

OTIMIZAMIZAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DA BORRA DO CAFÉ POR EXTRAÇÃO SÓLIDO- LÍQUIDO ASSISTIDO POR ULTRASSOM UTILIZANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Ícaro A. Costa¹; Geovana C. da Silva²; Ana Beatriz dos S. V. N. Infante¹; Iranildo A. Oliveira¹; Ícaro T. C. Amorim²; Anaildes L. de Carvalho³, Bruno O. Moreira^{1,2}

¹ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-graduação em Química.

² Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde

³ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Ciências Naturais
assuncao.icarocosta@gmail.com

Palavras-Chave: Cafeína, compostos fenólicos, HPLC-DAD.

Introdução

O café foi cultivado pela primeira vez entre os séculos V e VIII. Pertence a família *Rubiaceae* e faz parte da família *Coffea*, subfamília *Cinchonoidae* (Mustafa *et al.*, 2022) que inclui mais de 124 espécies conhecidas (Gunning *et al.*, 2018). Entre elas, as espécies de maior valor comercial incluem a *Coffea arabica* L. e *Coffea canéfora* Pierre ex A.Froehner (Wermelinger *et al.*, 2011) comumente referidas como Arábica e Robusta, respectivamente.

A bebida consiste em mais de 1000 compostos voláteis e não voláteis que são responsáveis pelo sabor e aroma (Santanatoglia *et al.*, 2023). Destes, a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é o composto mais abundante e mais estudado, conhecido pelo efeito estimulante do sistema nervoso central (Bae *et al.*, 2014). Entre os compostos responsáveis por conferir sabor e aroma a bebida do café vale destacar ácidos carboxílicos, ácidos orgânicos (AOs) e ácidos clorogênicos (ACGs). Segundo Yeager *et al.* (2021) existem cerca de 38 AOs diferentes descritos pela literatura, dos quais são responsáveis por conferir a acidez percebida na bebida (Bressani *et al.*, 2020).

A cadeia produtiva do café gera em seu processo uma quantidade de resíduo denominado borra. Convém ressaltar que, apenas no ano de 2005, o Brasil, sendo maior produtor mundial de café, produziu cerca de 6 milhões de toneladas do resíduo borra de café (RBC) (Takimoto *et al.*, 2005). Em média, para cada tonelada de café verde produzido, obtém-se 480 kg de borra, e nesse resíduo há cerca de 20% de óleos (Lago; Freitas, 2006).

Existe grande variedade de metodologias que objetivam a extração de substâncias bioativas, dentre as mais comuns vale destacar a extração por Soxhlet, extração sólido-líquido e extração líquido-líquido (Kaur *et al.*, 2017), essas técnicas convencionais de extração fazem uso de solventes tais quais: hexano, metanol, clorofórmio e diclorometano (Gallego *et al.*, 2018) que apresentam riscos severos à saúde humana e ao meio ambiente. Nesse sentido, a extração verde preconiza eliminar substâncias tóxicas na recuperação de compostos bioativos de interesse, reduzindo o consumo de energia e promovendo o uso de solventes alternativos garantindo a qualidade e segurança e eficiência dos processos de extração (Chemat *et al.*, 2012).

Vários métodos analíticos têm sido propostos para a caracterização, identificação e quantificação de ácidos clorogênicos e cafeína em amostras de café. Os métodos mais utilizados foram HPLC-DAD (Bicho *et al.*, 2011; Monteiro; Farah, 2012; Caprioli *et al.*, 2013) e LC-MS (Perrone *et al.*, 2008). Outras técnicas como UV-Vis e HPLC-DAD com permeação em gel foram relatadas como técnicas eficientes para determinação simultânea de cafeína e ácidos

clorogênicos (Wale *et al.*, 2024). Contudo, o HPLC-DAD de fase reversa é mais rápido e seletivo quando comparado ao método UV-Vis e relativamente barato quando comparado ao LC-MS.

Portanto, o objetivo desse estudo foi determinar cafeína, ácido clorogênico e teor de fenólicos totais no resíduo borra de café, bem como otimizar os processos de extração assistida por ultrassom de substâncias bioativas usando metodologia de superfície de resposta no planejamento experimental.

Material e Métodos

Preparo da amostra: As amostras de borra de café (*Coffea arabica*) utilizadas foram cedidas pela cafeteria Rei do Mate®. O RBC foi seco em estufa a 50°C até 5% de umidade para evitar deterioração microbiana (Silva *et al.*, 2022).

Planejamento de misturas (PM): O PM foi realizado para avaliar a influência das proporções de uma mistura ternária de solventes ambientalmente sustentáveis (acetona, etanol e água) na extração de bioativos do RBC. Os experimentos foram realizados com três replicatas do ponto central e de forma randomizada. A análise estatística foi conduzida usando o software Design-Expert 13.0.5.0, considerando o teor de cafeína como resposta independente em uma análise e, em outra, uma resposta múltipla modelada matematicamente que combinou os teores de ACG e TFT.

Extração assistida por ultrassom (EAU): A EAU do ACG e cafeína foi realizada usando ultrassom (Elmasonic P, Elma, EUA) equipado com um balão de fundo chato de 125 mL e condensador sob refluxo constante, com razão 1:35 de RBC e solvente extrator. A EAU foi realizada em banho ultrassônico por 30 minutos (50°C, 80 W e 37 Hz). Os extratos foram filtrados, secos em estufa a 45°C até evaporação completa do solvente e peso constante.

Preparo para análise no HPLC-DAD: 10 mg do extrato seco foram dissolvidos em 1 mL de metanol:água (8:2 v/v) em tubos Falcon, submetidos a banho ultrassônico (80 W, 37 Hz) por 10 minutos, centrifugados (Rotofix 32A, Hettich, Alemanha) a 4.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado e injetado no HPLC-DAD.

Preparo dos padrões para análise no HPLC-DAD: Para quantificação de cafeína e ACG, foram preparados seis padrões para cada analito a partir de uma solução estoque de 2000 mg/L. As concentrações dos padrões foram: 1000, 300, 75, 15 e 5 mg/L para ACG e 1000, 750, 500, 250 e 100 mg/L para cafeína. As soluções foram preparadas com metanol-água (8:2 v/v) e analisadas em triplicata no HPLC-DAD.

Análise por HPLC-DAD: As análises foram realizadas no sistema Shimadzu Prominence com volume de injeção de 20 µL, usando coluna VertiSep GES C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm) (Vertical, Milão, Itália). A eluição foi em modo gradiente com ácido acético 1% (v/v) e metanol grau HPLC, fluxo de 0,5 mL/min e detecção a 273 nm para cafeína e 327 nm para ACG.

Análise de teor de fenólicos totais (TFT): A determinação de TFT presente nas amostras dos extratos obtidos no PM foi realizado utilizando o método de Folin-Ciocalteu com adaptações segundo Moreira *et al.* (2020). Os resultados foram expressos em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mgEAG/g).

Resultados e Discussão

Na Figura 1, apresentamos o cromatograma de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-DAD) do extrato do resíduo borra do café extraído com solvente ternário composto pelos seguintes componentes: A-Acetona, B-Etanol e C-Água. A análise minuciosa dos componentes presentes no extrato possibilitou a identificação de substância majoritárias, das quais estão presentes ácido clorogênico (ACG) e cafeína, com os picos correspondentes em 19,294 e 20,864 min, respectivamente, identificados por comparação com padrões.

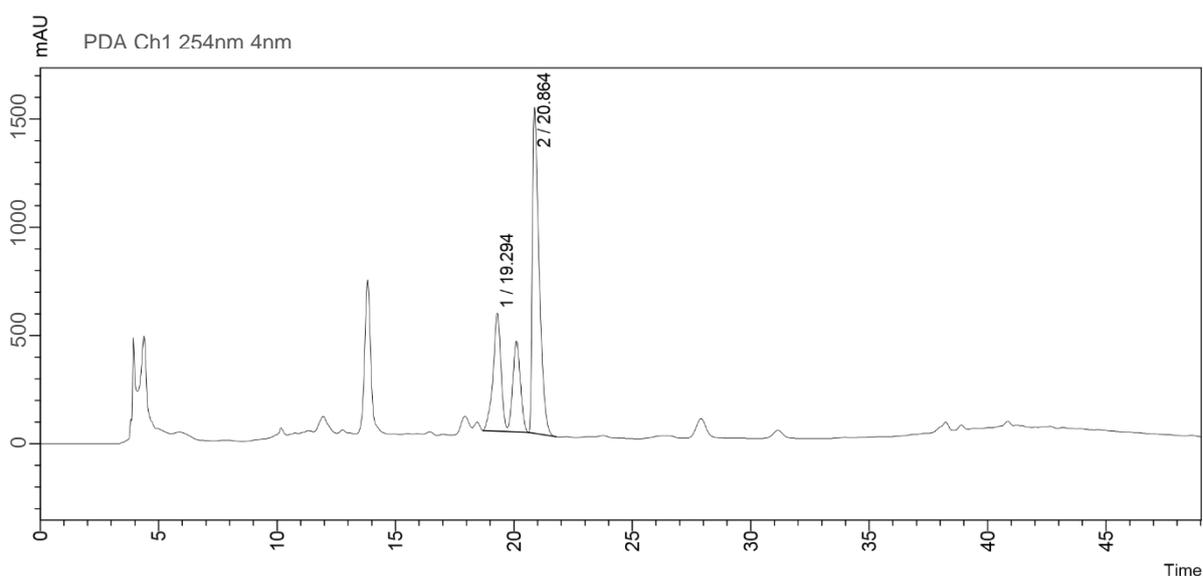


Figura 1. Cromatograma obtido por HPLC-DAD do extrato do RBC.

O método estudado utilizou da regressão linear descrita na tabela 2 para quantificar ácido clorogênico e cafeína.

Tabela 2. Regressão de determinação dos compostos do resíduo borra do café.

Compostos	Faixa da concentração (mg/L)	Equação da regressão	R ²	LQ	LD
Cafeína	100-1000	$y = 71523x + 6^6$	0,9988	41,1	124,5
Ácido clorogênico	5-1000	$y = 92627 + 2^6$	0,9986	33,5	60,2

^a R²: coeficiente de determinação; ^b LQ: (limite de quantificação = 10 x relação sinal-ruído (S/R)) ^c LD: (limite de detecção) = 3 x relação sinal-ruído (S/R)

Solventes polares como acetona, etanol e água são eficazes para extrair compostos polares como o ácido clorogênico, que possui grupos funcionais hidrofílicos (Luo *et al.*, 2023). Solventes polares podem promover a dissolução do ácido clorogênico e garantir extração eficiente, enquanto o ultrassom promove o rompimento da parede celular, liberando esses compostos no meio (Petchsolmrit *et al.*, 2022). Portanto, a combinação de solventes polares pode ser usada para otimizar a extração de uma gama mais ampla de substâncias.

Para avaliar a capacidade extratora da mistura de acetona, etanol e água, utilizou-se a metodologia de superfície de resposta (MSR), considerando o teor de cafeína como resposta independente em uma análise e, em outra, uma resposta múltipla modelada matematicamente que combinou os teores de ACG e TFT. A análise dos dados revelou que o modelo quadrático especial quártico foi o mais adequado, com base no valor de p ($p = 0,0476$), que indica significância estatística do modelo ao nível de 95% de confiança. O coeficiente de determinação (R²) de 0,9826 demonstra que o modelo é capaz de explicar 98,26% da variação nos dados observados, indicando um excelente ajuste do modelo aos dados experimentais. O R² ajustado

de 0,9361 reforça a qualidade do ajuste. Esses dados em conjunto sugerem que o modelo matemático é robusto em termos de ajuste e eficiente em prever as respostas dentro do intervalo estudado. A precisão adequada mede a relação sinal-ruído, uma relação maior que 4 é desejável (Miller; Miller, 2010). O valor de precisão adequado do modelo foi de 11,4 indicando uma discriminação adequada do modelo e que podemos usá-lo para navegar no espaço do PM. O desvio padrão foi de 4,35 indicando um bom grau de dispersão do conjunto de dados.

O PM foi realizado para otimizar a melhor proporção dos três solventes usados (A-Acetona, B-Etanol e C-Água). A equação 1 correlaciona essas três variáveis e a resposta analítica, nessa equação só foi mostrada as variáveis significativas.

Eq. 1: $y = + 8,55 A + 9,65 B + 48,95 C + 67,82 AC + 62,42 BC + 1571,78 A^2BC - 1416,22 ABC^2$

Os Fatores de Inflação de Variância (VIF) medem o quanto a variância dos coeficientes do modelo aumenta devido à falta de ortogonalidade no design. Como regra geral VIFs abaixo de 10 não são motivo de preocupação (Rawlings *et al.*, 1998). Todos os VIFs do modelo foram menores que 10 (2,32 a 6,42). O impacto do componente C é maior no método empregado, seguido de A e B. As interações entre componentes como AC e BC também têm um efeito significativamente positivo no processo de extração. Os termos quadráticos e complexos mostram interações mais significativas, como A^2BC tendo um efeito muito grande e positivo, enquanto ABC^2 tem um efeito consideravelmente negativo.

MSR via PM é um método experimental eficiente para determinar a composição ideal dos solventes usados em um processo de extração. A partir da equação de regressão (Eq. 1) e da análise das superfícies de respostas foi possível obter a mistura ideal dos solventes que maximiza o processo de extração dos bioativos de interesse.

Para verificar o modelo matemático previsto pelo software, foi realizado um experimento de verificação no qual a extração foi realizada sob a mistura ideal de solventes ($n = 3$). Os valores experimentais determinados foram $51,30 \pm 0,07$ mg/g de cafeína, $57,10 \pm 0,04$ mg/g de ácido clorogênico e $15,20 \pm 0,03$ mg EAG/g de fenólicos totais, consistentes com o valor previsto pelo modelo matemático. Não houve diferença significativa entre os valores das respostas analíticas obtidas sob a condição ótima e aqueles indicados por predição do modelo ($p < 0,05$), levando em consideração os intervalos de confiança.

Empregando o procedimento de Rossi e Singleton (1965), que consiste na extração de óleo da borra de café com Soxhlet e solvente hexano, Magalhães *et al.* (2022) obtiveram um resultado de 0,1877 mg EAG/g para o teor de fenólicos totais, valor considerado muito baixo. O estudo de Mussato *et al.* (2011) empregou metanol e etanol para a obtenção de extratos da borra de café, foi relatado o valor de 16,0 mg EAG/g de extrato, estando valores muito próximos daqueles obtidos nesse trabalho.

Palomino García e Del Bianchi (2015) avaliaram a capacidade antioxidante de resíduos de café. Os autores prepararam os extratos acetônicos da borra de café utilizando solução acetona/água 80:20 (v/v) e obtiveram um teor de fenólicos totais de 70,25 mg EAG/g de resíduo, um valor muito superior àqueles já relatados na literatura. Os autores não detectaram, ácido clorogênico nas amostras; portanto a capacidade redutora parece estar associada à presença de cafeína e trigonelina (Esquivel; Jimenez, 2012).

A presença desses compostos orgânicos é relatada na literatura para grãos de café. A concentração encontrada por (Desai *et al.*, 2020) sugere que a borra do café mantém uma quantidade considerada do ácido clorogênico, conhecido pelas propriedades antioxidantes. A cafeína foi detectada por Clifford (1999) em uma concentração de 20-675 mg, dependendo da espécie de café e das condições de processamento, refletindo o quanto do composto foi extraído durante o preparo. Esses níveis são superiores aos encontrados na borra do café (Mussato *et al.* (2011). A presença desses compostos sugere que a borra do café pode ter aplicações potenciais, tanto em termos de reaproveitamento para benefícios antioxidantes quanto na utilização de suas propriedades estimulantes. No entanto, variações na concentração podem ocorrer dependendo de fatores como o preparo e a origem dos grãos, o que merece uma investigação adicional para um entendimento mais aprofundado.

Conclusões

A extração sólido-líquido usando o sistema ternário de solventes acetona:etanol:metanol foi um método eficiente para extrair compostos fenólicos antioxidantes do resíduo borra do café usado. A extração de fenólicos totais, ácidos clorogênico e cafeína foram afetados pela concentração da mistura. O valor máximo de fenólicos totais extraídos foi de 15,20 mg EAG/g de extrato nas condições ótimas de extração, bem como 57,20 mg/g de ácido clorogênico e 51,30 mg/g de cafeína. Vale enfatizar o valor ambiental de utilizar solventes menos poluentes na obtenção de compostos fenólicos de produtos naturais, sendo mais recomendadas para aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica. A extração assistida por ultrassom mostrou-se adequada a extração dos compostos fenólicos do resíduo borra do café, sendo mais rápida e econômica. O uso do solvente orgânico diluído em água foi útil para estabelecer a quantidade máxima de compostos fenólicos que estava presente no resíduo da borra do café, e também para verificar a possibilidade de obter extratos ricos em compostos fenólicos antioxidantes desse resíduo agroindustrial.

Agradecimentos

Agradecemos a FAPESB pelo apoio concedido na forma de bolsa de mestrado pelo Ícaro A. Costa.

Referências

- Bae, J.-H.; Park, J.-H.; Im, S.-S.; Song, D.-K., Coffee and health. **Integrative Medicine Research**, 3(4), 189-191, 2014.
- Bicho, N.C.; Leitão, A.E.; Ramanho, J.C.; Lindon, F.C. Identification of chemical clusters discriminators of the roast degree in Arabica and Robusta coffee beans. **European Food Research and Technology**, 233(2), 303-311, 2011.
- Bressani, A.P.P; Martinez, S.J.; Sarmiento, A.B.I.; Borém, F.M.; Schwan, R.F. Organic acids produced during fermentation and sensory perception in speciality coffee using yeast started culture. **Food Research International**, 128, 108779, 2020.
- Caprioli, G.; Cortese, M.; Odello, L.; Ricciutelli, M.; Sagratini, G.; Tomassoni, G.; Torrefiani, E.; Vittori, S. Importance of espresso coffee machine parameters on the extraction of chlorogenic acids in a certified italian espresso by using SPE-HPLC-DAD. **Journal of Food Research**, 2(3), 55-64, 2013.

Clifford, M.N. Chlorogenic acid and Other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **J. Sci. Food Agric.**, 80(7), 1033-1043, 1999.

Chemat, F.; Vian, M.A.; Cravotto, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **Int. J. Mol. Sci.**, 13(7), 8615–8627, 2012.

Desai, N.M.; Mallik, B.; Sakhare, S.D.; Murthy, P.S. prebiotic oligosaccharide enriched green coffee spend cookies and their nutritional, physicochemical and sensory properties. **LWT**, 134, 109924, 2020.

Esquivel, P.; Jiménez, V.M. Funcional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, 46(2), 488-495, 2012.

Gallego, R.; Montero, L.; Cifuentes, A.; Ibanez, E.; Herrero, M. Green extraction of bioactive compounds from microalgae. **J. Anal. Test.**, 2, 109–123, 2018.

Gunning, Y.; Defernez, M.; Watson, A.d.; Beadman, N.; Colquhoun, I.J.; Gall, Gwénaëlle, Le G.; Philo, M.; Garwood, H.; Williamson, D., Davis, A.P.; Kemsley, E.K. 16-O-methylcafestol is present in ground roast Arabica coffees: Implications for authenticity testing. **Food Chemistry**, 248, 52-60, 2018.

Kaur, K.; Kaur, J.; Kumar, R.; Mehta, S.K. Formulation and physicochemical study of α -tocopherol based oil in water nanoemulsion stabilized with non toxic, biodegradable surfactant: sodium stearoyl lactate. **Ultrason. Sonochem.**, 38, 570–578, 2017.

Lago, R.C.A.; Freitas, S.P. **Extração dos óleos do café verde e da borra com etanol comercial**. Comunicado Técnico 92. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 6 p., 2006.

Luo, M.; Liu, X.; Zhao, Z.; Wang, F.; Shao, C. Optimization of glycerol extraction of chlorogenic acid from heoneysuckle by response surface methodology. **Processes**, 110(11), 2-11, 2023.

Magalhães, B.L da S.; Vaz, M.R.F.; Nascimento, S.C.C.; Brasil, D. do S.B.; Campos, I.G.; Ribeiro, L.A.D. Caracterização e extração do óleo da borra de café por diferentes solventes. **Conjecturas**, 22(16), 1101-1112, 2022.

Miller, J.N.; Miller, J.C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6ª ed. Pearson:London, 2010.

Monteiro, M.C.; Farah, A. Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops. 134(1), 611-614, 2012.

Moreira, B.O.; Barbosa Filho, M.R.D.; Carvalho, A.L.; Silva, D.G.; Cruz, M.P.; Yatsuda, R.; David, J.M. Application of response surface methodology for optimization of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from *Cenostigma macrophyllum*. **Journal of Chemometrics**, 34(1), 1-12, 2020.

Mussatto, S.I.; Ballesteros, L.F.; Martins, S.; Teixeira, J.A. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. **Separation and Purification Technology**, 83, 173-179, 2011.

Mustafa, A.M.; Abouelenein, D.; Angeloni, S.; Maggi, F.; Navarini, L.; Sagratini, G.; Santanatoglia, A.; Torregiani, E.; Vittori, S.; Caprioli, G. A new HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of quercetin and its derivatives in green coffee beans. **Foods**, 11(19), 3033, 2022.

Palomino García, L.R.; Del Bianchi V.L. Capacidade antioxidante em resíduos da indústria cafeeira. **Braz. J. Food Technol.**, 18(4), 307-313, 2015.

Perrone, D.; Donangelo, C.M.; Farah, A. Fast simultaneous analysis of caffeine, tigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, 110(4), 1030-1035, 2008.

Petchsomrit, A.; Chanthathamrongsiri, N.; Manmuan, S.; Leelakanok, N.; Wangpradit, N.; Vangsak, B.; Sirirak, T. Green extraction of *Buchanania siamensis* and water-based formulations. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, 30, 1-10, 2022.

Rawlings, J.O.; Pantula, S.G.; Dickey, D.A. **Applied regression analysis: a research tool**. 2ª ed. Springer:USA, 1998.

Santanatoglia, A.; Angeloni, S.; Fiorito, M.; Fioretti, L.; Ricciutielli, M.; Sagratini, G.; Vittori, S.; Caprioli, G. Development of new analytical methods for the quantification of organic acids, chlorogenic acids and caffeine in



espresso coffee by using solid-phase extraction (SPE) and high-performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD). **Journal Food Composition and Analysis**, 125, 105732, 2024.

Silva, M.F.; Pettinato, M.; Casazza, A.A.; Maciel, M.I.S. Perego, P. Design and evaluation of non-conventional extraction for bioactive compounds recovery from spent coffee (*Coffea arabica* L.) grounds. **Chemical Engineering Research and Design**, 177, 418-430, 2022.

Wale, K., Tolessa, K., Atlabachew, M.; Mehari, B.; Alemayehu, M.; Mengistu, D.A.; Kerisew, B. Level of caffeine, trigonelline and chlorogenic acid in green coffee (*Coffea arabica* L.) beans from Amhara region, Ethiopia. **Journal of Agriculture and Food Research**, 16, 101082, 2024.

Wermelinger, T.; D'Ambrosio, L.; Klopprogge, B.; Yeretian, C. Quantification of the Robusta fraction in a coffee blend via raman spectroscopy: Proof of principle. **J. Agric. Food Chem.**, 59(17), 9074-9079, 2011.

Yeager, S.E.; Batali, M.E.; Guinard, J.X.; Ristenpart, W.D. Acids in coffee: a review of sensory measurements and meta-analysis of chemical composition. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 63(3), 1-27, 2021.