues was discovered. L-dopa is a phenolic amino acid of invaluable pharmacological importance, which acts mainly in the treatment of Parkinson's disease, in addition to being a natural secondary metabolite of plants. In this work, the best conditions for L-dopa degradation were studied using mature *Coffea arabica* leaves. The development of the extraction methodology was based on the univariate study of the influence of three parameters, including the proportion between the mass of dry plant material and volume of solvent extractor, concentration of the solvent extractor and extraction time. The analysis of samples and determination of chemical species was carried out using the liquid chromatography technique coupled to a diode array detector (HPLC-DAD). A developed methodology was validated and applied to determine L-dopa in young, mature and senescent leaves of three coffee species, *Coffea arabica*, *Coffea eugenoides* and *Coffea canephora*.

Key words: *Coffea arabica*. *Coffea eugenoides*. *Coffea canephora*. Phenolic amino acid. Trace analysis.

.

LISTA DE FIGURAS

Primeira Parte

Figura 1 - Estrutura da molécula L-dopa.....	16
Figura 2 - Via metabólica para a L-dopa.....	17
Figura 3 - Planta do café composta por caule, folhas e fruto	22

Segunda Parte

Figura 1 - Fluxograma ilustrando o planejamento experimental.....	42
Figura 2 - Cromatograma da análise da C. arabica fortificada com padrão.....	46
Figura 3 - Curva analítica para o padrão de L-dopa construída em solvente.....	49
Figura 4 - Curva analítica construída por superposição de matriz.....	50
Figura 5 - Gráfico com as concentrações de L-dopa para as três espécies de café	52

SUMÁRIO

Sumário

PRIMEIRA PARTE.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1. Um panorama sobre a doença de Parkinson: contexto histórico, sintomas e tratamentos.....	13
2.2. L-dopa.....	15
2.2.1. Via metabólica da L-dopa.....	16
2.2.2. L-dopa em alimentos.....	17
2.3. Café.....	20
2.3.1. Aspectos históricos e econômicos.....	20
2.3.2. Composição e propriedades físico-químicas da folha de café.....	21
3. Validação da metodologia.....	25
3.1. Seletividade.....	26
3.2. Linearidade.....	27
3.3. Precisão.....	28
3.3.1. Repetitividade.....	29
3.3.2. Precisão Intermediária.....	29
3.3.3. Reprodutibilidade.....	29
3.4. Exatidão.....	29
3.4.1. Ensaios de Recuperação.....	30
3.5. Limite de Detecção.....	30
3.6. Limite de Quantificação.....	30
REFERÊNCIAS.....	32
SEGUNDA PARTE.....	36
ARTIGO 1.....	36
TERCEIRA PARTE.....	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55

PRIMEIRA PARTE

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson, ou mal de Parkinson, é uma doença neurodegenerativa crônica, marcada pela morte de células cerebrais na zona denominada substância negra do cérebro, região responsável pela produção de um dos principais neurotransmissores do corpo humano, a dopamina (Seiler *et al.* 2024). Funções cognitivas e de aprendizagem, do sono e de movimentos motores são alguns dos principais exemplos da função regulamentadora desse neurotransmissor pelo corpo humano.

Devido às mortes neurais e a quase mitigada produção dopaminérgica no cérebro, a queda dos níveis de dopamina na região resulta em falhas na execução das funções vitais do corpo, tais como atividades de movimentação e cognição. Dessa forma, a doença tem como principais sintomas, tremores por toda a estrutura física, rigidez muscular, sono inconstante, debilidade cognitiva, demência, ansiedade e acessos de psicose (Schepici *et al.* 2020). A doença costuma manifestar-se a partir dos cinquenta anos de idade, tanto para homens quanto para mulheres, com 2% de incidência em idosos com mais de 75 anos de idade, e incidência de 4% em idosos com mais de 85 anos (Rajan, Kaas 2022).

O tratamento para a doença de Parkinson atualmente é realizado por meio da prescrição de drogas sintéticas cujo comum princípio ativo é uma substância denominada L-dopa, um aminoácido fenólico e precursor metabólico da dopamina. A L-dopa é transportada ao Sistema Nervoso Central (SNC) e metabolizada em dopamina pela ação da enzima DOPA descarboxilase, que promove reações de descarboxilação na região estrutural periférica da L-dopa. Os fármacos utilizados no tratamento são capazes de diminuir drasticamente os sintomas relacionados a patologia, no entanto, o distúrbio neurodegenerativo ainda não possui cura (McDonald *et al.* 2018).

A L-dopa pode ser encontrada naturalmente e em altas concentrações em tecidos da *Vicia faba* e *Mucuna*, leguminosas amplamente encontradas na Ásia e em regiões tropicais dos continentes africano e asiático, respectivamente (Patil *et al.* 2015).

O café possui uma extensa literatura em torno de seus efeitos benéficos a saúde humana. Sobretudo, diversos estudos prescrevem a utilização do café como aliado a prevenção e ao combate da doença de Parkinson e outros distúrbios neurológicos, uma vez que a grande porcentagem de compostos fenólicos em sua composição confere uma atribuição antioxidante e protetora para com as células neurais, permitindo uma maior reparação celular no processo

de estresse oxidativo (Cásedas *et al.* 2018, Ishibashi *et al.* 2022, Lee, Rodzi, 2022). Entretanto, a composição fenólica do café em sua totalidade ainda é desconhecida.

Recentemente, por meio da reconstrução de vias metabólicas e análise de dados *in silico* em um estudo conduzido em folhas de café, foi descoberta a presença da L-dopa nesses tecidos, o que pode contribuir largamente para a mudança de panorama no que diz respeito a busca de fontes naturais desse composto, custo da produção da L-DOPA, reaproveitamento de resíduo agrícola (Ribeiro *et al.* 2023).

A química analítica possibilita o desenvolvimento de técnicas de extração e determinação de compostos em matrizes alimentares com o auxílio de técnicas instrumentais de alta sensibilidade e precisão, como a cromatografia líquida.

Dessa forma, dado o contexto social e econômico do café na região sul de Minas Gerais, além de suas diversas potencialidades terapêuticas, atrelada a importância farmacológica e medicinal da L-dopa, o escopo desse trabalho foi contribuir com uma metodologia de extração e determinação da L-dopa em folhas de três espécies do cafeeiro.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Um panorama sobre a doença de Parkinson: contexto histórico, sintomas e tratamentos

A doença de Parkinson é uma patologia neurodegenerativa que provoca a morte neural de forma progressiva e irremediável, e que acomete homens e mulheres majoritariamente acima dos cinquenta anos de idade (Rajan, Kaas 2022). A doença tem sua atividade na região do cérebro denominada substância negra compacta, onde ocorre essencialmente a produção do neuro-hormônio dopamina (Seiler *et al.* 2024)

A dopamina é um importante neurotransmissor incumbido de emitir sinais elétricos por toda a região do cérebro regulando as funções motoras corporais, funções de cognição, de aprendizagem, de humor, do sono e tantas outras. Assim, as lesões causadas pela doença na região onde há produção da dopamina levam à deterioração neuronal e consequentemente à redução da disponibilidade e produção de dopamina no núcleo hipotalâmico (Latif *et al.* 2021). A baixa concentração de dopamina resulta na desregulação das funções e atividades atreladas a esse neurotransmissor, dessa forma, sintomas motores, como rigidez muscular, tremores, bradicinesia e irregularidades posturais e sintomas neuropsiquiátricos, como depressão,

irregularidades no sono, apatia, euforia, ansiedade, alucinação e delírio manifestam pelo corpo humano sinalizando a doença (Li *et al.* 2022).

O epônimo “Doença de Parkinson” foi em homenagem ao polímata inglês James Parkinson (1755-1824), que em 1817, descreveu pela primeira vez na literatura diversos sintomas neurodegenerativos que acreditava pertencer a uma mesma patologia (Goedert, Compston, 2018). Os sintomas descritos fazem parte de seu trabalho intitulado “Ensaio sobre a Paralisia Agitada”. A origem do distúrbio é incerta, contudo, as possibilidades são multifatoriais e flutuam desde predisposição genética, envelhecimento celular, traumas na cabeça e comorbidades a fatores ambientais, tais como exposição à poluição de solos, águas fluviais e águas residuais contaminadas pelo uso de agrotóxicos (Rajan, Kaas 2022).

Historicamente, os primeiros tratamentos para os sintomas parkinsonianos foram realizados por meio de drogas alcalóides, compostos químicos derivados das aminas. A partir de 1940, fármacos anticolinérgicos (drogas que inibem a ação do neurotransmissor acetilcolina, responsável pela regulação do sono, da aprendizagem e da memória), passaram a ser o principal tratamento para o distúrbio, dada sua capacidade inerente de controlar os tremores pelo corpo. Em 1949, o triexifenidil, medicamento da classe referida, passou a ser comercializado para o tratamento da doença de Parkinson (McDonald *et al.* 2018).

Estudos realizados a partir de então, passaram a interligar a dopamina com o tratamento terapêutico para a doença de Parkinson. O bioquímico australiano, Oleh Hornykiewicz (1926-2020), conduziu ensaios clínicos utilizando dopamina injetável, e observou uma melhora significativa dos sintomas parkinsonianos (Lees, Tolosa *et al.* 2015). Nos anos seguintes, diversos estudos avaliaram o desempenho dos enantiômeros D-dopa e L-dopa, além da mistura racêmica da substância no tratamento da doença de Parkinson. Foi constatado que uso solitário do precursor L-dopa não só possui uma maior eficiência terapêutica como também diminui drasticamente os efeitos colaterais de natureza hematológica e gastrointestinal nos pacientes participantes dos ensaios clínicos (McDonald *et al.* 2018).

A L-dopa é absorvida no intestino delgado e transportada pela corrente sanguínea até o Sistema Nervoso Central (SNC), onde é absorvida e metabolizada em dopamina. Para adentrar no SNC, a L-dopa atravessa a barreira hematoencefálica, uma estrutura de permeabilidade estritamente seletiva que reveste e protege o SNC. Contudo, quando ainda na corrente sanguínea, a L-dopa é transformada em dopamina por ação da enzima DOPA-descarboxilase, e devido a algumas de suas características a dopamina não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Portanto, dopamina produzida endogenamente ou ingerida na forma

farmacológica é excretada do corpo sem conseguir adentrar na região cerebral e cumprir seu papel. A fim de se mitigar o problema, o isômero ativo L-DOPA é costumeiramente administrado em conjunto com um fármaco inibidor da enzima DOPA-descarboxilase (Lane, 2019). Uma vez que a enzima foi inibida, níveis mais elevados de L-dopa podem adentrar no SNC e diminuir os efeitos da ausência dopaminérgica, responsáveis pelos sintomas da doença.

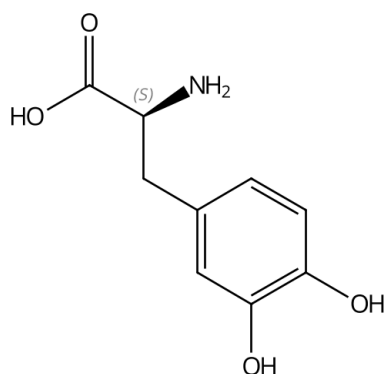
Atualmente, o tratamento para a Doença de Parkinson é realizado pela reposição de dopamina por meio da L-dopa aliada a outras drogas, sendo a primeira comercialmente distribuída no Brasil como Stalevo®, Prolopa®, Parkidopa®, Prolopa® e Ekson®. A medicação ajuda a atenuar muito dos sintomas da doença, que até o momento não possui uma cura.

No que diz respeito a prevenção à doença, diversos estudos discorrem sobre o papel do café como figura central no potencial atividade neuroprotetora para a prevenção da doença de Parkinson, e ainda como um possível aliado no tratamento da mesma. As propriedades neuroprotetoras encontradas no café estão intrinsecamente ligadas a sua composição fenólica, ao que essas substâncias atuam diretamente protegendo as células neurais contra os danos ocasionados pelo processo de estresse oxidativo e outras neurotoxinas (Alves, Casal *et al.* 2009, Schepici *et al.* 2020; Ishibashi *et al.* 2022, Lee, Rodzi, 2022)

2.2. L-dopa

A l-dopa, ou L-3,4-dihidroxifenilalanina, é um aminoácido fenólico e molécula precursora do neuro hormônio dopamina, produzida essencialmente no cérebro e no intestino dos mamíferos a partir do metabolismo do aminoácido l-tirosina (Etemadi *et al.* 2018). A dopamina, por sua vez, é um neurotransmissor responsável por regular principalmente funções corpóreas motoras, funções do sono, de cognição e aprendizagem (Latif *et al.* 2021). A L-dopa é conduzida pelo cérebro por meio de um transportador de aminoácidos até a região denominada terminais dopaminérgicos, onde ocorre a síntese da dopamina pela ação da enzima descarboxilase (Lane, 2019).

Figura 1 - Estrutura da molécula L-dopa



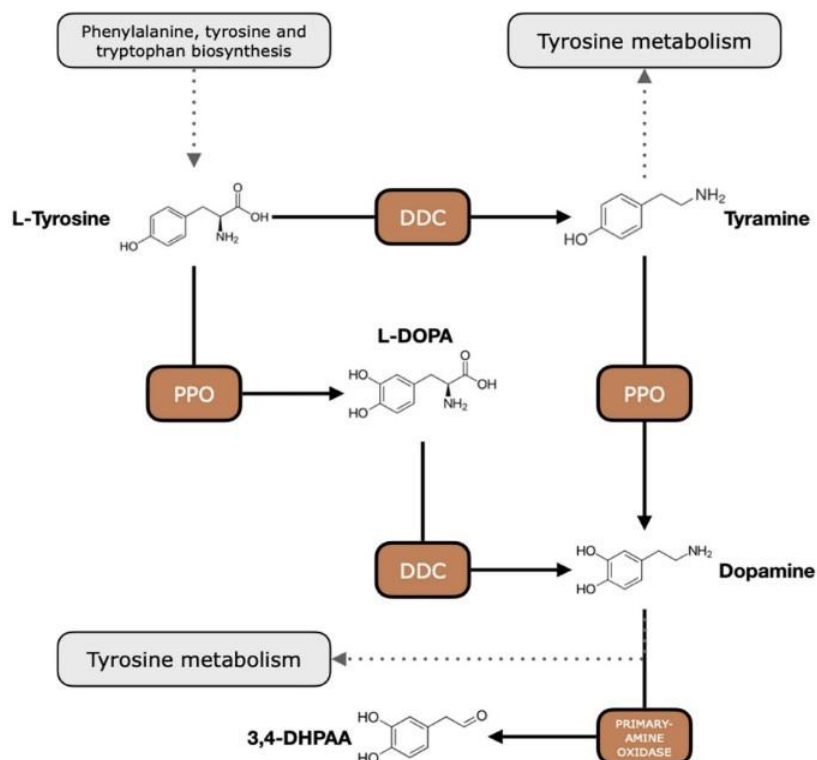
Fonte: SciFinder (2023)

A molécula L-dopa apresenta polaridade intermediária, dada sua cadeia carbônica e os grupos funcionais em suas terminações, dentre os quais, (I) dois grupamentos fenólicos, (II) um grupamento amina e (III) um grupamento ácido carboxílico. Embora as insaturações do anel fenólico contribuam para uma menor solubilidade da molécula em água, os grupos funcionais citados acima permitem uma interação eletroestática entre as moléculas por meio de ligações de hidrogênio, que resultam em uma maior solubilidade do composto em meio aquoso, e em um alto ponto de ebulição (Solomons, 2009). A L-dopa possui uma massa molar de 197,18 g mol⁻¹ e razoável volatilidade.

2.2.1. Via metabólica da L-dopa

A L-tirosina é um aminoácido fenólico e precursor na biossíntese da dopamina por meio da ação das enzimas dopa descarboxilase (DDC) e polifenol oxidase (PPO). Ambas as enzimas foram largamente encontradas nos genomas das folhas de café (Ribeiro *et al.* 2023). Alternativamente, a L-tirosina, pode atuar como substrato ao se ligar a enzima polifenol oxidase (PPO) a fim de ser convertido em L-dopa, que posteriormente será convertido em dopamina, conforme a Figura 2.

Figura 2 - Via metabólica para a L-dopa



Fonte: Ribeiro *et al.* (2023)

2.2.2. L-dopa em alimentos

A droga L-dopa é produzida sinteticamente em laboratórios farmacológicos, contudo, há um empenho por parte de diversos pesquisadores na busca por fontes naturais de L-dopa, como em matrizes alimentares, uma vez que o consumo da substância poderia contribuir na profilaxia para a Doença de Parkinson, dado que diversos estudos relacionam o consumo de alimentos antioxidantes, como café, mirtilo e açaí a uma atividade de neuroproteção em relação a doença (Swanson, Sesso *et al.* 2009).

Diversos estudos identificaram a L-dopa em tecidos como brotos recém germinados, folhas, flores, caules e vagens de leguminosas de algumas leguminosas das famílias taxonômicas da *Vicia fava* e *Mucuna*. A Tabela 1 sintetiza trabalhos relatados na literatura que determinam a L-dopa em tecidos vegetais utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD).

Tabela 1 - Trabalhos reportados na literatura para determinação de L-dopa em matrizes alimentares (continua)

Tecido Vegetal	Método de Extração	TEOR L-DOPA	REF
Folhas, flores e vagens da <i>Vicia faba</i>	Não descrito	10,88 mg kg ⁻¹ a 96,37 mg kg ⁻¹	(Topal, Bozoglu, 2016)
Flores, folhas e caules da <i>Vicia faba</i>	5mg, 1 mL de metanol aquoso 50% (v/v) extração tripla	36,51 a 100,70 mg g ⁻¹	(Duan <i>et al.</i> 2021)
Vagens e folhas da <i>Vicia faba</i>	200mg, etanol 95% solução tampão (ácido cítrico, acetato de sódio, EDTA, octil sulfato) de pH 4,0	7,2 mg g ⁻¹ a 22,4 mg g ⁻¹	(Etemadi <i>et al.</i> 2018)
Sementes <i>Mucuna sanjappe</i>	50mg, 15 mL de HCl 0,1 mol L ⁻¹	7.3 % da massa vegetal	(Patil <i>et al.</i> 2015)
Sementes <i>Mucuna pruriens</i>	200g, 800 mL metanol 80% (v/v) LLE, acetato de etila (para a partição do analito)	0,49 mg g ⁻¹	(Rima <i>et al.</i> 2023)
Grãos secos da <i>Vicia faba</i>	0,2g, 5mL solução de ácido acético 0,2% (v/v) extração dupla	382,2 a 1152,0 µg g ⁻¹	(Polanowska <i>et al.</i> 2019)

Tabela 2 - Trabalhos reportados na literatura para determinação de L-dopa em matrizes alimentares (conclusão)

Tecido Vegetal	Método de Extração	TEOR L-DOPA	REF
Broto de brócolis, rabanete branco japonês, ervilha e couve roxa	20mg, 1 mL de metanol 80% (v/v) cartucho C18 (condicionado com metanol e metanol aquoso 80% (v/v))	0,29 a 3987,2 µg g ⁻¹	(Yumoto, Yanagihara <i>et al.</i> 2022)
Folhas, flores e frutos de <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i>	200 mg, ácido acético 0,1% (v/v) extração dupla	Não descrito	(Ribeiro <i>et al.</i> 2023)

2.3. Café

2.3.1. Aspectos históricos e econômicos

A origem do café remonta os tempos mais antigos, perto do ano 525 A.C., no alto das montanhas da região da Etiópia, no continente africano. Navegando pelo mar mediterrâneo, mercadores árabes difundiram a planta e o grão por toda a região do oriente médio, que posteriormente foram introduzidos grandemente no comércio europeu e asiática. Com o evento da colonização europeia, o café finalmente chegou as américas (EMBRAPA, 2023).

A cultura cafeeira no Brasil data do século 18, em um contexto de um país colonizado, escravocrata e monocultor latifundiário. O café foi ainda um dos grandes protagonistas no que diz respeito à inserção e consolidação da economia nacional no capitalismo agrário, enquanto os cafeicultores, ávidos pelo acúmulo de capital e poder político, foram responsáveis pela destruição massiva da mata atlântica para a obtenção de áreas de cultivo (Ruíz, Oliveira, 2018).

Apesar das raízes nebulosas, o café ainda hoje exerce uma extensiva importância econômica, uma vez que o Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo (OIC, 2021), gerando uma receita interna bruta em torno de cinquenta e cinco bilhões de dólares anualmente (EMBRAPA, 2023). Em um panorama mundial, o consumo de café no ano de 2022 estimado foi em cerca de 170,3 milhões de sacas de 60 quilos (OIC, 2022).

Dentre os maiores produtores nacionais, destaca-se região sudeste, sendo o estado de Minas Gerais o produtor majoritário, seguido pelo estado de São Paulo. Em Minas Gerais, a produção cafeeira tornou-se a base econômica do estado, com destaque para a região sul (Alto São Francisco, Metalúrgica e Campo das Vertentes) que concentra um pouco mais 80% da produção total estadual (EMBRAPA, 2023). A Tabela 2 expõe numericamente a contribuição percentual de cada região brasileira na produção cafeeira e o faturamento bruto de cada uma.

Tabela 2 - Produção de café por região brasileira

Região	% Participação	Faturamento Bruto
Sudeste	86,7%	R\$ 48,46 bilhões
Nordeste	6,6%	R\$ 3,73 bilhões,
Norte	4,5%	R\$ 2,54 bilhão
Sul	1,2%	R\$ 691,5 milhões
Centro-Oeste	0,8%	R\$ 463,57 milhões

Fonte: Adaptado de EMBRAPA, 2023.

Os impactos na agricultura permeiam não só os agricultores e comerciantes, mas também a promoção de infraestrutura de regiões rurais, construção de estradas, além de contribuir fortemente para o desenvolvimento regional, por meio da instauração de cooperativas, estímulo à educação e capacitação de mão de obra qualificada, além de fornecer uma base para pesquisa científica e programas de extensão universitária (EMBRAPA, 2005).

Há ainda a indiscutível importância social, dado que o café é invariavelmente uma das bebidas mais consumidas no mundo (Cao *et al.* 2024). Devido suas propriedades organolépticas que aguçam o olfato e paladar humano, o café tornou-se um hábito social por todo o mundo, e suas variadas espécies, floradas e modos de preparo proporcionam os mais diversos aromas, texturas, cores, níveis de acidez, notas e sabores (Santos *et al.* 2021).

A história do café no contexto brasileiro se entrelaça com o desenvolvimento político, social, econômico e, sobretudo cultural do país, uma vez que a bebida se faz presente afetuosamente no cotidiano da população. Além de contribuir de maneira significativa para a economia regional e nacional, a importância do café reflete em altos investimentos em pesquisas científicas, seja em instituições privadas ou em universidades, que se desdobram na busca por avanços tecnológicos nos setores de cultivo e colheita, busca por sustentabilidade, maior rentabilidade ao produtor e melhor produto ao consumidor, e é claro, os efeitos da bebida sobre a saúde humana, sendo o café um produto detentor de grandes compostos nutritivos e terapêuticos além de um estimulador natural (Fernandes, Pinto, 2001).

O café está intimamente ligado a cultura e identidade de Minas Gerais. Presente cotidianamente nas casas mineiras, o café também é uma fonte rentável de turismo histórico e gastronomia regional, através de cidades e construções com arquitetura colonial, festivais, museus e outras atividades artísticas que remontam e entrelaçam a história brasileira e do café.

2.3.2. Composição e propriedades físico-químicas da folha de café

A morfologia cafeeira é composta essencialmente por caule, folhas e fruto. O fruto, por sua vez, é composto pela casca (ou pericarpo), polpa, mucilagem (mesocarpo), pergaminho (endocarpo) e grão (Esquivel, Jiménez, 2012). Somente o grão é utilizado no processo de moagem e torrefação, logo, o restante das partes que compõe o fruto e a planta são descartados como subprodutos (Santos *et al.* 2021). A Figura 3 ilustra a planta cafeeira e suas partes constituintes.

Figura 3 – Ramo de café composto por caule, folhas e fruto.



O descarte desses subprodutos é considerado rotativo e poluente para o meio ambiente, uma vez que podem acarretar em um o acúmulo de matéria orgânica em corpos hídricos, geração de resíduos antinutricionais e ecotoxicológicos no ambiente, como os taninos, a cafeína e polifenóis, que, apesar de serem altamente benéficas a saúde humana, não o são para outros organismos vivos, além da toxicidade para plantas e animais (Esquivel, Jiménez 2012).

Uma solução sustentável e inteligente é o reaproveitamento desses resíduos, como a borra de café, um subproduto com alto valor agregado, composto basicamente por ácidos graxos, minerais e óleos, substâncias com larga aplicação na produção de nanomateriais, probióticos e aditivos nutracênicos na indústria alimentícia, biocombustíveis e, sobretudo, que permitem ser reciclados, como a recuperação de compostos fenólicos (Bijla *et al.* 2022).

Falando particularmente das folhas de café, estas têm sido reutilizada por diversas culturas com o intuito de fazer bebidas similares aos chás, além de já serem objeto de estudo no campo médio devido suas propriedades anticancerígenas, antiinflamatórias e antidiabéticas (Cao *et al.* 2024).

A descrição fitoquímica das folhas de café variam de acordo com a espécie vegetal, condições de cultivo, do solo e geoclima, idade fisiológica, manejo e colheita (Chen, 2019), mas sua composição pode ser sintetizada, como mostrado na Tabela 3, em termos de carboidratos e açúcares, compostos fenólicos, aminoácidos, ácidos orgânicos, sais minerais, lipídios e vitaminas.

Além disso, as folhas de café são abundantemente ricas em compostos bioativos, aqueles capazes de regular diversas funções metabólicas no corpo humano como a cafeína, os ácidos clorogênicos e a trigonelina (Mei, Ding *et al.* 2023).

Tabela 3 - Composição da folha de café arábica

Macronutrientes	Micronutrientes
Açúcares e carboidratos	Sacarose, glicose, frutose, galactose, maltose, treitol, sorbitol, galactinol e amido
Fenóis/ polifenóis	Ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido benzóico, ácido caftárico, ácido gentísico, ácido caféico, ácido p-cumárico e flavonóides
Lipídeos (ácidos graxos, óleos e ceras)	Ácidos mirístico, oleico e linolênico
Minerais	Cálcio, magnésio e ferro
Aminoácidos	b-alanina, homoserina, 4-OHprolina, cistina e ácido c-aminobutúrico (GABA), DL-Arginina, Homoarginina, Ácido L-Glutâmico, L-Norleucina, Ácido L-piroglutâmico, N-(3-Carboxipropanoil)-5-hidroxinorvalina, N3,N4-Dimetil-L-arginina, N(alfa),N(alfa)-Dimetil-L-histidina.
Alcaloides	Trigolina, cafeína, Uracila, teobromina, harmina, citosina, teobromina e teofilina
Compostos voláteis	D-limoneno, (E)-2-hexenal, Álcool fenetílico (2-feniletanol), linalol, salicilato de metila, álcool fenetílico e pentadecanal
Compostos não voláteis	Ácido nicotínico, Ácido L(-)-pipecolínico, ácido 4-cumárico, Ácido L(-)-pipecolínico, ácido delta-guanidinovalerico, Ácido Fitodienóico 12-oxo, Ácido 2-acetamido-3-(4-metoxifenil)propanoico, Ácido 6-oxo-pipecolínico

Fonte: Adaptado de Chen (2019) e Mei (2023)

Como mencionado anteriormente, o café tem sido objeto de estudo acerca do seu alto potencial antioxidante, que por sua vez está atrelado a alta concentração de compostos fenólicos em sua composição. Compostos fenólicos são substâncias que contêm uma ou mais hidroxilas ligadas essencialmente a estrutura do anel aromático, ou seja, ligados a um carbono de hibridização sp^2 . Esses compostos ocorrem de forma espontânea na natureza e estão presentes, por exemplo, na composição de óleos essenciais, sendo frequentemente responsáveis pelo sabor e fragrância de ervas, frutos e frutas, flores e entre outros. Os compostos fenólicos tem sido globalmente estudados dada suas importantes propriedades antioxidantes, antimutagenicos, anticancerígenas, antivirais e antiinflamatórias (Alu'datt *et al.* 2013).

Dessa forma, devido suas propriedades nutritivas, a ingestão diária e moderada da bebida pode ser tida como uma grande aliada na prevenção de doenças cardiovasculares, depressão e alguns tipos de câncer, além de conferir uma ação neuroprotetora contra doenças neurodegenerativas, tais como doença de Parkinson e Alzheimer, diminuir o nível de glicose sanguínea, atuar como antiinflamatório e ser um estimulante cognitivo e psicomotor (Saud, Salamatullah, 2021, Murai, Matsuda 2023).

Apesar das inúmeras pesquisas relacionadas a determinação de compostos fenólicos no café, a composição destes em sua totalidade ainda é desconhecida. Por meio do processamento de dados biológicos das moléculas de RNA, Ribeiro *et al.* (2023) reconstruíram as vias metabólicas das folhas de café, o que permitiu a inferência sobre a presença de diversos compostos ainda não catalogados para a espécie, dentre os quais a molécula de L-dopa. Além das análises *in silico*, foi conduzido também um estudo analítico utilizando a técnica de LC-MS/MS a fim de se comprovar a presença da L-dopa como um metabólito natural das plantas de café.

A identificação e quantificação, além da análise estrutural dos compostos fenólicos e principalmente de L-dopa, em amostras alimentícias, tem tido como aliada a técnica analítica de cromatografia líquida (HPLC), uma vez que a sensibilidade, alta resolução e precisão permitem uma investigação singularizada (Ding, Liu *et al.* 2019).

3. Validação da metodologia

Dado um cenário em que a técnica cromatográfica é amplamente utilizada em análises qualitativas e quantitativas de amostras ambientais, biológicas, alimentícias e farmacêuticas, a validação surge como uma forma de avaliação de métodos analíticos e um ateste da sua

confiabilidade. Portanto, existem diversas diretrizes que regulamentam os parâmetros e etapas de verificação para validação de métodos, dentro e fora do Brasil.

Dentre os órgãos nacionais, há a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). As principais agências internacionais são a Food and Drug Administration (FDA), EURACHEM e a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

Os parâmetros para a validação do desempenho analítico são a seletividade, linearidade, precisão e exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez do método. Algumas das agências e guias possuem tabelas com os critérios (valores e intervalos de confiança) de aceitação para cada um dos parâmetros das etapas de validação.

3.1. Seletividade

A seletividade pode ser definida como a capacidade do método de análise em questão em examinar o analito em detrimento da matriz amostral em que ele se encontra. Dessa forma, ao ponderar o nível de interferentes (sejam eles impurezas, compostos provenientes da degradação da amostra e espécies quimicamente similares ao analito) a seletividade permite que a resposta obtida pelo equipamento (pico cromatográfico, espectro) seja unicamente da substância de interesse, além de ser um pré-requisito para as outras etapas do processo de validação (Ribani *et al.* 2004).

Assim, a seletividade busca definir o grau de confiabilidade das medições realizadas em meio a matriz complexa e seus (possíveis) interferentes, ou seja, ela destina-se a distinguir o analito do meio amostral (Krug, 2019).

A adição padrão é realizada pela construção de duas curvas analíticas. A primeira é construída na presença da matriz e quantidades fixas de amostras, em que são adicionadas concentrações conhecidas e crescentes do padrão do analito. A construção da segunda curva envolve a adição do padrão com concentrações conhecidas e crescentes realizadas sem a presença da matriz, somente com os mesmos volumes fixos dos solventes utilizados ao longo da análise experimental.

Dessa forma, ambas são utilizadas para fins comparativos. Curvas de calibração paralelas (coeficiente angular similar) indicam que não há interferência da matriz ao longo da extração do analito e/ou injeção. De forma contrária, a obtenção de uma curva de calibração matrizada

com uma inclinação angular divergente da curva de referência, indica a existência de interferências no processo experimental (Ribani *et al.* 2004)

3.2. Linearidade

A linearidade correlaciona a proporção entre a concentração dos analitos em investigação e os dados experimentais obtidos dada uma faixa de intervalo trabalho, definida a partir de uma incerteza estatística aceitável (EURACHEM, 2014).

A construção de uma curva de calibração ou curva analítica permite relacionar matematicamente as concentrações previamente conhecidas de soluções injetadas no equipamento com os sinais obtidos ao longo da análise. Essa correlação gráfica descrita por uma equação linear, por sua vez, obtida pelo método de regressão linear, permite a quantificação de uma amostra desconhecida, contudo, para tanto, é necessário que a curva analítica tenha uma boa precisão e seja estatisticamente expressiva. O coeficiente de correlação r indica o grau de dispersão do conjunto de pontos e a incerteza relacionada a ela, sendo o r mais próximo do valor 1 o ideal (pontos da curva com pouca dispersão e um baixo nível de incerteza), sendo o intervalo de regressão uma faixa linear entre -1 e 1.

$$y = ax + b \quad (\text{Equação 1})$$

A equação 1 descreve matematicamente a correlação entre as duas variáveis obtidas na técnica instrumental, normalmente, concentração ou massa do composto versus sinal do equipamento.

A equação mencionada também descreve o comportamento de uma curva somente em uma determinada faixa de medição, seja ela massa do composto ou concentração.

A calibração externa pode ser utilizada desde que não haja componentes da matriz que interfiram na medição. Soluções padrão com concentrações conhecidas são utilizadas na construção de uma curva analítica para a calibração do analito. A curva de calibração relaciona as concentrações dos padrões com os sinais do equipamento, normalmente a área dos cromatogramas, e por meio da interpolação matemática e da área relativa ao pico cromatográfico resultante da injeção da amostra, calcula-se a concentração da mesma. Uma vez que não há o efeito matriz, os sinais analíticos obtidos para o padrão coincidem com as respostas analíticas esperadas para as amostras. A padronização externa é sensivelmente dependente das

variáveis como volume de amostra injetado no cromatógrafo, temperatura e solventes utilizados. Portanto, em cada uma das análises o procedimento deve ser refeito (Ribani *et al.* 2004).

A simulação de matriz, superposição de matriz ou ainda *matrix-matched* consiste em mimetizar a matriz original, contudo, sem a(s) espécie (s) de interesse. A essa matriz simulada, é adicionada o padrão do analito em diferentes concentrações para a construção de uma curva analítica (Ribani *et al.* 2004). O método da adição padrão, como já discutido, também é válido na determinação da linearidade.

3.3. Precisão

A precisão do método diz respeito a medida de dispersão dos dados obtidos experimentalmente em ensaios independentes. Estatisticamente, a precisão avalia a proximidade e a concordância dos resultados adquiridos através de replicadas da análise de uma mesma amostra, ou de amostras semelhantes sob determinadas e análogas condições experimentais (Ribani *et al.* 2004).

A agência de vigilância sanitária (ANVISA, 2003) regulamenta que o procedimento para determinar a precisão deve ser realizado com ao menos três amostras fortificadas com diferentes concentrações (sendo, para cada uma dessas concentrações, a realização de seis replicatas). O cálculo da repetibilidade engloba a determinação das concentrações do (s) analito (s), a concentração média, o desvio padrão (sr) dessas medidas e o coeficiente de variação de repetitividade das amostras fortificadas.

Uma das formas de calcular a precisão é por meio do desvio padrão absoluto, s , por meio da formula demonstrada abaixo, em que $\bar{x}$ é a média aritmética das medidas, x_i é o valor de uma medida apenas e n o numero total de medições, conforme a Equação 2:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Equação 2})$$

A estimativa do desvio padrão relativo (SRD) ou coeficiente de variação (CV), como também é chamado, é outra ferramenta estatista que permite o cálculo da precisão metodológica, como mostrado na Equação 3:

$$SRD\% \text{ ou } CV\% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \text{ (Equação 3)}$$

Três parâmetros permeiam a medida de precisão metodológica, são eles:

3.3.1. Repetibilidade

Dentre os aspectos que cercam a precisão, a repetibilidade diz respeito às variações dos resultados obtidos por replicadas experimentais realizadas somente por uma analista, em um mesmo laboratório, nas mesmas condições, com os mesmos métodos e em um curto intervalo de tempo (EURACHEM, 2014). Naturalmente, deseja-se o menor valor para a medida dessas variações.

3.3.2. Precisão Intermediária

A variação intermediária é um indicativo da precisão dos resultados obtidos em um único laboratório e mesmas condições experimentais, contudo, com um maior espaçamento de tempo e se possível com diferentes analistas. Usualmente, analisa-se a precisão intermediária em três dias distintos (EURACHEM, 2014).

3.3.3. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade diz respeito as medidas de precisão quando as análises são feitas por meio de ensaios interlaboriais, com um maior espaçamento de tempo entre as mesmas. (Eurachem, 2014).

3.4. Exatidão

A exatidão avalia o grau de concordância entre os resultados obtidos experimentalmente e os valores de referência, dado certos intervalos estatísticos de confiança. As formas de determinar a exatidão de um método variam, podendo ser por meio de materiais de referência

certificado (CRM), ensaios de recuperação, método da adição padrão ou comparação de métodos.

3.4.1. Ensaios de Recuperação

Os ensaios de recuperação (também chamado de fator de recuperação R) são realizados com a finalidade de avaliar numericamente o teor da substância ativa ou analito passível de ser extraído e quantificado, dada a matriz em que ele se encontra e as possíveis interações químicas. Os ensaios de recuperação podem ser feitos utilizando CRM, padrão da substância ou padrão interno (substância quimicamente similar à espécie de interesse). O maior empecilho nos ensaios de recuperação diz respeito a forma como o analito está presente na amostra, que pode ser diferente da interação entre o padrão adicionado e a matriz (Ribani *et al.* 2004).

3.5. Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) é o menor valor (ou valor limite) de concentração ou massa de analito, que pode ser detectado, mas não precisamente quantificado, ao longo da análise experimental considerando-se um determinado nível de confiança estatístico (Mitra, 2003).

Por meio dos parâmetros da curva analítica, o limite de detecção (LD) pode ser calculado a partir da Equação 4, em que s é a estimativa do desvio padrão da resposta obtida (do branco, do coeficiente linear ou do coeficiente de regressão) e S é o coeficiente angular obtido por meio da equação da reta ou curva analítica (Ribani *et al.* 2004).

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Equação 4})$$

3.6. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) é um parâmetro definido como o menor valor de concentração ou massa de analito que pode ser detectado ao longo da análise experimental com

um desempenho aceitável (Eurachem, 2014). Da mesma forma que o LD, o LQ pode ser calculado a partir dos parâmetros fornecidos pela curva analítica, que, por sua vez, é o método estatisticamente mais confiável quando tratamos de análises cromatográficas, conforme a Equação 5 (Ribani *et al.* 2004).

$$LQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (\text{Equação 5})$$

REFERÊNCIAS

- ALU'DATT, M. H. *et al.* **Distribution, antioxidant and characterisation of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives.** Food Chemistry v. 139, n. 1, p. 93-99, 2013.
- ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. **Benefícios do café na saúde: mito ou realidade?** Química Nova, v. 32, n. 8, p. 2169-2180, 2009.
- BIJLA, L. *et al.* **Spent coffee grounds: A sustainable approach toward novel perspectives of valorization.** Journal of Food Biochemistry v. 46, n. 8, p.14190, 2022.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para métodos analíticos e bioanalíticos.** Brasília, 2003. Série 1, 15 p.
- CAO, Q. *et al.* **Inhibition of pancreatic lipase by coffee leaves derived polyphenols: A mechanistic study.** Food Chemistry, v. 444, 2024.
- CÁSEDAS, G. *et al.* **Regulation of redox status in neuronal SH-SY5Y cells by blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) juice, cranberry (*Vaccinium macrocarpon* A.) juice and cyanidin.** Food and Chemical Toxicology, v. 118, p. 572-580, 2018.
- CHEN, X. **A review on coffee leaves: Phytochemicals, bioactivities and applications.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition v. 59, n. 6, p. 1008-1025, 2019.
- DING, C., *et al.* **Distribution and quantitative analysis of phenolic compounds in fractions of Japonica and Indica rice.** Food Chemistry v. 274, 2019.
- DUAN, S. *et al.* **L-3,4-dihydroxyphenylalanine Accumulation in Faba Bean (*Vicia faba* L.) Tissues during Different Growth Stages.** Agronomy-Basel v. 11, n. 3, 2021.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Faturamento das lavouras dos Cafés do Brasil alcança R\$ 56 bilhões em 2022.** Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/77921739/faturamento-das-lavouras-dos-cafes-do-brasil-alcanca-r-56-bilhoes-em-2022>. Acesso em 30 maio 2023.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **A importância do café nosso de todos os dias.** Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/17987068/a-importancia-do-cafe-nosso-de-todos-os-dias>. Acesso em 30 maio 2023.
- ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. **Functional properties of coffee and coffee by-products.** Food Research International v. 46, n. 2, p. 488-495, 2012.
- ETEMADI, F. *et al.* **Accumulation of l-DOPA in various organs of faba bean and influence of drought, nitrogen stress, and processing methods on l-DOPA yield.** The Crop Journal v. 6, n. 4, p. 426-434, 2018.
- EURACHEM, W. G. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.** 2nd ed. 2014.

FERNANDES, S. M.; PINTO, N. **Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado**. Current Agricultural Science and Technology v. 7, n. 3, 2001.

GOEDERT, M.; COMPSTON, A. **Parkinson's disease - the story of an eponym**. Nature Reviews Neurology v.14, n.1, p. 57-62, 2017.

ISHIBASHI, K. *et al.* **Adenosine A(2A) Receptor Occupancy by Caffeine After Coffee Intake in Parkinson's Disease**. Movement Disorders v. 37, n. 4, p. 853-857, 2022.

KRUG, FRANCISCO JOSÉ. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar** São Paulo: Ed. SBQ, 2019.

LANE, E. L. **L-DOPA for Parkinson's disease-a bittersweet pill**. European Journal of Neuroscience v. 49, n. 3, p. 384-398, 2019.

LATIF, S. *et al.* **Dopamine in Parkinson's disease**. Clinica Chimica Acta v. 522, p. 114-126, 2021.

LEE, L. K; RODZI, N.; **Addressing the Neuroprotective Actions of Coffee in Parkinson's Disease: An Emerging Nutrigenomic Analysis**. Antioxidants v. 11, n. 8, 2022.

LEES, A. J.; TOLOSA, E.; OLANOW, C. W. **Four pioneers of L-dopa treatment: Arvid Carlsson, Oleh Hornykiewicz, George Cotzias, and Melvin Yahr**. Movement disorders v. 30, n. 1, p.19-36, 2015.

LI, D. N.; *et al.* **Potential roles of oxidative distress on neurodegeneration in Parkinson's disease with neuropsychiatric symptoms**. Frontiers in Aging Neuroscience v. 14, 2022.

MCDONALD, C. *et al.* **200 Years of Parkinson's disease: what have we learnt from James Parkinson?** Age and Ageing, v. 47, n. 2, p. 209-214, 2018.

MEI, S.; DING, J.; CHEN, X. **Identification of differential volatile and non-volatile compounds in coffee leaves prepared from different tea processing steps using HS-SPME/GC-MS and HPLC Orbitrap-MS/MS and investigation of the binding mechanism of key phytochemicals with olfactory and taste receptors using molecular docking**. Food Research International v. 168, p. 112760, 2023.

MURAI, T.; MATSUDA, S. **The Chemopreventive Effects of Chlorogenic Acids, Phenolic Compounds in Coffee, against Inflammation, Cancer, and Neurological Diseases**. Molecules, v. 28, 2023.

OIC. Organização Internacional do Café. **Tabelas de estatísticas comerciais**. Disponível em: https://www.ico.org/trade_statistics.asp. Acesso em 30 maio de 2023.

OIC. Organização Internacional do Café. **Relatório sobre o mercado de café, dezembro 2022**. Disponível em: http://www.consorciopesquisacafe.com.br/images/stories/noticias/2021/2022/dezembro/relatorio_oic_dezembro_2022.pdf. Acesso em 30 maio 2023.

PATIL, R. R. *et al.* **Mucuna sanjappae Aitawade et Yadav: a new species of Mucuna with promising yield of anti-Parkinson's drug L-DOPA.** Genetic Resources and Crop Evolution v. 62, n. 1, p. 155-162, 2015.

POLANOWSKA, K. *et al.* **Development of a Sustainable, Simple, and Robust Method for Efficient L-DOPA Extraction.** Molecules v. 24, 2019.

RAJAN, S; KAAS. B. **Parkinson's Disease: Risk Factor Modification and Prevention.** Seminars in Neurology, v. 42, n. 5, p. 626-638, 2022.

RIBANI, M.; *et al.* **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova v. 27, 2024.

RIBEIRO, T. H. C., *et al.* **Metabolic Pathway Reconstruction Indicates the Presence of Important Medicinal Compounds in Coffea Such as L-DOPA.** International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 15, p. 12466, 2023.

RIMA *et al.* **Nutritional content and the activities of L-Dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) from Mucuna pruriens L. DC seeds of Central Java accession.** Arabian Journal of Chemistry v. 16, n.1, p. 104390, 2023.

RUÍZ, A. E. L.; OLIVEIRA, R. R. 1. **Geografia histórica do Café no Vale Paraíba do Sul.** Rio de Janeiro: Editora PUC RIO, 2018.

SANTOS, É. M. *et al.* **Coffee by-products in topical formulations: A review.** Trends in Food Science & Technology v. 111, p. 280-291 2021.

SAUD, S.; SALAMATULLAH, A. M. **Relationship between the Chemical Composition and the Biological Functions of Coffee.** Molecules v. 26, 2021.

SCHEPICI, G. *et al.* **Caffeine: An Overview of Its Beneficial Effects in Experimental Models and Clinical Trials of Parkinson's Disease.** International Journal of Molecular Sciences v. 21, n. 13, 2020.

SEILER, J. L. *et al.* **Dopamine across timescales and cell types: Relevance for phenotypes in Parkinson's disease progression.** Experimental Neurology, v. 374, p. 114693, 2024.

SOLOMONS; GRAHAM, T. W.; FRYHLE; CRAIG, B. **Química Orgânica**, vol. 2. 9 ed. LTC, 2009.

SWANSON, C. R.; SESSO, S. L.; EMBORG, M. E. **Can we prevent Parkinson's disease?** Frontiers in Bioscience-Landmark, v. 14, p. 1642-1660, 2009.

TOPAL, N; BOZOGLU, H. **Determination of L-Dopa (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine) Content of Some Faba Bean (Vicia faba L.) Genotypes.** Journal of Agricultural Sciences-Tarim Bilimleri Dergisi, v. 22, n. 2, p. 145-151, 2016.

YUMOTO, E.; YANAGIHARA, N.; ASAHINA, M. **The simple and rapid quantification method for L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) from plant sprout using liquid chromatography-mass spectrometry.** Plant Biotechnol (Tokyo) v. **39**, n. 2, p. 199-204, 2022.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA PARA A EXTRAÇÃO DO NEUROPRECURSOR L-DOPA EM FOLHAS DE CAFÉ UTILZANDO HPLC-DAD

Artigo redigido conforme a norma NBR 6022 (ABNT, 2018)

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvida e validada uma metodologia de extração do aminoácido fenólico L-dopa em folhas de *Coffea arabica* por HPLC-DAD. Os parâmetros avaliados que afetam a eficiência de extração da L-dopa (proporção entre massa seca de material vegetal e solvente extrator, concentração do solvente extrator e tempo de extração) foram otimizados de forma univariada em detrimento da forma multivariada, dada as dificuldades de trabalhar com amostras de fácil degradação e oxidação. As melhores condições de extração encontradas foram proporção 1:25 (m/v) (0,2g de material vegetal para 5 mL de solvente), solução de ácido acético 0,3% (v/v), 15 minutos de extração por agitação e extração dupla. A metodologia foi validada em termos de linearidade, limite de quantificação, (LQ) e limite de detecção (LD), precisão e exatidão. O método demonstrou boa linearidade ($R^2=0,9998$), em uma faixa de trabalho de 0,19 a 15,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os limites de detecção e de quantificação foram, 0,12 e 0,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. a metodologia prescrita foi utilizada na determinação de L-dopa em folhas de *Coffea arabica*, *Coffea eugenoides* e *Coffea canephora*. As concentrações encontradas de L-dopa variaram entre 0,42 e 7,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *Coffea eugenoides*. *Coffea canephora*. L-dopa. Aminoácido fenólico.

ABSTRACT

In this work, a methodology for extracting the phenolic amino acid L-dopa from *Coffea arabica* leaves was developed and validated. The evaluated parameters that affect the extraction efficiency of L-dopa (proportion between dry mass of plant material and extracting solvent, concentration of the extracting solvent and extraction time) were optimized in a univariate way instead of the multivariate way, given the difficulties of working with samples that are easy to degrade and oxidize. The best extraction conditions found were a 1:25 (m/v) ratio (0.2g of plant material for 5 mL of solvent), 0.3% (v/v) acetic acid solution, 15 minutes of extraction and extraction pair. The methodology was valid in terms of linearity, limit of quantification, (LQ) and limit of detection (LD), precision and accuracy. The method demonstrated good linearity ($R^2=0.99977$), in a working range of 0.19 to 15.77 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The detection and quantification limits were 0.12 and 0.38 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. the prescribed methodology was used to determine L-dopa in leaves of *C. arabica*, *C. eugenoides* and *C. canephora*. The concentrations of L-dopa found varied between 0.42 and 7.11 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Key words: *Coffea arabica*. *Coffea eugenoides*. *Coffea canephora*. L-dopa. Phenolic amino acid.

1. INTRODUÇÃO

A L-dopa é um aminoácido fenólico e precursora do neuro hormônio dopamina, que por sua vez, é responsável principalmente pelas funções motoras e cognitivas no corpo humano. A molécula de L-dopa possui extensiva importância no tratamento da doença de Parkinson, uma síndrome neurodegenerativa que atinge precisamente a região no cérebro responsável pela síntese da dopamina. Devido as lesões e a morte neural ocasionadas pela doença, os níveis de dopamina no cérebro decaem drasticamente e diversos sintomas motores e neuropsiquiátricos, tais como rigidez, fraqueza e tremores musculares, apatia e/ou euforia, depressão, ansiedade e alucinações passam a se manifestar evidenciando o parkinsonismo (Latif *et al.* 2021; Li *et al.* 2021).

O tratamento para a síndrome de Parkinson é realizado por meio da ingestão de um fármaco cujo princípio ativo é a L-dopa (McDonald *et al.* 2018). Estruturalmente falando, a L-dopa e a dopamina possuem grandes semelhanças, desde a cadeia carbônica com anel aromático, passando pelas funções fenólicas e aminas, e se distinguindo apenas pela ausência de um grupamento ácido carboxílico na molécula neurotransmissora. Devido a essa pequena distinção estrutural, e de forma excepcional, somente a L-dopa endógena (aquela ingerida ou presente na corrente sanguínea) é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, uma espécie de película que reveste o sistema nervoso central. Dessa forma, ao chegar ao cérebro, a L-dopa é enfim metabolizada no neurotransmissor dopamina (Lane, 2019).

Diversos estudos evidenciam uma atividade neuroprotetora de determinados alimentos ricos em compostos fenólicos, como o café, o mirtilo e o açaí, para com a Doença de Parkinson e outras patologias neurodegenerativas (Cásedas *et al.* 2018; Schepici, Silvestro *et al.* 2020; Parra-Paz *et al.* 2021; Lee, Rodzi, 2022). Outras pesquisas identificaram especificamente a L-dopa em algumas espécies de leguminosas, como a *Vicia faba* e a *Mucuna*, normalmente encontradas nas regiões tropicais dos continentes africano e asiático (Patil *et al.* 2015; Etemadi *et al.* 2018; Duan *et al.* 2021; Rima *et al.* 2023).

Recentemente um estudo identificou a ocorrência de L-dopa em duas espécies de café, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* utilizando o processamento de dados biológicos das moléculas de RNA para inferir sua presença e posteriormente por análises instrumentais a fim de se confirmar a L-dopa como um metabólito natural presente nas folhas de café (Ribeiro *et al.* 2023).

O café é uma das maiores *commodities* do mundo, sendo o Brasil o maior produtor e exportador em nível mundial (Ma, Li *et al.* 2022) (EMBRAPA, 2023). No território nacional, só o estado de Minas Gerais é responsável por aproximadamente 87% de toda a produção do país. Além disso, o café está intimamente ligado ao desenvolvimento social e cultural, sobretudo da população brasileira (EMBRAPA, 2023).

As metodologias relatadas na literatura para a determinação da L-dopa em alimentos consistem na técnica de cromatografia líquida acoplada a detectores ultravioleta (UV), arranjo de diodos (DAD) e ou espectrômetro de massas (MS). Para as etapas de extração, as metodologias perpassam por solventes extratores de alta toxicidade, com muitas etapas de extração e elevada complexidade, o que levam a degradação e anulação das prospectivas aplicações da espécie extraída (Polanowska *et al.* 2019).

Dessa forma, essa pesquisa buscou se dedicar ao desenvolvimento e validação de uma metodologia para a extração da L-dopa em amostras de café utilizando a técnica instrumental de HPLC-DAD. O principal intuito do método proposto foi a utilização de um solvente extrator de baixa toxicidade, sustentável e com boa eficiência para a extração da espécie química, visando a obtenção desta para futuras aplicações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais, Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados nesse estudo foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida pelo equipamento de purificação Milli-Q (Millipore) com resistividade de 18,2 M Ω .cm.

A solução estoque de L-3,4-dihidroxifenilalanina ($\geq 98\%$ Sigma Aldrich), de concentração 1,97 g L⁻¹, foi preparada utilizando ácido acético 0,3% (v/v) ($\geq 99\%$ Sigma Aldrich) em água ultrapura (Milli-Q[®]). A solução de L-dopa, preparada em cada um dos dias de análise, foi armazenada sob refrigeração de 4°C. As concentrações utilizadas nos ensaios de validação foram 0,197; 0,394; 0,78; 1,18; 1,57; 1,97; 3,94; 7,88; 11,83 e 15,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A extração do composto foi feita utilizando tubos falcon com tampa com capacidade máxima de 15 mL. Para as análises cromatográficas, foram utilizados frascos de vidro âmbar (vial) com tampa e capacidade máxima de 1,5 mL.

2.2. Instrumentação

Ao longo da extração das amostras, foi utilizada uma incubadora shaker com controle de temperatura e de agitação (SL 222, Solab) 20°C e centrífuga refrigerada (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific). O preparo de amostras foi realizado no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LFMP) da Universidade Federal de Lavras.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta resolução acoplado ao detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) da marca Agilent, 1290 Infinity e coluna cromatográfica de fase reversa Luna C18 (Phenomenex) de dimensões (250 mm x 4,60mm x 5µm). Amostrador automático mantido a 4°C. A eluição da fase móvel ocorreu no modo gradiente, sendo a fase móvel A composta por solução aquosa de ácido acético 3% e a fase móvel B sendo composta por metanol. A metodologia foi adaptada a partir do estudo de (Mei, Ding *et al.* 2023) em seu estudo de identificação de compostos voláteis e não voláteis em folhas de café. O gradiente estabelecido foi: 0 min 5% B; 0-3 min, 10% B; 3-6 min, 15% B; 6-9 min, 30% B; 9-10 min, 35% B; 10-11 min, 30%B; 11-13 min, 15% B; 13-14min, 5% B; 15 min, 5% B. O fluxo otimizado do gradiente foi de 0,5 mL min⁻¹ e o volume de injeção das amostras foi de 20 µL. O comprimento de onda utilizado no detector foi de 280 nm. As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análises Instrumentais da mesma universidade.

2.3. Amostras

As folhas da *Coffea arabica* e *Coffea eugenoides* foram coletadas no setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras. As folhas da *Coffea canephora* foram obtidas na fazenda experimental da mesma universidade. A coleta e armazenamento das folhas das três espécies foram feitas utilizando nitrogênio líquido a fim de se evitar a oxidação do material vegetal.

2.4. Procedimento de extração da L-dopa

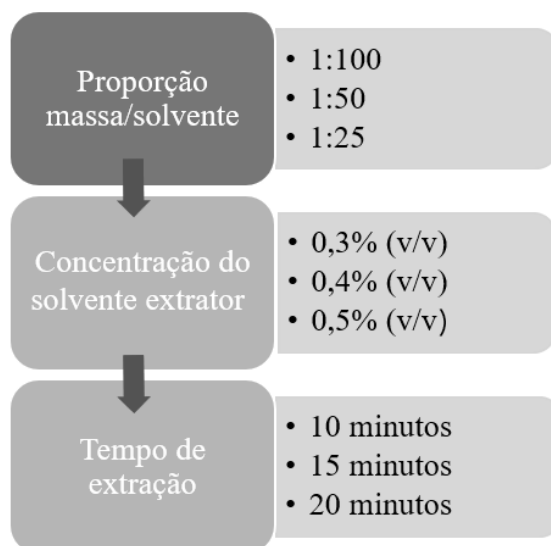
A metodologia descrita foi uma adaptação de Ribeiro *et al.* (2023). As folhas de café foram maceradas com nitrogênio líquido até textura de um pó fino e homogêneo. Em seguida, 0,2 g desse material foi pesado e transferido a um tubo Falcon de 50 mL. Ao tubo foram

adicionados 5,00 mL de uma solução de ácido acético 0,3% (v/v). O tubo foi selado e levado ao shaker com agitação de 240 rpm e temperatura controlada em 20°C por 15 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada em 13.000 rpm por 10 minutos e 4°C. O sobrenadante obtido foi transferido a outro tubo falcon e mantido em banho de gelo. À biomassa restante foram adicionados mais 5,00 mL da solução de ácido acético 0,3% (v/v) e novamente submetido à etapa de extração. O sobrenadante final foi agregado ao sobrenadante anterior e assim foram submetidos à filtração com uma membrana de poro de 0,45µm. O conteúdo filtrado foi transferido a um vial de 1,5mL e conduzido à análise por HPCL/DAD.

2.5. Planejamento experimental

Para otimizar a extração da L-dopa em folhas de café, foi empregado um planejamento experimental univariado para a avaliação de três parâmetros afim de se obter a maior eficiência na extração. Os parâmetros avaliados foram proporção entre massa seca do material e volume de solvente, concentração do solvente extrator e tempo de extração. Foram realizados 9 experimentos em duplicatas, conforme o fluxograma na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma ilustrando o planejamento experimental



As três primeiras amostras, feitas em triplicatas, foram realizadas a fim de se investigar a melhor proporção entre massa seca do material vegetal e o volume de solvente extrator. Para isso, foram pesadas 0,5g, 0,1g e 0,2g da folha macerada e cada qual foi submetida ao processo

de extração anteriormente descrito, utilizando 5,0 mL de ácido acético 0,3% (v/v) e 10 minutos de extração no shaker. Em seguida as amostras foram submetidas a análise por HPLC-DAD. A melhor proporção obtida foi fixada, conjuntamente aos 10 minutos de extração, e assim foram feitos ensaios a fim de se obter a melhor eficiência a partir de diferentes concentrações de ácido acético: 0,3% (v/v), 0,4% (v/v) e 0,5% (v/v). Novamente, a partir da seleção da melhor concentração de solvente extrator, foi estudado o melhor tempo de extração da L-dopa nas amostras de folhas de café: 10, 15 e 20 minutos.

2.6. Validação da metodologia

Para fins de validação da metodologia desenvolvida, foram avaliados parâmetros tais como: linearidade, precisão, fator de recuperação, e limites de detecção e de quantificação. Cada um desses parâmetros foi avaliado conforme as recomendações expostas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

2.6.1. Linearidade

A linearidade pode ser verificada por meio da construção de uma curva analítica com uma faixa de concentração entre 0,19 a 15,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para o ensaio em questão, foram preparadas soluções fortificadas nas concentrações: 0,19; 0,39; 0,78; 1,18; 1,57; 1,97; 3,94; 7,88; 11,83 e 15,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.6.2. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estabelecidos a partir do desvio padrão (s) da equação da linha de regressão pelo coeficiente angular (S) da equação da reta, ambos obtidos pela curva analítica, conforme mostrado nas equações 1 e 2. Em cada um dos pontos foram realizados ensaios em triplicata.

$$\text{Limite de detecção: } LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (1)$$

$$\text{Limite de Quantificação: } LQ = 10 \frac{s}{S} \quad (2)$$

2.6.3. Precisão

A precisão da metodologia foi realizada por meio de análises intradia e interdia. A primeira foi avaliada efetuando-se três extrações consecutivas nas folhas de café fortificadas com L-dopa em três níveis de concentrações (0,78; 1,51 e 3,94 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A precisão interdia, por sua vez, foi realizada repetindo a análise intradia em três dias distintos. As respostas analíticas obtidas dessas análises foram apresentadas em termos de coeficiente de variação (CV%).

2.6.4. Fator de Recuperação

A exatidão do método foi estudada por meio do fator de recuperação da espécie na matriz fortificada e na matriz sem fortificação, utilizando a metodologia de extração proposta. As concentrações utilizadas no estudo foram 0,78; 1,51 e 3,94 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de L-dopa. Cada um dos ensaios foi realizado em triplicata. O fator de recuperação (R) foi calculado conforme a equação 3.

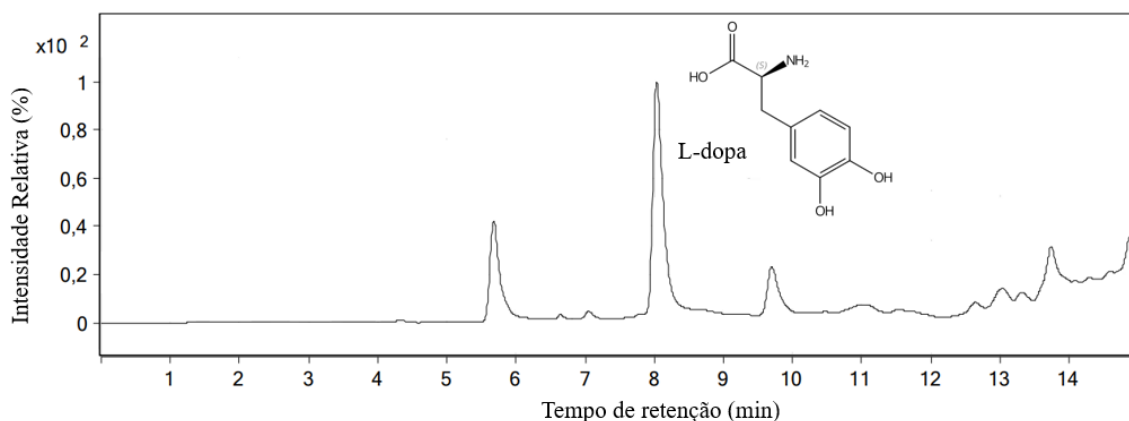
$$R (\%) = \frac{[\text{padrão na matriz}]}{[\text{padrão na ausência de matriz}]} \times 100\% \quad (3)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Condições Cromatográficas

A melhor condição para a corrida cromatográfica na análise da L-dopa foi a rampa de gradiente com tempo total de 15 minutos. O tempo médio de retenção verificado para a L-dopa foi de 8 minutos. A Figura 2 mostra o cromatograma com o pico da L-dopa na amostra de folhas de café (*C. arabica*) enriquecido com o padrão a fim de se verificar a presença de algum interferente ou efeito matriz das amostras. Pelo cromatograma é possível notar a boa separação entre os picos na análise do tecido vegetal, o que evidencia a seletividade do método proposto.

Figura 2 - Cromatograma da análise da *C. arabica* fortificada com padrão 11,83 $\mu\text{g mL}^{-1}$.



3.2. Planejamento Experimental e Desenvolvimento da Metodologia

A combinação entre o grande número de amostras, a facilidade de oxidação do material vegetal e as numerosas condições experimentais para a avaliação dos parâmetros tornou inviável a análise multivariada nesse estudo. Os sinais analíticos obtidos por meio dessa análise não foram satisfatórios e não apresentaram significância estatística em um intervalo de 95% de confiança. Dessa forma, a análise da influência dos parâmetros na extração foi realizada de maneira univariada.

Dentre os critérios avaliados univariadamente, os de maior significância foram à proporção entre a massa e solvente extrator e a concentração do solvente extrator, conforme as Tabelas 1 e 2. Já o tempo de extração teve uma menor influência no processo, conforme o mostrado na Tabela 3.

A proporção entre material vegetal e volume de solvente extrator afetou diretamente o teor de L-dopa no extrato final. Alguns testes realizados preliminarmente demonstraram que proporções menores que 1:25 (m/v) - em que uma maior massa de material vegetal foi extraída com o mesmo volume do solvente -, não forneceram respostas satisfatórias, dado que as áreas correspondentes ao pico da L-dopa não aumentaram significativamente, o que pode sugerir uma saturação da L-dopa no solvente extrator. Portanto, para o estudo de otimização foram selecionadas as proporções 1:100, 1:50 e 1:25 (m/v). O maior rendimento obtido foi com a proporção 1:25 (0,2g de folhas para 5 mL de solvente extrator). O resultado é reforçado pelo estudo de Polanowska *et al.* (2019), que discutem que se tratando de matrizes vegetais e

extração de compostos fenólicos da mesma, a menor proporção ou maior relação entre o material sólido e solvente costuma ser favorecida. Na pesquisa conduzida pelos autores a melhor proporção entre encontrada foi 1:25 (m/v) para a análise de L-dopa em favas da *Vicia faba*.

Tabela 3 - Resultados da avaliação entre a proporção para a análise da L-dopa em folhas de café

Massa folha	Proporção m/v	Área média para a L-dopa
0,05g	1:100	16,25
0,1g	1:50	29,00
0,2g	1:25	69,74

Polanowska *et al.* (2019) discorrem sobre o uso do ácido acético aquoso favorecer a hidrólise da porção polissacarídica dos tecidos vegetais, que por sua vez, propiciaria a liberação da L-dopa da rede e forneceria um maior rendimento da espécie no extrato final. A escolha da concentração do solvente extrator foi feita testando-se três concentrações de ácido acético, 0,3% (v/v), 0,4% (v/v) e 0,5% (v/v). A concentração é um fator importante pois a quantidade de prótons provenientes da dissociação do ácido acético na solução pode favorecer diretamente a protonação do grupo funcional amina presente na estrutura da L-dopa e consequentemente, favorecer as interações intermoleculares (ligações de hidrogênio) entre essas moléculas.

Testes realizados previamente demonstraram que concentrações menores que 0,2% (v/v) do solvente extrator não foram eficientes para extração da espécie de interesse nas folhas de café, uma vez que ao analisar o extrato obtido, os picos cromatográficos para a espécie química não puderam ser identificados no tempo de retenção esperado. Por outro lado, concentrações mais elevadas de ácido acético não contribuíram significativamente para um teor mais elevado de L-dopa no extrato. Dessa forma, a solução de ácido acético 0,3% (v/v) foi utilizada como solvente de extração por demonstrar eficiência e menor consumo de reagente.

Tabela 4 - Resultados da avaliação da concentração do ácido acético como solvente extrator para a análise da L-dopa em folhas de café

Concentração de ácido acético	Área média para a L-dopa
0,3 % (v/v)	82,16
0,4 % (v/v)	80,71
0,5 % (v/v)	67,50

Em seu estudo, Ribeiro *et al.* (2023), utilizaram uma solução de ácido acético 0,1% (v/v) para a L-dopa. No entanto, não foram relatadas as áreas ou o teor de L-dopa encontrados nas amostras analisadas para fins de comparação. Polanowska *et al.* (2019) estimaram as melhores concentrações para a extração da espécie entre 0,2% (v/v) a 0,3% (v/v) na análise de tecidos vegetais da leguminosa *V. faba*.

O tempo de extração foi o parâmetro em que os resultados tiveram a menor faixa de diferença no teor final de L-dopa, uma vez que as áreas obtidas para a obtenção da L-dopa foram consideravelmente próximas. Um aumento de 10 para 15 minutos resultou em um aumento de quase 7% na área cromatográfica correspondente a L-dopa. No entanto, um aumento no tempo de extração para 20 minutos diminuiu o teor da espécie no extrato final, o que sugere que o tempo adicional na extração afeta diretamente a estabilidade da espécie, ocasionando a degradação da mesma. Dessa forma, a extração máxima para a L-dopa foi obtida com um tempo de 15 minutos.

Tabela 5 - Resultados da avaliação do tempo de extração na análise da L-dopa em folhas de café

Tempo de extração	Área média para a L-dopa
10 minutos	72,64
15 minutos	77,69
20 minutos	72,34

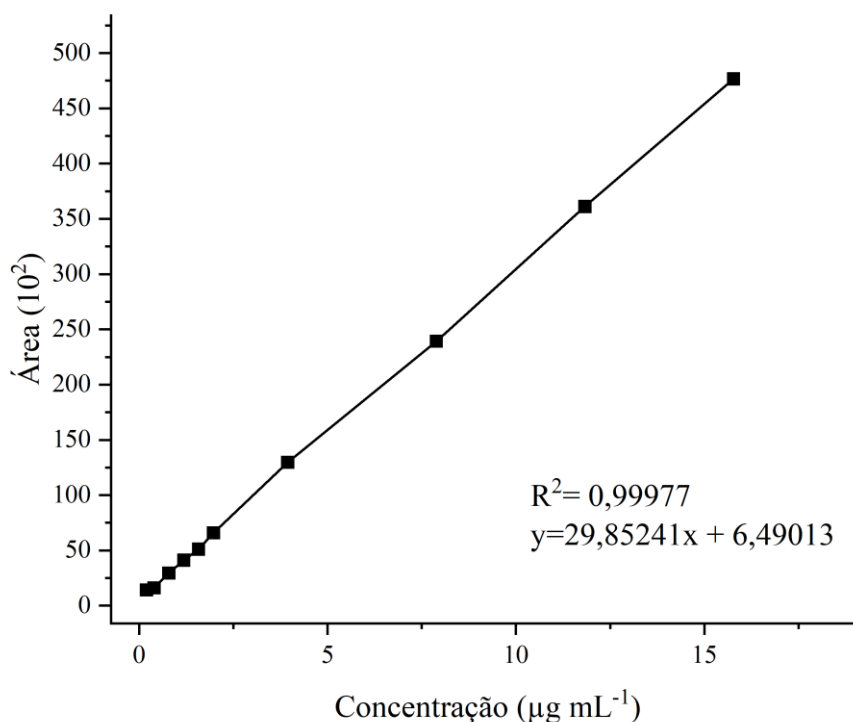
Dessa forma, considerando os resultados obtidos, as condições ótimas consideradas para essa metodologia foram 0,2g de massa de material vegetal para 0,5mL de solvente (proporção 1:25), com a utilização de uma solução de ácido acético 0,3% (v/v) como solvente extrator e 15 minutos de extração, empregando-se também uma extração dupla afim de se obter exaustivamente a espécie química de interesse.

3.3. Validação da metodologia

A linearidade do método desenvolvido para a quantificação da L-dopa em folhas de café foi feito pelo método de superposição de matriz. A faixa de trabalho linear utilizada na construção das curvas analíticas foi de 0,19 a 15,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A Figura 3 mostra o comportamento do padrão em solvente em termos de linearidade. A construção da curva analítica deu-se em função das medidas dos sinais cromatográficos, dados em termos de área versus as concentrações de L-dopa nas folhas de café. A inclinação da reta indicou um valor de 29,85241, enquanto o valor da interseção da reta forneceu um valor de 6,49013. O coeficiente de correlação, R^2 , obtido foi de 0,9997, indicando um elevado grau de correlação linear entre as medidas adquiridas.

Figura 3 - Curva analítica para o padrão de L-dopa construída em solvente em uma faixa linear de 0,19 a 15,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$

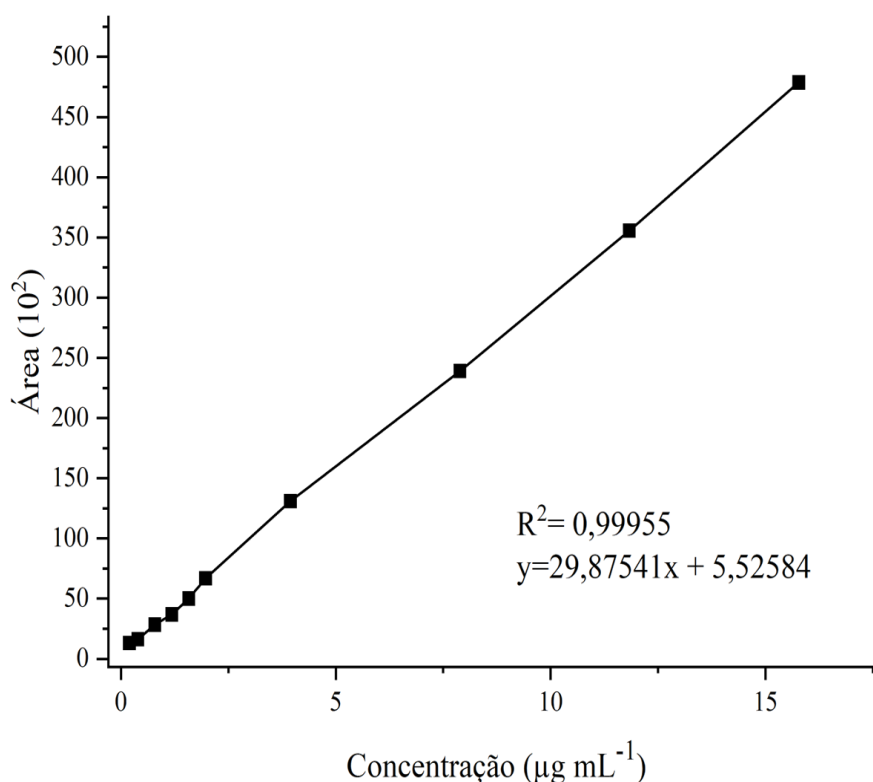


A avaliação do efeito dos co-extrativos nos sinais analíticos na análise da L-dopa foi realizada comparando-se a curva construída por calibração externa com a curva construída pelo método de superposição de matriz. Essa segunda curva analítica foi construída a partir da adição

de quantidades conhecidas e crescentes de padrão sobre um *pool* das amostras de folhas senescentes de *C. arabica*. O ponto P0 para a curva foi obtido pelo sinal analítico médio de 5 extrações consecutivas das folhas senescentes e do sinal analítico do pool dessas amostras. A partir desse ponto, foram realizadas as fortificações na mesma faixa linear e nos mesmos pontos da curva obtida por calibração externa. A construção da curva se deu em função da subtração da área encontrada para os padrões pela área média das amostras de folhas senescentes. A Figura 4 mostra a curva obtida pelo método.

A equação da curva analítica da superposição de matriz, obtida pelo método dos mínimos quadrados – assim como a curva por calibração externa-, demonstrou boa linearidade dado o coeficiente de correlação obtido ($R^2=0,9995$). Os valores para a inclinação e para a intersecção da reta foram 29,87541 e 5,52584, respectivamente.

Figura 4 - Curva analítica construída pelo método de superposição de matriz em uma faixa linear de 0,19 a 15,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$



Uma vez que a curva construída pelo método da superposição de matriz confere uma maior confluência para com a composição da amostra e os sinais analíticos delas obtidos, a quantificação da L-dopa nas folhas de café das três espécies estudadas foram realizadas a partir desta última.

Os limites de quantificação e de detecção foram determinados fundamentalmente com base nos parâmetros extraídos da curva fortificada. Os valores obtidos para LD e LQ foram 0,12 e 0,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, estimados pelo s da curva. Ribeiro *et al.* (2023) obtiveram os valores de 0,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o LD e 2,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em uma faixa de trabalho de 0.1 to 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando HPLC acoplado a um detector UV/VIS.

A precisão metodológica foi estimada em três níveis de concentrações e estudadas em análises intradia e interdia. Os coeficientes de variação (% CV) obtidos estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados da precisão intradia e interdia obtidos por análise HPLC-DAD

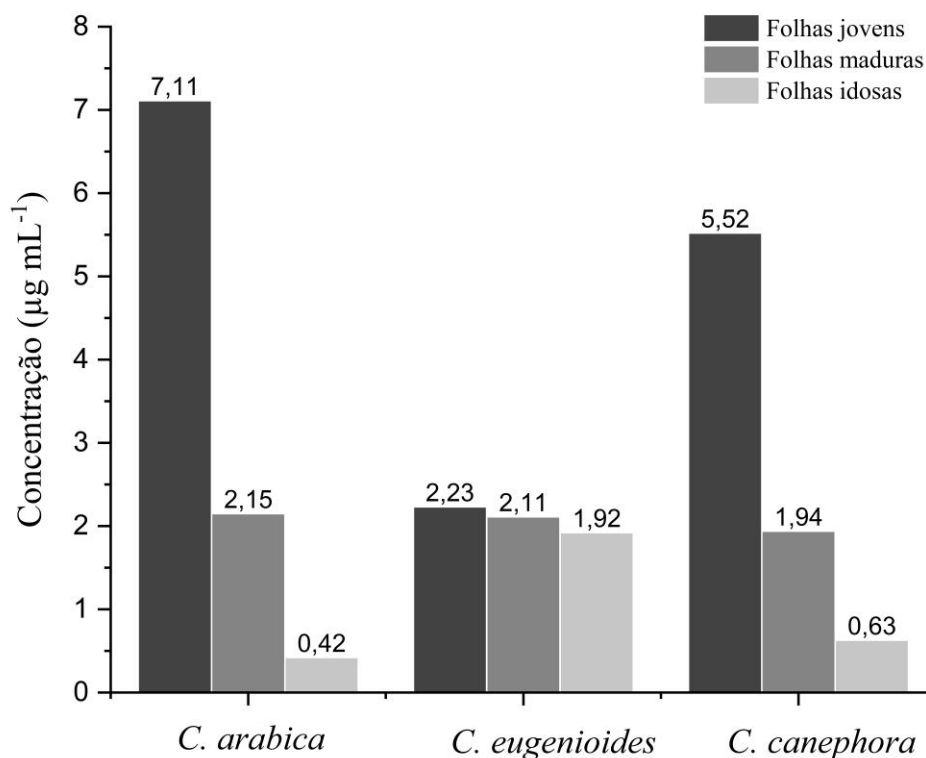
Analito	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão intradia (% CV)	Precisão interdia (% CV)
L-dopa	0,78	1,77	3,82
	1,51	2,26	6,64
	3,94	3,11	3,44

Na determinação de traços, são aceitos coeficientes de variação de até 20% (Ribani *et al.*, 2004). A exatidão do método, obtida por meio do estudo de recuperação foi calculada a partir das concentrações de L-dopa na matriz fortificada com as concentrações de L-dopa na matriz sem fortificação. Para os três níveis de concentração (0,78; 1,51 e 3,94 $\mu\text{g mL}^{-1}$) valores recuperados foram, 101,76%, 115,53% e 80,25%, respectivamente. O intervalo aceitável para a recuperação é entre 70% a 120% (Ribani *et al.*, 2004).

3.4. Determinação de L-dopa *Coffea arabica*, *Coffea eugenioides* e *Coffea canephora*

Os estudos de linearidade serviram como base para a quantificação da L-dopa em folhas de três espécies de café *C. arabica*, *C. eugenioides* e *C. canephora*. Cada uma das análises – para folhas jovens, maduras e senescentes – foram feitas em triplicatas. As respostas obtidas foram em função da área apresentada pelo da L-dopa, com tempo de retenção médio de 7,81 minutos. A Figura 5 reproduz as concentrações médias obtidas pela análise cromatográfica.

Figura 5 - Gráfico ilustrando as concentrações de L-dopa encontradas em folhas de *C. arabica*, *C. eugenioides* e *C. canephora*



A *Coffea arabica* foi a espécie com o maior teor de L-dopa encontrado em folhas jovens. Paralelamente a isso foi também a espécie com o maior decaimento da substância conforme o avanço da maturidade fisiológica. A *Coffea eugenioides* teve as menores concentrações expressas de L-dopa para folhas jovens, contudo, o estudo mostrou que o teor de L-dopa nessa espécie vegetal se mantém ligeiramente constante mesmo com o progresso da idade biológica. A *Coffea canephora* apresentou áreas semelhantes, ora ligeiramente menores que a *C. arabica* para as folhas jovens e maduras, ora ligeiramente maiores para folhas senescentes, mantendo a tendência do comportamento íngreme com o avanço da idade vegetal.

A descoberta e confirmação da presença da L-dopa nesses tecidos é indiscutivelmente de grande relevância. No entanto, ainda não se pode afirmar que o consumo das folhas ou de seu chá possa contribuir diretamente no aumento de L-dopa no organismo humano.

4. CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida possibilitou a extração e quantificação da L-dopa em amostras de folhas de café, mesmo se tratando de uma amostra tão complexa. A utilização do ácido acético como solvente extrator demonstrou alta eficiência na obtenção da espécie química, além de contribuir para uma metodologia mais sustentável, com menor geração de resíduos tóxicos e poluentes, muito comuns nos preparos de amostras e na cromatografia.

O estudo abre portas para futuras pesquisas acerca da utilização e aplicação da L-dopa extraídas dos tecidos vegetais do cafeeiro, tanto como matéria prima para a fabricação de fármacos, quanto como um possível auxílio na prevenção e ou tratamento de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson. Além disso, a identificação de um composto de grande importância medicinal nas folhas de café contribui para a mudança de panorama acerca do reaproveitamento do que é tido como resíduos agrícolas.

REFERÊNCIAS

- CÁSEDAS, G. *et al.* **Regulation of redox status in neuronal SH-SY5Y cells by blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) juice, cranberry (*Vaccinium macrocarpon* A.) juice and cyanidin.** Food and Chemical Toxicology, v. 118, p. 572-580, 2018.
DOI: 10.1016/j.fct.2018.05.066.
- DUAN, S. *et al.* **L-3,4-dihydroxyphenylalanine Accumulation in Faba Bean (*Vicia faba* L.) Tissues during Different Growth Stages.** Agronomy-Basel v. 11, n. 3, 2021.
DOI: 10.3390/agronomy11030502
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Faturamento das lavouras dos Cafés do Brasil alcança R\$ 56 bilhões em 2022.** Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/77921739/faturamento-das-lavouras-dos-cafes-do-brasil-alcanca-r-56-bilhoes-em-2022>. Acesso em 30 maio 2023.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **A importância do café nosso de todos os dias.** Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/17987068/a-importancia-do-cafe-nosso-de-todos-os-dias>. Acesso em 30 maio 2023
- ETEMADI, F. *et al.* **Accumulation of l-DOPA in various organs of faba bean and influence of drought, nitrogen stress, and processing methods on l-DOPA yield.** The Crop Journal v. 6, n. 4, p. 426-434, 2018.
DOI: 10.1016/j.cj.2017.12.001
- LANE, E. L. **L-DOPA for Parkinson's disease-a bittersweet pill.** European Journal of Neuroscience v. 49, n. 3, p. 384-398, 2019.
DOI: 10.1111/ejn.14119
- LATIF, S. *et al.* **Dopamine in Parkinson's disease.** Clinica Chimica Acta v. 522, p. 114-126, 2021.
DOI: 10.1016/j.cca.2021.08.009
- LEE, L. K.; RODZI, N.; **Addressing the Neuroprotective Actions of Coffee in Parkinson's Disease: An Emerging Nutrigenomic Analysis.** Antioxidants v. 11, n. 8, 2022.
DOI: 10.3390/antiox11081587
- LI, D. N.; *et al.* **Potential roles of oxidative distress on neurodegeneration in Parkinson's disease with neuropsychiatric symptoms.** Frontiers in Aging Neuroscience v. 14, 2022.
DOI: 10.3389/fnagi.2022.875059
- MA, J., LI, J.; HE, H.; JIN, X.; CESARINO, I.; ZENG, W.; LI, Z. **Characterization of sensory properties of Yunnan coffee.** Current Research in Food Science v. 5, p. 1205-1215, 2022.
DOI: 10.1016/j.crfs.2022.07.010
- MCDONALD, C. *et al.* **200 Years of Parkinson's disease: what have we learnt from James Parkinson?** Age and Ageing, v. 47, n. 2, p. 209-214, 2018.
DOI: 10.1093/ageing/afx196

MEI, S.; DING, J.; CHEN, X. **Identification of differential volatile and non-volatile compounds in coffee leaves prepared from different tea processing steps using HS-SPME/GC–MS and HPLC Orbitrap-MS/MS and investigation of the binding mechanism of key phytochemicals with olfactory and taste receptors using molecular docking.** Food Research International v. 168, p. 112760, 2023.
DOI: 10.1016/j.foodres.2023.112760

PARRA-PAZ, V. G. *et al.* **Chronic feeding with 3% dried raw blueberries (V. corymbosum) reduces apomorphine-induced rotations and striatal dopaminergic loss in hemiparkinsonian rats.** Food Research International v. 140, p. 110066, 2021.
DOI: 10.1016/j.foodres.2020.110066

PATIL, R. R. *et al.* **Mucuna sanjappae Aitawade et Yadav: a new species of Mucuna with promising yield of anti-Parkinson's drug L-DOPA.** Genetic Resources and Crop Evolution v. 62, n. 1, p. 155-162, 2015.
DOI:10.1007/s10722-014-0164-8

POLANOWSKA, K. *et al.* **Development of a Sustainable, Simple, and Robust Method for Efficient L-DOPA Extraction.** Molecules v. 24, 2019.
DOI: 10.3390/molecules24122325.

RIBANI, M. *et al.* **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova v. 27, 2024.
DOI: 10.1590/S0100-40422004000500017

RIBEIRO, T. H. C., *et al.* **Metabolic Pathway Reconstruction Indicates the Presence of Important Medicinal Compounds in Coffea Such as L-DOPA.**
DOI: 10.3390/ijms241512466.

RIMA *et al.* **Nutritional content and the activities of L-Dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) from Mucuna pruriens L. DC seeds of Central Java accession.** Arabian Journal of Chemistry v. 16, n.1, p. 104390, 2023.
DOI: 10.1016/j.arabjc.2022.104390

SCHEPICI, G. *et al.* **Caffeine: An Overview of Its Beneficial Effects in Experimental Models and Clinical Trials of Parkinson's Disease.** International Journal of Molecular Sciences v. 21, n. 13, 2020.
DOI: 10.3390/ijms21134766

SEILER, J. L.; ZHUANG, X.; NELSON, A. B.; LERNER, T. N. **Dopamine across timescales and cell types: Relevance for phenotypes in Parkinson's disease progression.** Experimental Neurology, v. 374, p. 114693, 2024.
DOI: 10.1016/j.expneurol.2024.114693

TERCEIRA PARTE

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, folhas de diferentes espécies de café em diferentes estágios de maturação fisiológica foram examinadas quanto à presença do neuro precursor L-dopa. Assim, foi desenvolvido e validado um método rápido de HPLC-DAD para a determinação de L-dopa na matriz alimentar em estudo. A metodologia analítica desenvolvida demonstrou características de desempenho satisfatórias, possibilitando a determinação e separação da espécie química de interesse em 15 minutos de análise cromatográfica.