

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
TESE DE DOUTORADO**

**RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO RESÍDUO DO
PROCESSAMENTO DO CAFÉ (*SILVERSKIN*): OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE
EXTRAÇÃO; CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
TOXICIDADE DOS EXTRATOS**

ANAÍ LOREIRO DOS SANTOS

Porto Alegre, abril de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANAÍ LOREIRO DOS SANTOS

**RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO RESÍDUO DO
PROCESSAMENTO DO CAFÉ (*SILVERSKIN*): OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE
EXTRAÇÃO; CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E
TOXICIDADE DOS EXTRATOS**

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Química

Profa. Dra. Elina Bastos Caramão
Orientadora

Porto Alegre, abril de 2018.

CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Anaí Loreiro dos
S237 Recuperação de compostos bioativos do resíduo do processamento do café (silverskin): otimização do processo de extração; caracterização química, capacidade antioxidante e toxicidade dos extratos / Anaí Loreiro dos Santos. - Porto Alegre, 2018.
135 f. : 30 cm. ; Il. Color.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Elina Bastos Caramão.
Tese (doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Química Analítica. 2. Cafeína. 3. Ácido Clorogênico. 4. I. Caramão, Elina Bastos, orient.
II. Título.

CDD 540
CDU 543

Elaborado por Daniel Cunha CRB 10/1904, com os dados fornecidos pela autora.

DECLARAÇÃO DE AUTORIA

A presente tese foi realizada inteiramente pela autora no período entre 08/2013 e 03/2018, sob a orientação da Professora Doutora Elina Bastos Caramão. As etapas de extração e análises químicas foram realizadas no Laboratório de Química Analítica e Ambiental do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A capacidade antioxidante e toxicidade dos extratos foram avaliadas no Laboratório de Recursos Naturais da Universidade Estadual de Dourados, Mato Grosso do Sul. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Rosângela Assis Jacques

Profa. Dra. Lisiane dos Santos Freitas

Profa. Dra. Cláudia Alcaraz Zini

Prof. Dr. Jailson Bittencourt de
Andrade

Profa. Dra. Elina Bastos Caramão

Anaí Loreiro dos Santos

“Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa”.

Riobaldo em Grande Sertão: Veredas, 1956.

João Guimarães Rosa

*Aos meus amados pais Júlia e Rubens e aos
meus irmãos: Neíla, Alex e Gélson.*

AGRADECIMENTOS

A realização, não só deste trabalho, mas de tudo o que ele representa para mim, só foi possível graças à contribuição de várias pessoas, às quais eu gostaria de expressar meus mais sinceros agradecimentos.

À professora Elina Bastos Caramão, por ter me aceito no grupo de pesquisa e ser um exemplo profissional para os seus alunos. Agradeço a sua orientação, disponibilidade, paciência, compreensão, apoio, generosidade e, não menos importante, bom humor.

Agradeço às demais professoras do grupo, profa. Rosângela Assis Jacques, pelo apoio, incentivo e disponibilização do equipamento para as análises químicas, e profa. Cláudia Alcaraz Zini, sempre incansável em prol do bom andamento dos trabalhos. Ao prof. Eliseu Rodrigues, pelo auxílio na análise dos ácidos clorogênicos.

Agradeço à profa. Cláudia Andréia Lima Cardoso pela ajuda nas avaliações da atividade antioxidante e da toxicidade dos extratos, mas principalmente, por ser umas das pessoas mais genuinamente generosas que conheci no meio acadêmico.

Agradeço à aluna de iniciação científica Bruna Bernard Dias. Bruna, sem teu auxílio, tranquilidade, sorrisos e cafés, tudo teria sido muito mais difícil. Tenho certeza que teu futuro será brilhante.

Agradeço a todos os colegas com os quais convivi no Laboratório de Química Analítica Ambiental e Oleoquímica da UFRGS, e que lá deixaram um pouco de si: Silvana Aranda, Marcelo Migliorini, Maria Elisabete Machado, Erica Silva, Juliana Macedo, Juliane Welke, Karine Nicolli, Janaina Barabará, Flaviana Damasceno, Michele Espinosa, Valéria Peres, Thiago Bjerk, Fernando Fontanive, Jaderson Schneider, Márcia Brasil, Márcia Manique, Bruna Onorevoli, Eliane Lazzari, Tiago Schena, Enelise Scapin, Caroline Saucier, Carmem Primaz, Gabriela Maciel, Fernando Georges, Liliane Gruber, Candice Faccini, Daniela Dal Molim, Débora Tomasini, Francieli Mayer, Eduardo Diedoviec, Isadora Dalla Vecchia, Rafael Soares, Juciara Nascimento e Anne Raquel.

Aos amigos: Allan dos Santos Polidoro, Aline Schneider Teixeira e Simone Barrionuevo, pessoas especiais, com as quais eu tive o privilégio de conviver e aprender, durante longos anos nos laboratórios. Ao querido amigo Daniel Cunha,

pelo auxílio na etapa final deste e de outros trabalhos, e as minhas grandes amigas Jéssica Simanke e Luciane Mondin. A amiga Laiza Caniellas Krause, por todo o apoio (e diversão) e a Alessandra Ide, por toda a sua generosidade.

À minha família: minha mãe Julia, meu pai Rubens, minha irmã Neila, que me ensinou a ler e a escrever, tenho com ela uma dívida eterna; meus irmãos Alex e Gélon e sobrinhos (Ívina, Lucas e Vithor), à memória dos meus avós, especialmente minha avó Marina – nossos laços são eternos.

À Capes, fundação mantida pelo povo brasileiro, pela concessão da bolsa de pesquisa durante o período de doutorado.

SUMÁRIO

Nr.	Títulos	Fls.
	RESUMO.....	XV
	ABSTRACT.....	XVI
1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Objetivos.....	5
1.1.1.	Objetivo Geral.....	5
1.1.2.	Objetivos específicos.....	5
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	6
2.1.	A prospecção de compostos de alto valor agregado em resíduos agroindustriais.....	7
2.2.	A produção de café e a dinâmica da geração de resíduos.....	9
2.3.	<i>Silverskin</i> : caracterização química, atividades biológicas e aplicações.....	12
2.3.1.	Caracterização química da <i>silverskin</i>	12
2.3.1.1.	Ácidos clorogênicos: os principais polifenóis presentes na <i>silverskin</i>	13
2.3.1.2.	Cafeína: a principal metilxantina presente na <i>silverskin</i>	16
2.3.2.	Atividade antioxidante versus toxicidade associadas à <i>silverskin</i>	18
2.3.3.	Aplicações dos extratos de <i>silverskin</i>	22
2.4.	Metodologias para a avaliação do potencial antioxidante.....	23
2.4.1.	Método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil).....	24
2.4.2.	Método FRAP (Poder Antioxidante Redutor do Ferro).....	25
2.5.	Avaliação da toxicidade aguda pelo método da <i>Artemia salina</i>	26
2.6.	Técnicas de extração de compostos bioativos.....	27

2.6.1.	Extração assistida por ultrassom.....	30
2.7.	Delineamento e análise de experimentos.....	33
2.7.1.	Planejamento fatorial completo.....	35
2.7.2.	Metodologia de superfície de resposta.....	36
2.7.3.	Experimentos multiresposta: função Desejabilidade.....	37
2.8.	Métodos de análise de compostos bioativos.....	38
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1.	Etapas experimentais.....	42
3.2.	Reagentes, solventes e equipamentos.....	43
3.3.	Matéria-prima.....	44
3.4.	Análises cromatográficas.....	44
3.4.1.	Validação da metodologia analítica.....	45
3.5.	Caracterização do estudo, delineamento experimental e análise estatística dos dados.....	46
3.5.1.	Ensaio de triagem das variáveis significativas.....	47
3.5.2.	Otimização das condições da UAE utilizando a metodologia de superfície de resposta.....	48
3.5.2.1.	Ajuste e testes do modelo de regressão.....	50
3.5.2.2.	Validação do modelo de regressão ajustado.....	50
3.6.	Obtenção dos extratos de <i>silverskin</i> por UAE na condição otimizada.....	50
3.7.	Obtenção dos extratos de <i>silverskin</i> por metodologia convencional de extração.....	51
3.8.	Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de <i>silverskin</i>	51
3.8.1.	Método do sequestro do radical DPPH.....	52
3.8.2.	Método FRAP.....	53
3.9.	Avaliação da toxicidade aguda do extrato de <i>silverskin</i> frente à <i>Artemia salina</i> Leach.....	54

4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1.	Validação da metodologia analítica por HPLC-DAD para a quantificação dos compostos.....	57
4.2.	Otimização dos parâmetros da UAE para a extração do ácido 5-cafeoilquínico e da cafeína.....	59
4.2.1.	Ensaio de triagem das variáveis significativas.....	59
4.2.2.	Otimização dos parâmetros de extração utilizando a metodologia de superfície de resposta.....	61
4.2.3.	Otimização de múltiplas variáveis resposta.....	70
4.3.	Comparação entre os métodos de extração dos compostos alvo: UAE e extração convencional.....	74
4.4.	Caracterização do extrato utilizando LC/MS ⁿ	74
4.4.1.	Identificação dos isômeros do ácido cafeoilquínico.....	77
4.4.2.	Identificação dos isômeros do ácido feruloilquínico.....	77
4.4.3.	Identificação dos isômeros do ácido dicafeoilquínico.....	78
4.4.4.	Identificação dos isômeros do ácido cafeoilferuloilquínico.....	80
4.5.	Quantificação das metilxantinas, ácido cafeico e derivados clorogênicos no extrato utilizando HPLC-DAD.....	82
4.6.	Capacidade antioxidante do extrato.....	85
4.6.1.	Método DPPH.....	85
4.6.2.	Método FRAP.....	88
4.7.	Toxicidade aguda do extrato frente à <i>Artemia salina</i> Leach.....	90
5.	CONCLUSÃO.....	92
6.	SUJESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	95
7.	PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	97
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
9.	APÊNDICES.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CGAs	ácidos clorogênicos
CQAs	ácidos cafeoilquínicos
FQAs	ácidos feruloilquínicos
3-CQA	ácido 3-cafeoilquínico
4-CQA	ácido 4-cafeoilquínico
5-CQA	ácido 5-cafeoilquínico
3-FQA	ácido 3-feruloilquínico
4-FQA	ácido 4-feruloilquínico
5-FQA	ácido 5-feruloilquínico
diCQAs	ácidos dicafeoilquínicos
diFQAs	ácido diferuloilquínico
CFQAs	ácidos cafeoilferuloilquínico
3,4-diCQA	ácido 3,4-dicafeoilquínico
3,5-diCQA	ácido 3,5-dicafeoilquínico
4,5-diCQA	ácido 4,5-dicafeoilquínico
3C,4FQA	ácido 3-cafeoil-4-feruloilquínico
4C,5FQA	ácido 4-cafeoil-5-feruloilquínico
CAF	Cafeína
CoQAs	ácidos <i>p</i> -cumaroilquínicos
BHT	hidroxitolueno butilado, do inglês " <i>Butylated Hydroxytoluene</i> "
BHA	hidroxianisol butilado, do inglês " <i>Buthylated hydroxyanisole</i> "
·OH	radical hidroxila
·OCH₃	radical metoxila
AAET	atividade antioxidante equivalente ao Trolox
AAEAA	atividade antioxidante equivalente ao ácido ascórbico
AAEAC	atividade antioxidante equivalente ao 5-CQA
AAESF	atividade antioxidante equivalente ao sulfato ferroso
ABTS	ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico
amb.	Ambiente
ANOVA	análise de variância
APCI	Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês " <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> "
CCD	Delineamento Composto Central, do inglês " <i>Central Composite Design</i> "
CCDR	Delineamento Composto Central Rotativo, do inglês " <i>Central Composite Rotatable Design</i> "
CE	Conformidade Europeia, do francês <i>Conformité Européene</i>
CUPRAC	poder antioxidante de redução do cobre, do inglês " <i>Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity</i> "
DAD	detector de arranjo de diodos, do inglês " <i>Diode Array Detector</i> "

DOE	Delineamento de experimentos, do inglês " <i>Design of Experiments</i> "
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
EC₅₀	concentração eficiente
ESL	extração sólido-líquido
ESI	ionização por Eletronebulização, do inglês " <i>Eletrospray Ionization</i> "
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês " <i>Food and Agricultural Organisation</i> "
FRAP	poder antioxidante redutor férrico, do inglês " <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> "
DMPD	N,N-dimetil-p-fenilenediamina, do inglês " <i>N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine</i> "
GC/MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês " <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i> "
g.l.	graus de liberdade
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês " <i>High-performance Liquid Chromatography</i> "
IT	Analisador aprisionador de íons, do inglês " <i>Ion Trap</i> "
kHz	Quilohertz
L.	Lineu
LC₅₀	concentração letal média
LOD	limite de detecção
LOQ	limite de quantificação
MAE	extração assistida por micro-ondas, do inglês " <i>Microwave-assisted Extraction</i> "
M	Molar
mM	Milimolar
MHz	mega-hertz
[M+H]⁺	íon pseudo-molecular no modo positivo
[M-H]⁻	íon pseudo-molecular no modo negativo
MQ	média quadrática da regressão
MS	Espectrometria de Massas, do inglês " <i>Mass Spectrometry</i> "
MS¹	primeiro estágio da ionização
MS²	segundo estágio da ionização
MS³	terceiro estágio da ionização
MSⁿ	Espectrometria de Massas, onde n indica o número de estágios, do inglês " <i>Mass Spectrometry</i> "
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
m/z	razão massa/carga
OTA	ocratoxina A
ORAC	Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio, do inglês " <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> "
PTFE	politetrafluoretileno-teflon
PLE	extração por líquido pressurizado, do inglês " <i>Pressurized Liquid Extraction</i> "
p_{Ka}	logaritmo do inverso da constante de acidez k _a
ppm	parte por milhão

QqQ	analisador de massas Triplo Quadrupolo
Q-TOF	analisador de massas Quadrupolo por tempo de voo
R•	radical alquil
ROO•	radical peroxil
ROOH	substrato oxidado
rpm	rotações por minuto
r²	coeficiente de determinação
RSM	metodologia de Superfície de Resposta, do inglês " <i>Response Surface Methodology</i> "
sp.	Espécie
ssp.	sub-espécie
spp.	Espécies
SQ	soma quadrática da regressão
TRAP	potencial antioxidante reativo total, do inglês <i>total "Reactive Antioxidant Potential"</i>
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
TOF	tempo de voo, do inglês " <i>Time-of-Flight</i> "
UAE	extração assistida por ultrassom, do inglês " <i>Ultrasound-Assisted Extraction</i> "
UV	ultra violeta
v/v	volume/volume
Vis	Visível
W	Watt
X-H	composto antioxidante
X•	espécie radicalar
λ	comprimento de onda

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo indicando as estruturas do fruto do cafeeiro. Adaptado de Narita *et al.*¹

Figura 2: Principais etapas da produção do café e os resíduos gerados.

Figura 3: Estruturas químicas do ácido quínico e derivados do ácido trans-cinâmico.

Figura 4: Estrutura química de derivados clorogênicos presentes nos grãos de café.

Figura 5: Estruturas químicas das principais metilxantinas.

Figura 6: Reações do processo de auto-oxidação. Adaptado de Amorati *et al.*²

Figura 7: Reação entre o DPPH[•] e um composto antioxidante X-H.

Figura 8: Reação entre o complexo TPTZ e um composto antioxidante.

Figura 9: Fluxograma das etapas experimentais realizadas durante o estudo de obtenção e caracterização do extrato de *silverskin*.

Figura 10: Cromatograma obtido por HPLC-DAD, da solução dos padrões analíticos: teobromina, teofilina, 5-CQA, ácido cafeico e cafeína. **A:** $\lambda = 272$ nm e **B:** $\lambda = 325$ nm. *Condições cromatográficas descritas na seção 3.4 da Parte Experimental.*

Figura 11: Gráfico dos valores experimentais (y_1) versus preditos pelo modelo quadrático ajustado (\hat{y}_1) para o 5-CQA.

Figura 12: Superfície de resposta do modelo quadrático ajustado mostrando os efeitos do % de etanol no solvente extrator (x_1) e da temperatura de extração (x_2) sobre o rendimento de extração do 5-CQA (y_1).

Figura 13: Gráfico dos valores experimentais (y_2) versus preditos pelo modelo quadrático ajustado (\hat{y}_2) para a CAF.

Figura 14: Superfície de resposta do modelo quadrático ajustado mostrando os efeitos do % de etanol no solvente extrator (x_1) e da temperatura de extração (x_2) sobre o rendimento de extração da CAF (y_2).

Figura 15: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (processados em 325 e 272 nm) do extrato hidroetanólico de *silverskin*. *Condições cromatográficas descritas na seção 3.4 da Parte Experimental.* A identificação dos picos está apresentada na **Tabela XVI**.

Figura 16: Espectro de massas do composto tentativamente identificado como **3-CQA**. Em **A1:** íon desprotonado m/z 353 e **A2:** seus fragmentos característicos.

Figura 17: Espectros de massas dos compostos tentativamente identificados como isômeros do **FQA**. Em **A1:** íon desprotonado de m/z 367 e **A2:** seus fragmentos

característicos; composto identificado como **3-FQA**. Em **B1**: íon desprotonado de m/z 367 e **B2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **4-FQA**. Em **C1**: íon desprotonado de m/z 367 e **C2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **5-FQA**.

Figura 18: Espectros de massas dos compostos tentativamente identificados como isômeros do **diCQA**. Em **A1**: íon desprotonado de m/z 515 e **A2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **3,4-diCQA**. Em **B1**: íon desprotonado de m/z 515 e **B2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **3,5-diCQA**. Em **C1**: íon desprotonado de m/z 515 e **C2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **4,5-diCQA**.

Figura 19: Espectros de massas dos compostos tentativamente identificados como isômeros do **CFQA**. Em **A1**: íon desprotonado de m/z 529 e **A2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **3C,4FQA**. Em **B1**: íon desprotonado de m/z 529 e **B2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **4C,5FQA**.

Figura 20: (A) Cromatogramas do padrão de CAF: em vermelho, solução do padrão sem adição de DPPH, em azul, após a reação com o radical. Ambos processados em 272 nm. (B) Cromatogramas do padrão de 5-CQA: em vermelho, solução do padrão sem adição de DPPH, em azul, após a reação com o radical. Ambos processados em 325 nm.

Figura 21: (A) Cromatogramas do extrato hidroetanólico de *silverskin*: em vermelho, sem adição do DPPH, em azul, após a reação com o radical. Ambos processados em 272 nm. (B) Cromatogramas do extrato hidroetanólico de *silverskin*: em vermelho, sem adição de DPPH, em azul, após a reação com o radical. Ambos processados em 325 nm.

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Metodologias empregadas e resultados obtidos nos estudos acerca da capacidade antioxidante dos extratos de *silverskin*.

Tabela II: Metodologias de extração aplicadas à *silverskin*.

Tabela III: Exemplos de aplicação da UAE na extração de cafeína e ácidos clorogênicos.

Tabela IV: Variáveis e níveis decodificados para o planejamento fatorial completo (2^4) com ponto central.

Tabela V: Ensaios para o planejamento fatorial completo (2^4) com ponto central.

Tabela VI: Variáveis e níveis decodificados para o planejamento delineamento composto central rotativo.

Tabela VII: Ensaios para o planejamento delineamento composto central rotativo.

Tabela VIII: Resultados dos ensaios de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.

Tabela IX: Resultados do planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central.

Tabela X: Resultados da aplicação do teste *t* aos dados do planejamento fatorial.

Tabela XI: Resultados do planejamento delineamento composto central rotativo.

Tabela XII: Resultados da análise do modelo quadrático para o 5-CQA.

Tabela XIII: Análise de variância para o modelo quadrático ajustado.

Tabela XIV: Resultados da análise do modelo quadrático para CAF.

Tabela XV: Análise de variância para o modelo quadrático ajustado.

Tabela XVI: Compostos identificados positivamente e tentativamente no extrato hidroetanólico de *silverskin* obtido por UAE.

Tabela XVII: Compostos quantificados no extrato hidroetanólico de *silverskin* obtido por UAE.

Tabela XVIII: Resultados do ensaio da capacidade antioxidante pelo método DPPH.

Tabela XIX: Resultados do ensaio da capacidade antioxidante pelo método FRAP.

Tabela XX: Resultados do ensaio da toxicidade aguda frente à *Artemia salina*.

RESUMO

O *silverskin* é um resíduo, rico em compostos antioxidantes, como o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) e a cafeína (CAF), produzido durante a torrefação dos grãos de café. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia de extração, aliando a extração assistida por ultrassom e o planejamento de experimentos, para a recuperação simultânea do 5-CQA e da CAF da *silverskin*. Os extratos gerados foram caracterizados e tiveram a capacidade antioxidante e a toxicidade investigadas. A metodologia de superfície de resposta e a função Desejabilidade foram empregadas na otimização da extração. A LC-DAD/MSⁿ foi utilizada para a caracterização dos extratos, os métodos de sequestro do radical DPPH e de redução do ferro (FRAP), para avaliar a capacidade antioxidante; enquanto o ensaio da *Artemia salina* foi usado para avaliar a toxicidade. As condições ótimas de extração foram: 45 % de etanol em água como solvente de extração, razão amostra-solvente 1/20, extração por 7 min a 59 °C, com rendimentos de 5-ACQ e CAF de respectivamente 2,00 e 6,26 mg g⁻¹. No total, 9 derivados clorogênicos foram tentativamente identificados. Os teores de teofilina, ácido cafeico e derivados clorogênicos foram respectivamente: 0,53, 0,06 e 4,40 mg g⁻¹. O extrato demonstrou considerável capacidade antioxidante, com concentração eficiente de 46,87 mg L⁻¹ e capacidade redutora de ferro de 152,71 µM de FeSO₄ g⁻¹, além de alta toxicidade. O método desenvolvido obteve rendimento similar ao da extração sólido-líquido para o 5-ACQ.

Palavras-chave: Química Analítica; Ácido Clorogênico; Cafeína, Extração Assistida por Ultrassom; Planejamento de Experimentos.

ABSTRACT

Silverskin is a waste generated during the coffee beans roasting. This residue has been showing antioxidant compounds, mainly 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) and caffeine (CAF). The aim of this study was used the design of experiments and ultrasound-assisted extraction to develop an extraction method for the efficient recovery of 5-CQA and CAF from *silverskin*, simultaneously. In addition, the optimized extract was characterized, and its antioxidant capacity and acute toxicity were investigated. The response surface methodology and Desirability function were employed to optimize the extraction. The chemical characterization was carry out by LC-DAD/ESI-MSⁿ. Antioxidant capacity was evaluated by DPPH (2, 2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) and FRAP (ferric reducing antioxidant power) methods and the acute toxicity by *Artemia salina* assay. The optimal extraction conditions were 45.0 % ethanol in water, the solid-to-liquid ratio was 1:20, and extraction for 7.0 min at 59 °C. Under optimal conditions, the yield of 5-CQA and CAF were 2.00 and 6.26 mg g⁻¹, respectively. Theophylline, caffeic acid, and total chlorogenic acid concentrations were 0.53, 0.06 e 4.40 mg g⁻¹, respectively and 9 chlorogenic acids were identified in the extract. The extract showed considerable antioxidant capacity, with efficient concentration value of 46,87 mg L⁻¹ in the DPPH assay and 152,71 μM FeSO₄ g⁻¹ (FRAP) and high toxicity. The developed extraction methodology showed similar performance as solid-liquid extraction to 5-CQA yield.

Keywords: Analytical Chemistry; Chlorogenic Acid; Caffeine; Ultrasound-assisted Extraction; Design of Experiments.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Antioxidantes são substâncias que possuem a habilidade de retardar ou inibir o processo de auto-oxidação — oxidação mediada por radicais livres — tanto em produtos orgânicos (alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos), quanto em organismos vivos.² O desequilíbrio entre a produção e a eliminação dos produtos da reação de auto-oxidação pode levar a uma série de doenças como câncer, diabetes, aterosclerose, doenças cardiovasculares, neurológicas, etc.³ A auto-oxidação também é responsável pela deterioração dos produtos manufaturados, acarretando prejuízos financeiros e danos à saúde.⁴

À parte os mecanismos endógenos de proteção contra a auto-oxidação, a dieta é a principal fonte de antioxidantes dos organismos vivos.⁴ Na indústria, antioxidantes sintéticos são adicionados a praticamente todos os produtos orgânicos processados, a fim de aumentar o tempo de vida útil.⁵ Apesar dos antioxidantes sintéticos serem eficazes na inibição do processo oxidativo, vários efeitos adversos já foram associados à sua ingestão.^{6,7}

Compostos naturais com pronunciada atividade antioxidante, como os ácidos clorogênicos⁸ e a cafeína,⁹ têm despertado o interesse das indústrias de alimentos e farmacêutica, devido a duas possibilidades de aplicação: (I) como ingredientes ativos em formulações de alimentos funcionais, produtos nutracêuticos e cosméticos e (II) como conservantes em alimentos e outros produtos industrializados, uma vez que são mais atraentes comercialmente e, de forma geral, menos tóxicos que os antioxidantes sintéticos.^{7,10}

A agroindústria gera bilhões de toneladas de resíduos anualmente.¹¹ As técnicas convencionais de gerenciamento, como a disposição em aterros e a incineração, são as mais aplicadas aos resíduos agroindustriais.^{12,13} Contudo, estes resíduos apresentam potencial para a geração de produtos com valor de mercado (energia, produtos químicos, materiais, etc.).^{11,14} Dentre as estratégias de valorização dos resíduos agroindustriais, a extração de produtos químicos vem recebendo atenção, devido à abundância e baixo custo da matéria-prima e ao alto valor dos produtos obtidos.¹⁵

O café é a segunda bebida mais consumida no mundo.¹⁶ No ano de 2015, foram produzidas 8,6 milhões de toneladas de café verde.¹⁷ Os principais resíduos do processamento dos grãos de café são a *silverskin* (ou pele de prata), tegumento

que recobre as sementes, produzida durante a etapa de torrefação, e a borra, gerada durante a produção do extrato viscoso e do café instantâneo.^{18,19} Estima-se que o processo de torrefação produza 1,1 % de *silverskin*.²⁰

Em virtude do potencial como fonte de compostos bioativos,¹⁸ a *silverskin* despertou o interesse de diversos pesquisadores. Estudos demonstraram que o resíduo apresenta composição química qualitativa semelhante a dos grãos de café torrado, ou seja, rica em compostos polifenólicos, entre eles o ácido 5-cafeoilquínico, pertencente à família dos ácidos clorogênicos, e a cafeína.^{20,21,22}

Os extratos obtidos a partir da *silverskin* demonstraram pronunciada capacidade antioxidante,²³⁻²⁶ associada, principalmente, à presença dos ácidos clorogênicos. Formulações cosméticas contendo extratos de *silverskin* mantiveram a atividade antioxidante,²⁷⁻³¹ enquanto a incorporação dos extratos a sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados, promoveu a liberação de cafeína.³² O resíduo também foi avaliado como ingrediente para a produção de alimentos funcionais,^{33,34,35} devido à alta quantidade de antioxidantes e fibras dietéticas. Por outro lado, a literatura também descreve a presença de ocratoxina A, uma micotoxina patogênica, em amostras do resíduo, o que poderia inviabilizar a sua utilização.^{36,37}

A utilização de resíduos agroindustriais como fonte de compostos de alto valor agregado depende da disponibilidade, facilidade de obtenção e acesso, rendimento e economia com que os produtos finais são obtidos.³⁸ Procedimentos de extração rápidos, econômicos e ambientalmente corretos são a premissa para a utilização destes resíduos.³⁹ Apesar dos resultados promissores demonstrados pelos extratos de *silverskin*, até o momento, praticamente metodologias convencionais de extração dos compostos bioativos foram aplicados à matriz.^{20,22,25-27,37,40-42} Aliada a esta questão, verifica-se a ausência de metodologias de planejamento de experimentos aplicados à extração dos compostos de interesse.

Diversas desvantagens estão associadas aos métodos convencionais de extração, entre elas, o alto consumo de solventes orgânicos e energia, somado ao risco de degradação dos compostos bioativos pela utilização de altas temperaturas ou longos tempos de extração.⁴³ Além disso, a ausência de estudos acerca das variáveis de extração pode ocasionar variações nos teores dos compostos ao longo dos processos extrativos.⁴⁴

As técnicas avançadas de extração, como a extração assistida por ultrassom (UAE, do inglês inglês *Ultrasound-Assisted Extraction*), possibilitam processos mais seletivos, reprodutivos, controlados e seguros, o que pode vir a representar um grande avanço na prospecção e recuperação de compostos bioativos em resíduos de alimentos.⁴⁵ Devido às inúmeras vantagens, a UAE tem sido amplamente aplicada à extração de ácidos clorogênicos e cafeína de alimentos, resíduos de alimentos, plantas medicinais, etc.^{46,47,48}

Tendo em vista a pronunciada atividade antioxidante do ácido 5-cafeoilquínico e da cafeína, e suas possíveis aplicações, esta tese visa otimizar os parâmetros da UAE para a extração destes compostos do resíduo *silverskin*, a fim de obter os maiores rendimentos extrativos possíveis para ambos, simultaneamente.

1.1. Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Extrair simultaneamente o ácido 5-cafeoilquínico e a cafeína da *silverskin* por meio da técnica de extração assistida por ultrassom; caracterizar quimicamente o extrato gerado e avaliar sua capacidade antioxidante e toxicidade aguda.

1.1.2. Objetivos específicos

- Utilizar as ferramentas multivariadas: planejamento fatorial completo com ponto central e metodologia de superfície de resposta, para otimizar os parâmetros que afetam a eficiência do processo de extração assistida por ultrassom dos compostos ácido 5-cafeoilquínico e cafeína da *silverskin*;

- Comparar a eficiência de extração, em termos de ácido 5-cafeoilquínico e cafeína extraídos, das técnicas UAE e extração sólido-líquido;

- Quantificar, utilizando o método da padronização externa, os compostos: teobromina, teofilina e ácido cafeico no extrato obtido por UAE, mediante a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

- Identificar tentativamente os compostos derivados clorogênicos no extrato obtido por UAE, por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas;

- Quantificar, por equivalência ao ácido 5-cafeoilquínico, os compostos tentativamente identificados como derivados clorogênicos, no extrato obtido por UAE;

- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato obtido por UAE, por meio das metodologias do sequestro do radical DPPH e de redução do ferro (FRAP), e investigar os possíveis responsáveis pela atividade;

- Avaliar a toxicidade aguda *in vivo* do extrato obtido por UAE, por meio do ensaio da *Artemia salina* Leach.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A prospecção de compostos de alto valor agregado em resíduos agroindustriais

A atividade agrícola e o processamento dos produtos agrícolas geram bilhões de toneladas de resíduos anualmente.^{11,13} Os resíduos da cadeia de produção de alimentos podem ser divididos em: (I) resíduos da colheita ou do beneficiamento, que compreendem as partes não comestíveis das plantas (palha, talos, folhas, raízes, galhos, etc.); (II) resíduos agroindustriais ou do processamento, que são os materiais derivados do processamento pós-colheita (cascas, pó, palha, bagaço, serragem, espigas de milho, etc.) e (III) resíduos gerados após a utilização dos alimentos processados.¹¹

Parte significativa dos resíduos da produção de alimentos está associada ao desperdício e perdas ao longo do processo produtivo.¹⁴ De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação,⁴⁹ 1/3 dos alimentos produzidos (1,3 bilhões de toneladas por ano) são perdidos ou desperdiçados.¹³ Por outro lado, existem resíduos considerados inevitáveis ao processo de produção.⁵⁰ No âmbito da agroindústria, exemplos de resíduos inevitáveis são as cascas, o bagaço e as sementes geradas durante o processamento de frutas.⁴⁵

As técnicas convencionais de gerenciamento de resíduos, como a disposição em aterros e a incineração, são as mais aplicadas aos resíduos agroindustriais.^{12,13} A disposição dos resíduos em aterros pode causar problemas ambientais, como lixiviação e emissão de gás metano. Além disso, a prática apresenta alto custo econômico e limitações legais.¹² A incineração, por sua vez, é uma abordagem obsoleta e pouco eficiente para este tipo de resíduo, devido à características do mesmo, como os altos teores de água.¹¹

Em menor escala, os resíduos agroindustriais são empregados como fertilizantes e na alimentação animal. Contudo, apesar destas práticas conferirem certo grau de valorização a estes resíduos, geram produtos de baixo valor agregado.^{12,13}

Na busca pela diminuição do impacto gerado pelas práticas convencionais de manejo dos resíduos de alimentos, a diretiva 2008/98/CE da União Europeia⁵¹ introduziu novas diretrizes para a gestão desta categoria de resíduo. Segundo a

diretiva, as abordagens aplicadas devem ter como foco a coleta separada, o tratamento para garantir a máxima proteção ambiental e o desenvolvimento de técnicas para produzir materiais ambientalmente seguros a partir dos resíduos de alimentos.

A redução da geração de resíduos ao longo da cadeia de produção de alimentos foi apontada como a terceira, entre as quinze áreas, com maior oportunidade de negócios.⁵² De acordo com este prognóstico, todos os setores da cadeia de produção de alimentos, incluindo áreas como logística, processamento, conservação, energia, pesquisa, entre outros, possuem potencial para serem explorados economicamente, devido à ineficiência dos processos atuais.

A conversão de resíduos da agroindústria em recursos de alto valor agregado insere-se no contexto da diminuição da geração de resíduos.^{12,14} O potencial destes resíduos para a geração de produtos com valor de mercado (energia, produtos químicos, materiais, entre outros) deve-se, principalmente, à complexidade química da matéria-prima, considerada a mais abundante e barata fonte de compostos disponível.^{11,14}

Revisões críticas da literatura abordando a valorização dos resíduos de alimentos,^{14,45,50,53} indicam que a extração de produtos químicos pode se tornar tão importante quanto a produção de combustíveis. Segundo Tuck *et al.*¹⁵ a extração de produtos químicos dos resíduos é a opção mais rentável (1000 dólares por tonelada de biomassa). Por outro lado, a demanda de mercado para os produtos ainda é baixa, devido às vantagens dos processos tradicionais de obtenção dos mesmos. Os combustíveis são a segunda opção em termos de rentabilidade (200-400 dólares por tonelada de biomassa), porém possuem maior aplicabilidade e mercado consumidor.

Diferentes estratégias podem ser adotadas visando a recuperação de produtos químicos dos resíduos da indústria de alimentos. Dentre as principais abordagens destacam-se a recuperação direta dos compostos, por meio de processos de extração convencionais ou avançados, e a obtenção de compostos protótipos, com posterior geração de análogos estruturais.¹¹

Neste contexto, os processos de extração parecem ser uma estratégia bem sucedida, uma vez que diversos produtos foram extraídos de resíduos agroindustriais. Entre os produtos recuperados de resíduos encontram-se alcaloides,²³ antioxidantes,⁵⁴ pectinas,⁵⁵ proteínas,⁵⁶ óleos essenciais,⁵⁷ lipídeos,⁵⁸ compostos fenólicos,⁵⁹ enzimas,⁶⁰ glicerol,⁶¹ etc. Em alguns casos, os resíduos

gerados durante o processamento continham concentração mais elevada de compostos bioativos do que os alimentos produzidos.^{61,62}

O cenário atual indica que os resíduos agroindustriais possuem grande potencial para serem utilizados como matéria-prima na obtenção de compostos de alto valor.^{14,45,50,53} Contudo, será preciso garantir metodologias de extração eficientes e seguras, que garantam velocidades de processamento proporcionais ao volume de geração dos resíduos.¹⁴ Além disso, o custo operacional e o valor dos produtos alvo são os dois principais fatores que determinam se um processo de conversão de biomassa é viável ou não.³⁸

2.2. A produção de café e a dinâmica da geração de resíduos

O café é a segunda bebida mais consumida no mundo (mais de 400 bilhões de copos por ano) e também a segunda maior *commodity*, atrás somente da indústria do petróleo.¹⁶ Apenas no ano de 2015, foram produzidas cerca de 8,6 milhões de toneladas de café verde.¹⁷

O café é internacionalmente comercializado sob a forma de grãos de café verde e tem o Brasil como principal produtor mundial (2,6 milhões de toneladas produzidas em 2015) e segundo maior consumidor da bebida. Outros grandes produtores são o Vietnã (1,6 milhões de toneladas ano), a Colômbia (0,8 milhões de toneladas ano) e a Indonésia (0,7 milhões de toneladas ano).¹⁶

O cafeeiro pertencente à família *Rubiaceae*, gênero *Coffea*, e as principais espécies, sob o ponto de vista agroeconômico, são a *Coffea arabica* (café Arábica) e a *Coffea canephora* (café Robusta ou Conilon).⁶³ Os frutos do cafeeiro são colhidos cerca de 5 anos após o plantio das árvores e constituem a porção do fruto com valor comercial.⁶³ De forma simplificada, o fruto do cafeeiro compreende as seguintes estruturas:¹ epicarpo, polpa, camada de pectina, endocarpo, *silverskin* e sementes, conforme pode ser visualizado na **Figura 1**.

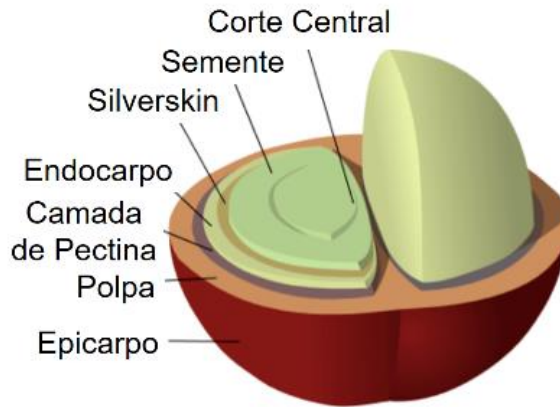


Figura 1: Esquema representativo indicando as estruturas do fruto do cafeeiro. Adaptado de Narita *et al.*¹

As etapas iniciais do beneficiamento do café (colheita, seleção, limpeza e secagem) ocorrem nas fazendas, e visam à conversão dos frutos a grãos de café verde. A secagem, etapa fundamental para a qualidade do produto, pode ser realizada mediante duas metodologias:^{19,63,64}

1. Por via seca: neste método, a secagem ocorre com a casca, polpa e mucilagem aderidas ao fruto. A técnica origina o café natural, de terreiro ou coco; é tecnologicamente simples e a mais empregada no Brasil.

2. Por via úmida: neste método, o processo de secagem ocorre após a remoção da polpa e da casca dos frutos frescos.

O beneficiamento dos grãos ocorre após a secagem e compreende as etapas de limpeza, remoção mecânica das cascas (no caso do café natural) e classificação. Na sequência, os grãos são direcionados à indústria nacional de torrefação ou exportados.^{18,19}

O processo de torrefação dos grãos ocorre na indústria e constitui outro passo chave para a qualidade do produto.⁶³ As variáveis temperatura e tempo são aplicadas aos grãos e levam a mudanças na composição química e, conseqüentemente, nas atividades biológicas associadas ao produto. A principal reação que ocorre durante o processo é a transformação de parte dos compostos polifenólicos, presentes nos grãos, em uma mistura complexa de produtos de reação de *Maillard*.¹⁸ Após a torrefação, aproximadamente metade da produção de grãos é embalada (moídos ou não) e direcionada ao mercado consumidor.

De maneira geral, metade da produção de café é utilizada para a obtenção do extrato viscoso e do café solúvel.¹⁹ O processo de produção consiste em submeter

os grãos torrados e moídos à extração com água aquecida e pressurizada, a fim de extrair os sólidos solúveis e compostos voláteis. O extrato obtido é concentrado, originando o extrato viscoso, utilizado nas indústrias de bebidas, balas, confeitos, sorvetes, ou, prosseguindo o processo de concentração, os grânulos ou pó de café instantâneo.¹⁸

A cadeia de produção do café está intimamente associada à geração de resíduos.^{1,18,19} Nas etapas do beneficiamento, que ocorrem nos países produtores, os principais resíduos são a polpa e a casca, que correspondem a 50 % em massa dos frutos.⁶³ Em contrapartida, as etapas do processamento industrial ocorrem nos países produtores e nos grandes centros compradores dos grãos verdes (EUA, Alemanha, Bélgica, Itália). Nestas etapas, os principais resíduos gerados são a *silverskin* ou película prateada (nomes usuais do tegumento que recobre as sementes), gerada durante a etapa de torra, e a borra, porção de sólidos insolúveis em água, gerada durante a produção do extrato viscoso e do café instantâneo.^{18,19,65}

A borra é o resíduo gerado em maior quantidade na indústria de processamento do café.¹⁹ Estima-se que a produção de café solúvel a partir dos grãos verdes gere 65 % de borra. Com relação à *silverskin*, sua produção é inerente ao processo de torrefação, ou seja, o processo de secagem dos grãos não está relacionado à geração do resíduo.^{18,19} Estima-se que o processo de torra dos grãos verdes produza 1,1 % de *silverskin*.²⁰ A **Figura 2** apresenta um fluxograma das principais etapas da produção do café, indicando os resíduos gerados.

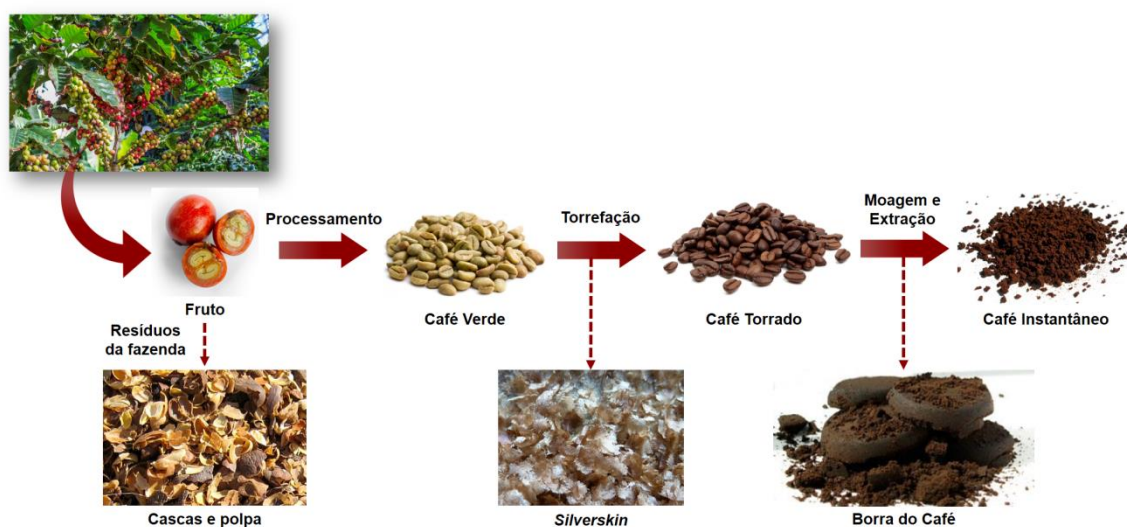


Figura 2: Principais etapas da produção do café e os resíduos gerados.

A maior parte dos resíduos gerados durante a produção do café são incinerados ou descartados no meio ambiente, sem tratamento prévio.¹⁸ As unidades de beneficiamento dos grãos, localizadas nas fazendas ou arredores, não asseguram um pré-tratamento adequado a polpa e a casca geradas durante o processo.¹⁹ Apenas uma parcela destes resíduos é empregado como fertilizantes para o solo, na alimentação de animais ou na compostagem.⁶⁶

No que diz respeito aos resíduos industriais, parte da *silverskin* também é utilizada como fertilizante ou ração.^{18,19} Ao passo que a borra, por apresentar alto poder calorífico, é utilizada como combustível em caldeiras na própria indústria geradora.⁶⁷

A utilização dos resíduos da produção de café como fertilizante ou na alimentação animal, cobre apenas uma parcela do grande volume gerado.^{18,66} Além disso, os principais resíduos (polpa, casca, borra e *silverskin*) são ricos em polifenóis e taninos, compostos que, em determinadas condições, apresentam efeito tóxico para os animais e o solo.¹⁹

2.3. *Silverskin*: caracterização química, atividades biológicas e aplicações

A adoção de novas exigências legais para o manejo e descarte de resíduos industriais, impulsionou as pesquisas acerca da caracterização e possibilidade de reutilização dos resíduos das indústrias de alimentos.¹⁴ Com os resíduos da produção de café não foi diferente. A borra, por ser gerada em maior quantidade, tem sido a mais estudada.⁶⁸ Contudo, observa-se pelo número crescente de publicações, que a atenção sobre a *silverskin* aumentou nos últimos anos.

A *silverskin* tem sido objeto de diversos estudos, seja sob a ótica da caracterização da sua composição química,^{21,23} extração de compostos bioativos,³ avaliação das atividades biológicas dos extratos²⁵ ou produção de bio-óleo.⁷⁰ O resíduo também foi avaliado como ingrediente para a produção de alimentos funcionais^{34,35} e cosméticos.²⁷⁻³²

2.3.1 Caracterização química da *silverskin*

Uma vez que a *silverskin* está em contato direto com o grão do café, presume-se que possa conter, pelo menos em parte, os compostos polifenólicos e

alcaloides presentes nos grãos.⁴¹ Em consequência disso, o resíduo é considerado uma fonte potencial de compostos bioativos.

As metilxantinas e os ácidos clorogênicos (CGAs) são os principais metabólitos do café, devido às atividades biológicas que apresentam.⁶³ Consequentemente, os estudos acerca da caracterização química da *silverskin* avaliaram a presença e a concentração destes compostos no resíduo.

Diversos autores utilizaram a técnica de espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-VIS) para identificar e quantificar os compostos fenólicos e flavonóides totais nos extratos de *silverskin*.^{25-27,41} A abordagem permitiu confirmar a presença destas classes de compostos, em quantidades significativas, fato que foi associado à pronunciada atividade antioxidante apresentada pelos extratos.

A caracterização mais detalhada dos extratos de *silverskin*, por meio das técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) ou simplesmente Cromatografia Líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) com Detector de Arranjo de Diodos (DAD, do inglês *Diode Array Detector*) e acoplada a Espectrometria de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*), demonstrou que, de fato, a *silverskin* possui semelhanças qualitativas com os grãos de café torrados. Assim como nos grãos de café,⁶³ os CGAs, principalmente o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), e as metilxantinas, principalmente cafeína (CAF), foram os compostos identificados como majoritários nos extratos de *silverskin*.^{20-24,40,42}

2.3.1.1. Ácidos clorogênicos: os principais polifenóis presentes na *silverskin*

Os CGAs constituem uma família de metabólitos secundários de plantas, altamente bioativos, encontrados na natureza. Os compostos pertencentes a esta classe, são classificados como ácidos fenólicos, uma subclasse dos compostos fenólicos ou polifenólicos.⁷¹

Os CGAs são formados pela reação de esterificação entre um ou mais derivados do ácido *trans*-cinâmico (ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico ou sináptico) e o ácido quínico.⁷² A **Figura 3** apresenta as estruturas químicas dos ácidos que dão origem aos CGAs.

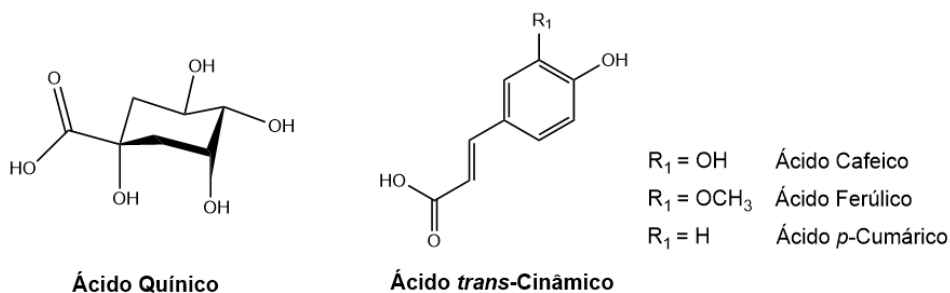


Figura 3: Estruturas químicas do ácido quínico e derivados do ácido *trans*-cinâmico.

O grupo de CGAs mais abundante na natureza é o dos isômeros do ácido cafeoilquínico (CQAs). Estes compostos são formados pela reação de esterificação entre uma molécula de ácido cafeico e uma de ácido quínico, originando os três isômeros: 3-CQA, 4-CQA e 5-CQA.⁷²

Quando a reação de esterificação se dá entre os ácidos quínico e ferúlico, ocorre a formação dos três isômeros do ácido feruloilquínico (FQAs): 3-FQA, 4-FQA e 5-FQA. Assim como, as reações entre os ácidos quínico e *p*-cumárico formam o grupo de isômeros do ácido *p*-cumaroilquínico (CoQAs).⁷²

As reações de esterificação também podem ocorrer entre duas moléculas de ácido cafeico e uma de ácido quínico, formando os isômeros do ácido dicafeoilquínicos (diCQAs): 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQAs. De forma análoga, a reação pode ocorrer entre duas moléculas de ácido ferúlico e uma de ácido quínico, formando os isômeros do ácido diferuloilquínico (diFQAs).⁷²

Os CGAs são os principais compostos fenólicos presentes no café.⁶³ Dentre eles, predominam os isômeros CQAs, especialmente o 5-CQA, e em menores quantidades, os FQAs, diCQAs e diFQAs.⁷² Na **Figura 4** estão representadas as estruturas químicas de alguns CGAs presentes no café.

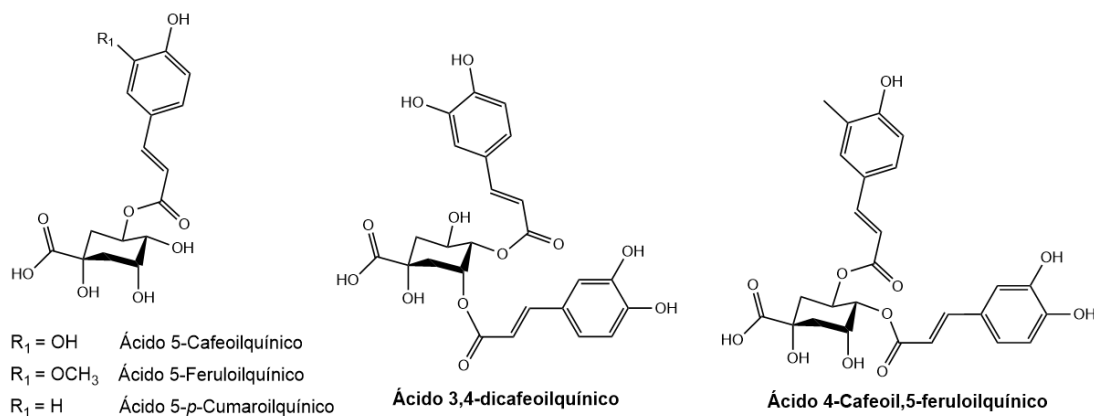


Figura 4: Estrutura química de derivados clorogênicos presentes nos grãos de café.

Os CGAs sofrem transformações químicas e diminuem drasticamente de concentração durante o processo de torrefação dos grãos, produção de café solúvel e da bebida café.⁶³ No entanto, mesmo com as perdas sofridas durante os processos, a bebida café é considerada a maior fonte de CGAs da dieta.⁷³

Os CGAs são utilizados como aditivos em bebidas, cosméticos e produtos a base de chás, como alimentos e medicamentos. As plantas *Lonicera japonica* Thunb e *Eucommia ulmoides* Oliver constituem a principal fonte comercial dos compostos.⁷⁴

Os CGAs estão associados a diversas atividades biológicas, como antioxidante,⁷⁵ antibacteriana,⁷⁶ antiviral⁷⁷ e antifúngica,⁷⁸ combinada à baixa toxicidade. Segundo estudos, os CGAs estariam relacionados à eficácia neuroprotetiva apresentada pelo café.⁷⁹

Compostos naturais com alta atividade antioxidante, como os CGAs, possuem potencial para serem utilizados como conservantes em alimentos e cosméticos.¹⁰ Embora os antioxidantes sintéticos sejam eficazes na inibição do processo oxidativo, diversos efeitos adversos têm sido associados à sua ingestão.⁷ Os antioxidantes sintéticos mais utilizados, como hidroxitolueno butilado e hidroxianisol butilado, foram relacionados a danos à saúde, como o aumento do fígado e da atividade enzimática microsomal, além de converterem algumas substâncias ingeridas a tóxicas e cancerígenas.⁶

Os CGAs foram identificados pela primeira vez nos extratos de *silverskin* por Borrelli *et al.*³⁶ Neste estudo, os extratos hidroalcoólicos foram analisados por HPLC-DAD e o 5-CQA foi identificado como o CGA majoritário. Os derivados clorogênicos foram identificados pelos espectros de absorção característicos no UV-Vis (λ de máxima absorção em 325 nm) e pela comparação dos dados cromatográficos e espectrofotométricos com os do padrão analítico do 5-CQA.

Resultados semelhantes aos mencionados anteriormente foram obtidos, utilizando a mesma abordagem analítica, para os extratos hidroalcoólico e aquoso de *silverskin*.^{23,24} Ainda utilizando HPLC-DAD, porém com um conjunto maior de padrões, foram identificados, no extrato hidroetanólico de *silverskin*, os três isômeros dos grupos CQA e diCQA.²⁰

A aplicação da técnica de LC/MS na caracterização dos extratos de *silverskin* possibilitou a identificação de uma gama maior de CGAs. Além dos compostos anteriormente descritos, foram identificados os três isômeros FQA, dois isômeros do ácido cafeoilferuloilquinico (CFQA) e um isômero CoQA no extrato hidroetanólico.²²

No entanto, devido à ausência de padrões e às semelhanças na fragmentação dos isômeros, não foi possível a distinção entre os compostos de um mesmo grupo.

Os extratos aquosos de *silverskin* (espécies Robusta e Arábica) foram analisados por LC/MS.⁴² Além dos compostos já descritos anteriormente,²² foram identificados os ácidos cafeico e ferúlico, dois isômeros do ácido dimetoxicinâmico, um isômero do ácido dimetoxicinamoilquínico, cafeoil triptofano e cumaroil triptofano.

2.3.1.2. Cafeína: a principal metilxantina presente na *silverskin*

As metilxantinas são metabolitos secundários, pertencentes à classe dos alcaloides. Estes compostos são produzidos por um número limitado de espécies botânicas, entre elas a *Camellia sinensis* L. (chá), *Coffea* sp. (café) e *Theobroma cacao* L. (cacau). As metilxantinas mais relevantes são a cafeína, teobromina e teofilina.⁸⁰ As estruturas químicas das principais metilxantinas estão representadas na **Figura 5**.

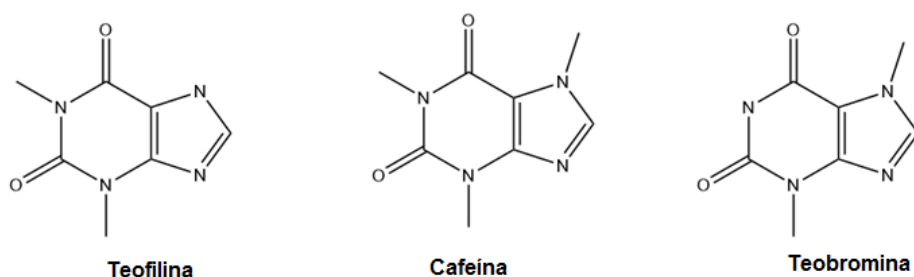


Figura 5: Estruturas químicas das principais metilxantinas.

Devido às suas propriedades estimulantes sobre os sistemas nervoso e cardíaco, a cafeína (CAF) é a metilxantina mais conhecida e estudada.⁸⁰ O composto está presente nos grãos de café verde, em concentrações variando de 0,9 a 1,3 %, na espécie Arábica e de 1,5 e 2,5 %, na Robusta. Devido à estabilidade térmica, as concentrações de CAF permanecem constantes, mesmo após o processo de torra dos grãos.⁶³

A CAF é a substância psicoativa mais consumida do mundo.⁸¹ O composto é empregado como estimulante, em alimentos e produtos farmacêuticos, e é obtido por meio de fontes naturais (plantas ricas no alcaloide) e sintéticas. Os dados da produção de CAF são escassos, e registros de 1999 relatam a produção anual de 10000 – 15000 toneladas anuais. Deste montante, 3000 – 4000 toneladas eram

provenientes de fontes naturais, obtidas por meio do processo de descafeinação do café e do chá. Apesar da falta de registros, acredita-se que a demanda pelo alcaloide tenha crescido, uma vez que somente a produção chinesa do composto sintético chegou a 8000 toneladas em 2011.⁸¹

O valor comercial da CAF natural é superior à sintética, resultado da grande demanda pelo produto, principalmente para a fabricação de bebidas. Os produtos contendo cafeína extraída de fontes naturais possuem o apelo dos chamados “produtos saudáveis”. Ademais, o composto sintético pode levar mais facilmente a estados de ansiedade e insônia.^{81,82}

Além da atividade estimulante, a CAF é associada à atividade antioxidante, anti-inflamatória e antiapoptótica.⁸³ Parte dos efeitos neuroprotetores apregoados ao café, podem estar relacionados à capacidade antioxidante desta metilxantina. Estudos têm demonstrado a eficiência da CAF em captar radicais hidroxila e metoxila, o que poderia explicar a atividade antioxidante do composto.⁸⁴

A CAF tem sido utilizada em formulações cosméticas devido as suas atividades biológicas e a habilidade de penetração na barreira cutânea.⁹ O composto é usado como ingrediente ativo em formulações anticelulite, pois previne o acúmulo excessivo de gordura nas células. Além disso, a atividade antioxidante do composto tem sido associada a sua atividade fotoprotetora.

Os teores de CAF na *silverskin* das variedades Arábica e Robusta foram determinados por meio da conversão do teor de nitrogênio total em CAF.⁸⁵ As concentrações variaram entre 0,81 e 1,37 mg g⁻¹ de resíduo e não houve correlação entre os teores do alcaloide e as espécies avaliadas.

A cromatografia líquida é a técnica mais empregada para a análise das metilxantinas em amostras de café.⁷² O monitoramento da CAF no λ de 272 nm, confere seletividade ao método, melhorando a precisão e exatidão.

A HPLC-DAD foi utilizada para avaliar a concentração de CAF nos extratos aquosos de *silverskin* (mistura de Arábica e Robusta).²³ Os valores variaram entre 4,1 e 4,4 mg g⁻¹ de resíduo. Os extratos aquosos de *silverskin* (Arábica) também foram quantificados por meio da técnica, com resultados de 19 mg g⁻¹ de resíduo.⁴⁰ Panusa *et al.*⁴² encontraram concentrações similares do alcaloide (3,7 mg g⁻¹ resíduo) nos extratos aquosos de *silverskin* das duas espécies de café. Regazzoni *et al.*²² quantificaram CAF no extrato hidroalcoólico de *silverskin* (Arábica), encontrando teores de 13,6 mg g⁻¹ de resíduo.

2.3.2. Atividade antioxidante versus toxicidade associadas à *silverskin*

A oxidação da matéria orgânica ocorre principalmente pelo processo mediado por radicais livres, denominado auto-oxidação.² A auto-oxidação ocorre de forma similar, tanto em produtos orgânicos (alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos), quanto em organismos vivos. Os produtos da auto-oxidação (radicais livres e moléculas) são chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*).^{2,3}

O processo de auto-oxidação é sempre iniciado por uma espécie radicalar X^\bullet (**Figura 6**), com habilidade para reagir com um substrato RH, normalmente por abstração de um átomo de hidrogênio, gerando o radical alquil R^\bullet .^{2,5}

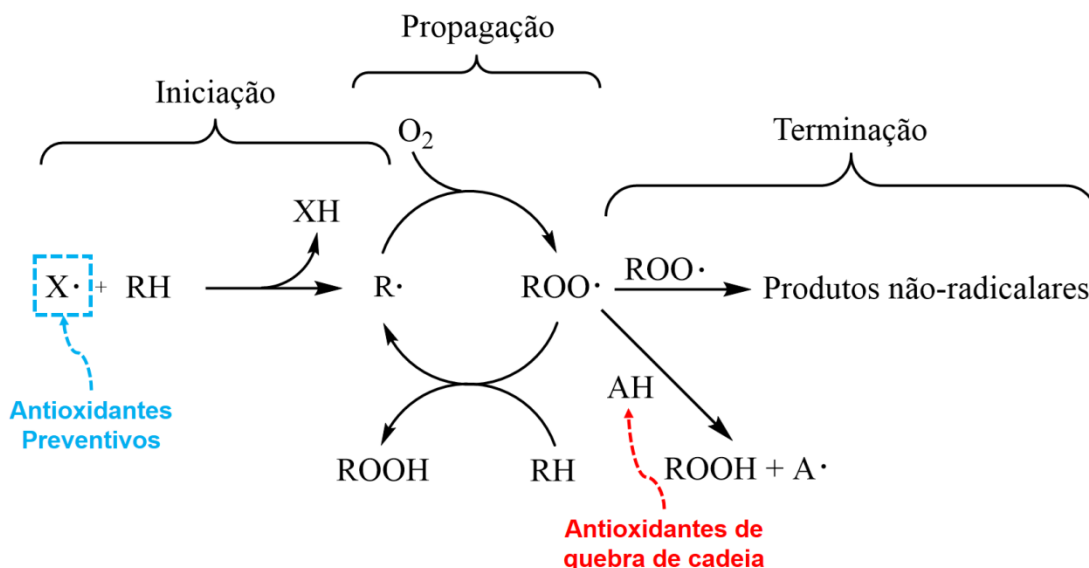


Figura 6: Reações do processo de auto-oxidação. Adaptado de Amorati *et al.*²

A espécie radicalar formada irá reagir com oxigênio, gerando o radical peróxido (ROO^\bullet). O radical peróxido atacará outra molécula de substrato, dando origem ao hidroperóxido orgânico $ROOH$ (substrato oxidado) e um novo radical alquil. Esta etapa da reação, chamada propagação, é cíclica, e ocorre até o momento em que dois radicais reagem entre si, findando o processo, na etapa de terminação.^{2,5}

As ROS são produtos normais do metabolismo celular de plantas e animais, nos quais desempenham papéis fundamentais para a sobrevivência das células.³ O desequilíbrio entre sua produção e eliminação gera o processo chamado estresse oxidativo. Nas últimas décadas, inúmeras pesquisas têm revelado o mecanismo pelo qual o estresse oxidativo contínuo pode levar à inflamação crônica, e esta, por sua

vez, a uma série de processos fisiopatológicos como o envelhecimento, o câncer, a diabetes, a aterosclerose, as doenças cardiovasculares, neurológicas e pulmonares, entre outros.^{2,3}

A forma mais efetiva de proteger as moléculas da reatividade do oxigênio é utilizar antioxidantes.⁶ Antioxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que, mesmo em pequenas quantidades, tem a habilidade de retardar ou inibir a auto-oxidação de moléculas oxidáveis. Os lipídeos, as proteínas e os carboidratos são exemplos de compostos tipicamente oxidáveis.²

Os antioxidantes diretos são compostos capazes de interromper ou prejudicar o processo de auto-oxidação.² Eles podem atuar preventivamente, como a enzima catalase, que interfere na etapa de iniciação da reação, ou “quebrando” a reação, ao competirem com os reagentes do estágio de propagação, como por exemplo, o radical peroxil, de forma mais rápida que o substrato oxidável. Outro aspecto importante, é que os produtos de reação dos antioxidantes não propagam a cadeia da auto-oxidação.^{2,6}

Além dos antioxidantes diretos, existem os indiretos. Estes compostos atuam induzindo a expressão de antioxidantes endógenos, por exemplo, a expressão de enzimas antioxidantes.²

Por outro lado, os pró-oxidantes são compostos hábeis em acelerar o processo de auto-oxidação ou o dano oxidativo. Eles agem diminuindo a concentração dos agentes antioxidantes ou aumentando a geração de radicais livres. Muitas vezes, um antioxidante pode atuar como pró-oxidante, dependendo das condições do meio reacional.^{2,5}

Os compostos fenólicos são os antioxidantes naturais diretos mais importantes e efetivos.² Devido a sua estrutura química, cada molécula destes compostos tem a capacidade de sequestrar duas moléculas do radical peroxil. Algumas classes de compostos fenólicos podem atuar, simultaneamente, pelos três mecanismos antioxidantes citados anteriormente, dependendo das condições do sistema reacional.⁸⁶

A atividade antioxidante foi avaliada em praticamente todos os estudos relacionados à *silverskin*. A **Tabela I** apresenta os resultados destes trabalhos, assim como, as metodologias utilizadas para a avaliação.

Tabela I: Metodologias empregadas e resultados obtidos nos estudos acerca da capacidade antioxidante dos extratos de *silverskin*.

Tipo de extrato	Metodologias e valores	Referências
Metanólico (ABTS) e aquoso (DMPA)	ABTS: 175000 µmol da AAET; DMPD: 200000 µmol da AAEEA *	36
	ABTS:100000 - 400000 µmol da AAET; DMPA: 50000 - 750000 µmol da AAEEA *	85
Etanólico	DPPH: 386 µmol da AAET; FRAP: 216 µmol da AAESF *	27
Aquoso	DPPH: inibiu 65 % da absorvância do DPPH; FRAP: 0.03 mmol da AAESF *	41
	DPPH: 379 µmol da AAET; ORAC: 2629 µmol da AAET (por grama de extrato seco)	23
	FRAP: 139 mmol da AAESF (por kg de <i>silverskin</i>)	21
	ABTS: 319 µmol da AAEEA *	40
	Arábica: ABTS: 9 mg da AAET; DPPH: 7mg da AAET; FRAP: 10 mg da AAET *	42
	Robusta: ABTS: 16 mg da AAET; DPPH: 9 mg da AAET; FRAP: 15 mg da AAET *	
Hidroalcoólico	DPPH: 60 % da atividade do HAB (500 ppm extrato)	24
	DPPH: 18,24 µmol da AAET; FRAP: 0.83 mmol da AAESF *	25
	DPPH: 326 mg da AAET; FRAP: 1791 mg da AAESF (por litro de extrato)	26
	ABTS: 598 µmol da AAET; FRAP: 654 µmol da AAET *	20
	DPPH: EC ₅₀ =11 µg.mL ⁻¹ ; ORAC: 3 µg.mL ⁻¹ da AAET (extrato bruto)	22

* por grama de *silverskin*; ABTS: 2,20-azino-bis (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico); AAET: atividade antioxidante equivalente ao trolox; AAEEA: atividade antioxidante equivalente ao ácido ascórbico; AAEEA: atividade antioxidante equivalente ao 5-CQA; AAESF: atividade antioxidante equivalente ao sulfato ferroso; HAB: hidroxianisol butilado; DMPD: N,N-dimetil-*p*-fenilenodiamino; DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ORAC: capacidade de absorção de radicais de oxigênio e FRAP: poder antioxidante redutor do ferro.

Diversos autores^{20,25,27,41,42,85} atribuíram a atividade antioxidante observada nos extratos de *silverskin* aos compostos polifenólicos totais presentes nas amostras. Borrelli *et al.*³⁶ salientaram a possível presença de melanoidinas, uma classe de compostos fenólicos com pronunciada atividade antioxidante, como um dos possíveis responsáveis pela atividade.

Murthy *et al.*²⁴ atribuíram a atividade antioxidante dos extratos especificamente aos derivados clorogênicos. Enquanto a semelhança entre os valores da atividade antioxidante do extrato de *silverskin* e do padrão de 5-CQA, levou alguns autores^{22,40} a conclusão que este composto era o principal responsável pela atividade do extrato.

Contudo, Narita *et al.*²³ desenvolveram um estudo minucioso visando a otimização da extração de compostos com alta atividade antioxidante da *silverskin*. Surpreendentemente, o extrato com maior atividade antioxidante não continha o 5-CQA, mas altos teores de CAF. Os autores atribuíram a maior atividade antioxidante do extrato à possível presença de proteínas e peptídeos.

Os extratos aquosos de *silverskin* demonstraram propriedade antienvhecimento frente à células humanas.⁴⁰ No estudo, foi utilizado um modelo de geração de estresse oxidativo induzido por agentes físico (radiação) e químico (hidroperóxido de terc-butila) sob as células. De acordo com os autores, a atividade antienvhecimento está intimamente associada à atividade antioxidante dos compostos fenólicos presentes no extrato.

Além da atividade antioxidante, os extratos de *silverskin* apresentaram atividade antimicrobiana.²⁷ A atividade estaria relacionada à presença dos polifenóis na amostra. Segundo os autores, a ação antimicrobiana associada à atividade antioxidante é vantajosa, quando se trata de compostos que serão incorporados a preparações cosméticas, uma vez que tais compostos podem atuar tanto como antioxidantes, quanto preservar a formulação. Contudo, estudos conduzidos por Jimenez-Zamora *et al.*²⁰ não confirmaram a atividade antimicrobiana dos extratos relatada anteriormente.

Se por um lado, diversos estudos têm demonstrado o potencial da *silverskin* como fonte de compostos bioativos, por outro, a possível contaminação do resíduo por micotoxinas tem despertado a atenção de pesquisadores. Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos e podem contaminar diversos produtos agrícolas.⁸⁷ O consumo de alimentos contaminados por estes compostos pode causar sérios problemas à saúde humana e animal. Determinadas micotoxinas têm afinidade por órgãos ou tecido, sendo o fígado, os rins e o sistema nervoso os mais atingidos.⁸⁸ Estima-se que 25 % da produção agrícola mundial possa estar contaminada por micotoxinas.⁸⁹

A ocratoxina A (OTA) é a principal micotoxina encontrada nos grãos de café.⁹⁰ A OTA é classificada pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer como possivelmente carcinogênica para seres humanos (grupo B2).⁹¹ Esta micotoxina é a única monitorada nos produtos à base de café na União Europeia, com teores máximos estabelecidos para os grãos de café torrados e café solúvel de respectivamente 5 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$.⁹²

A ocratoxina A foi identificada em extratos de *silverskin*, em níveis abaixo do limite de quantificação da metodologia desenvolvida no estudo (4 $\mu\text{g kg}^{-1}$).³⁶ No entanto, Toschi *et al.*³⁷ verificaram, em amostras de *silverskin*, concentrações de OTA 3 vezes superiores aos limites permitidos. Contudo, os extratos de *silverskin* não apresentaram efeito citotóxico *in vitro* em ensaios frente à células pancreáticas,^{93,94} epiteliais^{27,40} e fibroblastos.³⁰

2.3.3. Aplicações dos extratos de *silverskin*

Os estudos voltados às aplicações da *silverskin* exploraram, principalmente, a atividade antioxidante dos extratos. Em uma sequência de trabalhos publicados em 2015 e 2016²⁷⁻³¹ Rodrigues *et al.* desenvolveram formulações cosméticas utilizando extratos hidroetanólicos de *silverskin*. As formulações apresentaram atividade antioxidante comparável à dos extratos, além de atividade antimicrobiana e estabilidade física e microbiológica.

O mesmo grupo de pesquisa publicou em 2016³² os resultados referentes aos estudos com formulações de ação anticelulite contendo extrato de *silverskin*. O extrato foi incorporado a sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados e a liberação de CAF pelo sistema foi avaliada como extremamente positiva.

A *silverskin* foi utilizada como ingrediente em formulações de pães³³ e biscoitos³⁴ devido à alta quantidade de fibra dietética presente na matriz. Além da finalidade nutricional, o ingrediente teve a função de adicionar cor ao produto. Os pães produzidos à base de *silverskin* foram considerados seguros, com alta qualidade nutricional e com melhor textura e cor, quando comparados a pães sem a adição do resíduo.

Martinez-Saez *et al.*³⁵ desenvolveram uma bebida à base de *silverskin* com propriedades antioxidantes e que auxilia no controle de peso corpóreo. Estas

propriedades estariam relacionadas, principalmente, aos CGAs presentes na bebida.⁸

2.4. Metodologias para a avaliação do potencial antioxidante

Em virtude das descobertas relacionadas ao papel protetor dos antioxidantes, tanto em organismos vivos, quanto em produtos manufacturados, diversas metodologias de avaliação da capacidade antioxidante foram desenvolvidas.^{5,95} A capacidade antioxidante pode ser expressa por meio de vários parâmetros, incluindo a remoção do radical peroxil (métodos ORAC, do inglês *oxygen radical absorbance capacity* e TRAP, do inglês *total reactive antioxidant potential*), a capacidade de redução de um metal (métodos FRAP, do inglês *ferric reducing antioxidant power* e CUPRAC, do inglês *cupric ion reducing antioxidant capacity*), a capacidade de remoção de um radical orgânico (métodos ABTS – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e DPPH – peroxidação do 2,2-difenil-1-picrilidrazil), entre outros.^{2,5,95}

Os métodos químicos DPPH e FRAP são amplamente empregados na avaliação da capacidade antioxidante de substâncias, assim como, de misturas de compostos, como extratos vegetais, óleos essenciais, alimentos, entre outros.^{2,5} Eles fazem parte das metodologias indiretas de avaliação da atividade antioxidante, pois utilizam sondas que mimetizam os radicais envolvidos no processo de oxidação dos sistemas reais. Os métodos indiretos são adequados para procedimentos preliminares de avaliação da atividade, pois são considerados rápidos, práticos, pouco dispendiosos e com boa estabilidade.^{5,95}

A principal limitação dos métodos DPPH e FRAP é justamente a pretensa aproximação com os sistemas reais de auto-oxidação, pois as sondas utilizadas não possuem semelhança estrutural com os radicais envolvidos no processo.² Desta forma, os mecanismos que ocorrem nas reações (modelo e real) são diferentes e os resultados obtidos nos ensaios poderiam não prever, pelo menos com um alto grau de confiabilidade, o comportamento do antioxidante nos sistemas biológicos.

Os métodos DPPH^{96,97} e FRAP^{97,98} obtiveram ótimos desempenhos na avaliação da atividade antioxidante dos CGAs, demonstrando sensibilidade à presença e a incrementos na concentração dos compostos no meio reacional. Por outro lado, os resultados dos estudos referentes à avaliação da atividade

antioxidante da CAF pelos métodos DPPH e FRAP são controversos. Enquanto alguns estudos indicam a falta de sensibilidade dos métodos para a avaliação da atividade do composto,^{98,99} outros autores os utilizam para avaliar a atividade de amostras e atribuem os resultados positivos a presença da CAF.¹⁰⁰

2.4.1. Método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil)

O método do sequestro do radical estável DPPH[•] é o mais utilizado em avaliações preliminares acerca da atividade antioxidante de compostos isolados ou extratos vegetais.⁵ O DPPH[•] possui coloração violácea e absorção no λ de 517 nm. Na presença de um doador de hidrogênio, ou seja, um átomo de hidrogênio proveniente de um composto antioxidante (X-H), o radical se reduz a DPPH-H (**Figura 7**), com mudança da coloração para amarelo.¹⁰¹

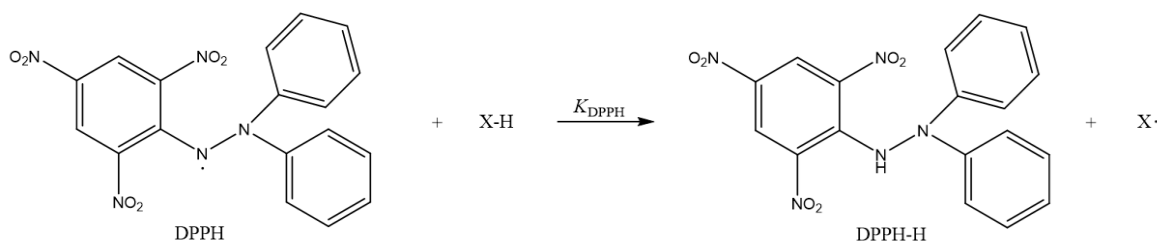


Figura 7: Reação entre o DPPH[•] e um composto antioxidante X-H.

A reação é monitorada pelo decréscimo da absorvância, que pode ser avaliada em espectrofotômetro UV-Vis¹⁰¹ ou HPLC-DAD.¹⁰² Os resultados podem ser expressos pelo parâmetro de concentração eficiente (EC₅₀, do inglês *effective concentration*),¹⁰¹ que corresponde a concentração de antioxidante capaz de provocar a perda de 50 % da absorvância do DPPH[•]. Desta forma, quanto maior a atividade antioxidante de um composto ou extrato, menor será o valor de EC₅₀.

Como parâmetro de comparação com os resultados da amostra, é comum a utilização neste ensaio de padrões de antioxidantes. Exemplos de compostos utilizados como padrão de antioxidantes são o ácido ascórbico, tocoferol, quercetina e trolox.⁵

O HPLC-DAD é uma ferramenta bastante útil na separação, identificação e quantificação de compostos em extratos vegetais.^{71,103} A combinação da HPLC-DAD ao método do radical estável DPPH[•] (DPPH-HPLC-DAD), apresenta como principal

vantagem, a possibilidade de identificar os compostos responsáveis pela atividade antioxidante em uma amostra.^{102,104,105}

A literatura apresenta algumas variações no procedimento experimental utilizado na técnica DPPH-HPLC-DAD.^{102,105} No entanto, os procedimentos apresentam em comum, a avaliação da amostra antes e após a reação com o radical. Em uma das estratégias adotadas, a solução de DPPH• é adicionada à amostra e após o tempo de reação (usualmente 30 minutos), a amostra com e sem a presença do radical são analisadas no sistema HPLC. Como resultado da reação com o radical, a área cromatográfica dos compostos que apresentarem atividade antioxidante irá decrescer. A abordagem foi aplicada com sucesso na identificação dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante de extratos vegetais¹⁰⁶ e formulações comerciais contendo polifenóis,¹⁰⁴ entre outros.

2.4.2. Método FRAP (Poder Antioxidante Redutor do Ferro)

O ensaio pelo método FRAP baseia-se na redução do íon Fe^{3+} (forma férrica), presente no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), a íon Fe^{2+} (forma ferrosa), na presença de um antioxidante (**Figura 8**).²

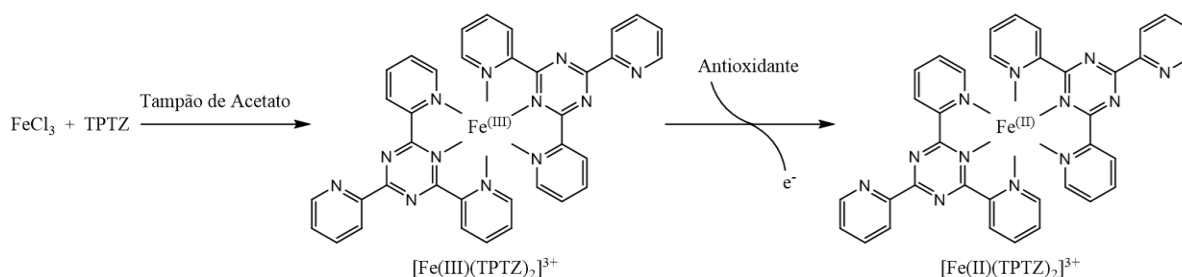


Figura 8: Reação entre o complexo TPTZ e um composto antioxidante.

O tempo usual de reação entre o TPTZ e o antioxidante é 4 minutos. O complexo formado após a redução apresenta coloração roxa, com absorção em 593 nm. Desta forma, quanto maior a absorvância medida após a reação, maior será o potencial antioxidante da amostra avaliada.¹⁰⁷

O resultado final pode ser expresso como a concentração de antioxidante capaz de reduzir 1 μmol de sulfato ferroso, usado como padrão no ensaio. Outras formas de expressar o resultado final incluem equivalentes de ácido ascórbico (número de μmoles de ácido ascórbico capaz de produzir a mesma atividade de 1 g

de amostra) ou outros compostos antioxidantes utilizados como padrão no ensaio.^{2,107}

2.5. Avaliação da toxicidade aguda pelo método da *Artemia salina*

Os ensaios de toxicidade *in vitro* e *in vivo* são elaborados com o objetivo de avaliar os efeitos tóxicos de substâncias aos sistemas biológicos.¹⁰⁸ De maneira geral, as metodologias compreendem a exposição de alvos (células, microorganismos, animais invertebrados ou vertebrados) aos compostos que se deseja avaliar a toxicidade. A avaliação da toxicidade aguda é o primeiro ensaio toxicológico realizado e consiste na exposição de curta duração do alvo (24-48 horas) ao composto teste.^{108,109}

O ensaio de toxicidade aguda frente à *Artemia salina* Leach baseia-se na habilidade de determinados compostos em causar a morte das larvas deste microcrustáceo.¹¹⁰ Os resultados são expressos utilizando-se o parâmetro de concentração letal média (LC₅₀). O método é considerado uma ferramenta útil para avaliações preliminares de toxicidade^{111,112} e tem sido empregado na detecção de micotoxinas, toxicidade de extratos de plantas, metais pesados, toxinas de cianobactérias, pesticidas, etc.¹¹³ As principais vantagens associadas ao método são o baixo custo, a disponibilidade dos materiais utilizados e a segurança e facilidade de realização.¹¹¹

O ensaio da *Artemia salina* demonstrou bom desempenho na avaliação da toxicidade de micotoxinas, tanto isoladas, quanto presentes em extratos de fungos ou alimentos. O valor da LC₅₀ da fusaproliferina, micotoxina isolada do fungo *Fusarium* spp, foi 24 µg mL⁻¹.¹¹⁴ Micotoxinas isoladas do fungo *Aspergillus* sp, obtiveram valores de LC₅₀ entre 2,59 e 205,67 µM.¹¹⁵ Enquanto as micotoxinas clamidosporol¹¹⁶ e ascochitina¹¹⁷ apresentaram respectivamente 56 e 85 µg mL⁻¹ como valores de LC₅₀. A ocratoxina A, purificada de extratos de fungos, apresentou LC₅₀ de 10 µg mL⁻¹.¹¹⁸

Zajkowski *et al.*¹¹⁹ obtiveram valores de LC₅₀ entre 3,3 e 144,5 mg mL⁻¹ para os extratos brutos dos fungos do gênero *Alternaria* spp. contaminados por micotoxinas. Os resultados de LC₅₀ não demonstraram correlação com as concentrações das micotoxinas presentes nos extratos. Contudo, os extratos livres de micotoxinas não foram tóxicos às larvas do microcrustáceo. Por outro lado, a

correlação entre os resultados de LC₅₀ e a concentração das micotoxinas citocalasina¹²⁰ e bovericina,¹²¹ presentes em extratos de fungos, foi considerada extremamente positiva.

A toxicidade dos extratos obtidos dos fungos do gênero *Fusarium* spp. também foi avaliada frente às larvas da *Artemia salina*.^{122,123,124} Os extratos que apresentaram maior toxicidade no ensaio, causaram 100 % de letalidade em concentrações de 5 µg mL⁻¹. A presença de micotoxinas das classes dos tricotecenos e eniatinas foi confirmada, via análise por GC/MS, nos extratos que apresentaram toxicidade.

Extratos de cereais contaminados com ocratoxina A se mostraram altamente tóxicos às larvas da *Artemia salina*.¹²⁵ No entanto, o estudo não apresentou resultados conclusivos, pois extratos em que a presença da micotoxina não foi verificada apresentaram toxicidade semelhante aos extratos em que a toxina foi identificada.

2.6. Técnicas de extração de compostos bioativos

A literatura descreve diversas metodologias extrativas aplicadas à recuperação de compostos bioativos de resíduos agroindustriais.^{11,39} Os métodos convencionais, como a extração sólido-líquido e líquido-líquido, são amplamente utilizados na extração de compostos bioativos, em processos biotecnológicos e farmacêuticos.³⁹

Os métodos convencionais têm sido os mais utilizados para a extração dos compostos bioativos da *silverskin*. A **Tabela II** apresenta um resumo destes estudos, enfatizando as técnicas de extração utilizadas, condições empregadas e os principais resultados obtidos.

Tabela II: Metodologias de extração aplicadas à *silverskin*

Extração	Análise	Condições de extração	Compostos	Referência		
Sólido-líquido	Espectrofotometria	35 mL g ⁻¹ ; etanol-água (6:4); 65 °C; 30 min.	fenólicos totais	25		
		20 mL g ⁻¹ ; água, etanol-água (1:1) e etanol; 40 °C; 30 min.		27		
		50 mL g ⁻¹ ; etanol-água (1:1); 40 °C; 60 min.		26		
		20 mL g ⁻¹ ; água; 120 °C; 20 min.		41		
	LC/MS	20 mL g ⁻¹ ; água; 250 rpm; 10 min.	10 mL g ⁻¹ ; etanol-água (7:3); T _{amb} ; 18 h.	CGAs: 6,9 mg *	40	
				CAF: 19 mg *		
		50 mL g ⁻¹ ; água; agitação; 60 °C; 30 min.	50 mL g ⁻¹ ; etanol-água (7:3); T _{amb} ; 18 h.	5-CQA: 11,7 mg *	22	
				CGAs: 26 mg *		
				CAF 13,6 mg *		
				Arábica:		
		HPLC-DAD	250 mL g ⁻¹ ; água + 5 g de óxido de magnésio, 90 °C; agitação; 20 min.	10 mL g ⁻¹ ; etanol-água (6:4); T _{amb} ; 30 min.	CGAs: 0,27 mg *	42
					CAF: 7,8 mg *	
					Robusta:	
					CGAs: 1,2 mg *	
	CAF: 3,8 mg *					
CAF: 7,7-10,03 mg *						
3-CQA: 1,5 mg *	20					
4-CQA: 1,0 mg *						
5-CQA: 2,2 mg *						
3,4-diCQA: 1,7 mg *						
3,5-diCQA: 1,3 mg *						
4,5-diCQA: 1,4 mg *						
Soxhlet	espectrofotometria	10 mL g ⁻¹ ; isopropanol-água (6:4); 27 °C; 5 h.	CGAs: 158 mg **	24		
n.d.		metanol-água (6:4)	CGAs: 0,011 mg **	36		
PLE		50 mL g ⁻¹ ; água; 270 °C; 10 min.	CAF: 4 mg *	23		
UAE	LC/MS	20 mL g ⁻¹ ; água acidificada 1 %; 30 min.; + agitação; 70 °C; 1h	3-CQA: 1,48 mg *	21		
		5-CQA: 1,99 mg *				
		CGAs: 5,89 mg *				
		CAF: 10 mg *				
Kjeldahl	espectrofotometria	metanol-água (6:4)	CAF: 0,81 - 1,37 mg *	85		

* por grama de *silverskin*; ** por grama de extrato; PLE: do inglês Pressurized Liquid Extraction;

Como pode ser verificado na **Tabela II**, a extração sólido-líquido foi a técnica mais aplicada à *silverskin*.^{20,22,25,26,27,37,40,41,42} Nestes estudos, foram atribuídos valores aleatórios as variáveis de extração, gerando uma grande amplitude entre os níveis usados, por exemplo: o tempo de extração variou entre 10 minutos⁴⁰ e 18 horas,²² enquanto a temperatura de extração, variou entre ambiente²² e 120 °C.⁴¹

Estudos aliando o planejamento de experimentos à extração dos compostos bioativos da *silverskin* são a minoria, e quando ocorreram, fizeram uso da abordagem univariada.^{23,25,26} Além da possível variação no teor dos compostos, a falta de metodologias claras nos procedimentos extrativos pode levar à aplicação de tempos de extração longos, temperaturas elevadas e solventes menos eficientes.

Os estudos exploratórios acerca da composição química da *silverskin* apresentam grande valor científico, principalmente, por terem demonstrado a riqueza e as potencialidades da matriz. No entanto, diversas desvantagens estão associadas aos métodos convencionais de extração, entre elas, o alto consumo de solventes orgânicos e energia, e o risco de degradação dos compostos bioativos, quer seja pela utilização de altas temperaturas, quer pelos longos tempos de extração.⁴³

As limitações das técnicas convencionais de extração levaram ao desenvolvimento de uma série de técnicas avançadas, que utilizam processos financeiramente mais atraentes e ecologicamente mais corretos.⁴⁵ Exemplos são as extrações por fluido supercrítico, assistidas por micro-ondas e por ultrassom, enzimática, entre outras. Estudos empregando técnicas não convencionais para a obtenção de compostos de interesse em resíduos agroindustriais vêm ganhando destaque, devido aos resultados satisfatórios obtidos.^{11,39}

A extração por líquido pressurizado (PLE, do inglês *Pressurized Liquid Extraction*), usando água como solvente, foi utilizada para a extração de compostos antioxidantes da *silverskin*.²³ Os parâmetros de extração foram otimizados em função da atividade antioxidante dos extratos gerados. O extrato obtido sob condições otimizadas (60 min. e temperatura de 270 °C), apresentou pronunciada atividade antioxidante, altas concentrações de CAF e ausência do 5-CQA.

A ausência do 5-CQA, principal derivado clorogênico, reconhecido por sua elevada atividade antioxidante, pode ser explicada pelas condições experimentais drásticas utilizadas no experimento, uma vez que esta família de compostos demonstra suscetibilidade térmica.⁶³ Pesquisas têm revelado a relação entre o aumento das variáveis temperatura e tempo de extração, com a degradação dos

CGAs.^{126,127} Experimentos conduzidos por Maria *et al.*¹²⁸ demonstraram que a degradação do 5-CQA inicia em torno dos 40 °C e que em 220 °C, praticamente todo o composto sofreu degradação.

Bresciani *et al.*²¹ aplicaram a UAE como técnica auxiliar na extração de compostos bioativos da *silverskin*. O procedimento de extração foi conduzido de forma sequencial: na primeira etapa, a UAE foi aplicada à matriz, durante 30 minutos, utilizando ácido fórmico a 1 % como solvente de extração. Na segunda etapa, a amostra foi submetida a agitação durante 1 hora a 70 °C.

As técnicas avançadas de extração possibilitam processos extrativos seletivos, reprodutivos, controlados e seguros, o que pode vir a representar um grande avanço na prospecção de compostos bioativos em resíduos de alimentos.⁴⁵ No entanto, a eficiência de qualquer técnica extrativa, seja convencional ou avançada, é influenciada pelas condições em que o processo é realizado. Parâmetros de extração como tipo de solvente, tempo e temperatura de extração, modo de agitação, entre outros, tem influência significativa na recuperação dos compostos bioativos e devem ser avaliados a fim de otimizar o processo.¹²⁹

2.6.1. Extração assistida por ultrassom

O ultrassom faz parte das tecnologias ditas emergentes, que foram desenvolvidas com o intuito de minimizar o processamento, maximizar a qualidade e garantir a segurança na indústria de alimentos.¹³⁰ A técnica tem se mostrado eficiente em processos de extração, emulsificação, homogeneização, desidratação, pasteurização, desgaseificação, ativação e inativação de enzimas, etc.⁴⁴ A indústria de alimentos tem aplicado processos assistidos por ultrassom desde os anos cinquenta.¹³⁰ Atualmente, as empresas utilizam a tecnologia para a extração de alimentos, aditivos farmacêuticos e produção de bebidas.¹³¹

A UAE é reconhecida como uma técnica eficiente, que reduz drasticamente os tempos de trabalho, aumenta o rendimento e a qualidade dos produtos.¹³¹ Devido às inúmeras vantagens, a técnica tem sido aplicada à extração de compostos bioativos de plantas, substituindo métodos convencionais, que levam horas ou dias para completar o procedimento extrativo.^{44,131,132}

A UAE baseia-se no emprego da energia de ondas mecânicas acústicas, transmitidas em frequência acima de 20 kHz. Estas ondas sonoras criam uma

variação de pressão no líquido, provocando a cavitação, formação espontânea de bolhas em um líquido abaixo do seu ponto de ebulição.¹³³

Uma vez que durante o processo de cavitação, há criação, aumento e implosão de cavidades de vapor e gases no líquido, ocorre um contato mais efetivo entre a matriz e o solvente de extração. Quando a pressão do sistema é positiva ocorre compressão das bolhas de vapor e, quando a pressão é negativa, ocorre expansão. Esse ciclo de compressão-expansão é responsável pela geração das cavidades. Em um líquido com partículas sólidas dispersas, os gases são adsorvidos nos poros das partículas. Quando ocorre a compressão, os gases ou vapores, no interior das cavidades, são comprimidos para o interior das partículas; já na etapa de expansão são direcionados para fora das mesmas. Devido a esses fenômenos, há aumento no tamanho das cavidades, que se direcionam para o interior do líquido e separam-se das partículas.^{129,134}

Os dispositivos de ultrassom são classificados como de alta ou baixa intensidade, em função da energia gerada. A energia é avaliada pela potência (W) ou intensidade do som ($W\ m^{-2}$). Dispositivos de alta intensidade e alta frequência (100 KHz a 1 MHz), possuem baixa potência ($<1\ W\ cm^{-2}$), enquanto de alta intensidade e baixa frequência (16-100 kHz), tem alta potência ($10-1000\ W\ cm^{-2}$).⁴⁴

Nos dispositivos de ultrassom, as ondas sonoras podem ser aplicadas à amostra de duas formas distintas: diretamente, pela utilização de sondas, ou indiretamente, por meio das paredes do recipiente que contem a amostra, nos chamados banhos de ultrassom. Os banhos de ultrassom, comumente empregados em laboratórios, transmitem ondas sonoras de alta energia e frequência (40 KHz) para um recipiente contendo líquido, normalmente água, resultando em um poder de irradiação de 1 a $5\ W\ cm^{-2}$.^{44,132}

Diversas pesquisas têm demonstrado a eficiência da UAE na extração de CAF e CGAs de alimentos e resíduos de alimentos. A **Tabela III** apresenta alguns destes estudos, dando ênfase às variáveis de extração significativas ao processo e a comparação da eficiência da técnica com outras metodologias extrativas.

Tabela III: Exemplos de aplicação da UAE na extração de cafeína e ácidos clorogênicos.

Composto	Matriz	Variável resposta	Variáveis significativas	Método Comparação	Melhor rendimento	Referência			
Cafeína	Chá	área cromatográfica	solvente, tempo, temperatura	não	não	135			
		concentração CAF	solvente, tempo	ESL, refluxo	UAE (10 %)	46			
Cafeína e Teobromina	Cacau	concentração CAF e teobromina		ESL	UAE (20 %)	136			
CGA	resíduo de semente de girassol	polifenóis totais		potência do US, razão A/S, solvente	ESL, MAE	UAE (190 %)	47		
	casca de amêndoas	concentração de CGAs			não	não	48		
	filtros de café				não	não	137		
	planta medicinal				polifenóis totais	solvente, tempo, temperatura, razão A/S	Soxhlet, refluxo	UAE=Soxhlet	138
						potência do ultrassom, solvente, tempo, temperatura	refluxo	UAE (19 %)	139
						razão A/S, solvente, tempo	não	não	142
							não	não	140
	atividade antioxidante	razão A/S, solvente, temperatura			maceração, Soxhlet	UAE	143		
	batata doce	polifenóis totais	solvente, temperatura		ESL	UAE	144		
	amora	concentração de 5-CQA	não		PLE	UAE	145		
frutas e vegetais	concentração de 5-CQA	solvente, tempo	ESL	UAE=SL	146				
alcachofra	concentração de 5-CQA	tempo	maceração, Soxhlet, refluxo	UAE	147				

ESL: extração sólido-líquido; PLE: extração por líquido pressurizado; MAE: extração assistida por micro-ondas; A/S: amostra/solvente

A UAE foi mais eficiente que as técnicas convencionais na extração de CAF em amostras de chá.⁴⁶ O processo de extração deste alcaloide sofreu influência das variáveis de extração.^{46,135} A técnica, quando aplicada em conjunto com o planejamento e análise de experimentos, obteve desempenho 20 % superior à metodologia oficial, na extração de CAF de sementes de cacau.¹³⁶

A UAE foi aplicada à extração dos CGAs de resíduos agroindustriais.^{47,48,137} A otimização das variáveis de extração possibilitou obter eficiência superior frente à extração assistida por micro-ondas e sólido-líquido, na extração dos CGAs do subproduto do processamento das sementes de girassol.⁴⁷ O processo de extração dos compostos foi influenciado pelas variáveis de extração.^{47,48,137}

A utilização da UAE visando à extração dos CGAs de frutas e plantas medicinais é bem documentada.¹³⁸⁻¹⁴³ Além da presença dos compostos bioativos, os estudos salientam a suscetibilidade dos CGAs aos principais parâmetros envolvidos no processo de extração: razão amostra-solvente, tempo de extração, natureza do solvente extrator, temperatura e potência do equipamento.

2.7. Delineamento e análise de experimentos

O planejamento de experimentos (DOE, do inglês *Design of Experiments*), representa um conjunto de ensaios estabelecidos com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência das variáveis nos resultados de um dado sistema.¹⁴⁸ Os objetivos pelos quais se deseja avaliar esta influência são diversos, entre eles, determinar quais variáveis são influentes nos resultados, atribuir valores às variáveis influentes de modo a otimizar os resultados, minimizar a variabilidade dos resultados, minimizar a influência de variáveis incontroláveis, etc.

A condução de um procedimento experimental pode ser feito por meio de metodologias univariada ou multivariada.¹⁴⁹ Na análise univariada, enquanto se avalia uma das variáveis, as demais são fixadas. Esta abordagem não possibilita a detecção dos efeitos de interações entre as variáveis e restringe os resultados a uma região limitada do espaço experimental.

O desenvolvimento tecnológico das últimas décadas instigou a aplicação da análise de dados multivariados em Química. O termo Quimiometria, muito utilizado na área, foi cunhado por Svante Wold em 1972¹⁵⁰ para designar uma nova área, que

surgia da aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas a dados exclusivamente multivariados obtidos nas diversas áreas da química.

A análise multivariada corresponde a um grande número de métodos e técnicas que utilizam, simultaneamente, todas as variáveis na interpretação teórica do conjunto de dados obtidos experimentalmente.¹⁵¹ As técnicas baseiam-se em métodos matemáticos, estatísticos, computacionais e de lógica, aplicados à resolução de problemas. Em química, as análises multivariadas são úteis para (1) planejar ou selecionar procedimentos experimentais ótimos; (2) extrair o máximo da informação química relevante pela análise dos dados; e (3) obter conhecimentos sobre os sistemas químicos estudados.¹⁵²

O planejamento de experimentos pode ser dividido nas seguintes etapas:

1. *Planejamento inicial*: etapa na qual se define o problema, o objetivo e o plano experimental que será seguido. Define-se também, os fatores ou variáveis independentes (aquelas que temos condições de controlar) e as variáveis dependentes, que são as respostas do sistema, e que serão, ou não, afetadas por modificações provocadas nos fatores. Nesta etapa, muitas vezes, recorre-se a dados da literatura, a fim de aproximar ou evitar condições previamente estudadas.

2. *Caracterização do processo*: nesta etapa, se verifica quais variáveis independentes influenciam significativamente a resposta e, posteriormente, reduz-se o número de variáveis, excluindo aquelas não significativas. Diversos métodos podem ser empregados para a avaliação: experimentos fatoriais completos e fracionados, experimentos Plackett Burman, etc.

3. *Otimização*: nesta etapa, se define os níveis máximo e mínimo dos intervalos das variáveis que serão empregadas no experimento. Para tanto, os métodos mais utilizados são: de superfície de resposta, os experimentos fatoriais, Taguchi, etc.

4. *Verificação*: nesta etapa, os dados obtidos na etapa de otimização são avaliados experimentalmente.

As próximas sessões descrevem com mais detalhes as metodologias utilizadas no presente trabalho: (I) planejamento fatorial completo, para a caracterização do processo de extração; (II) metodologia de superfície de resposta, para a otimização do processo de extração e (III) função Desejabilidade, para a otimização de múltiplas variáveis.

2.7.1. Planejamento fatorial completo

Na técnica de planejamento fatorial são investigadas as influências e os efeitos de interação das variáveis independentes sobre a variável resposta. O planejamento fatorial é classificado de acordo com o número de níveis das variáveis independentes, sendo 2^k o mais utilizado (combinação de k variáveis independentes, cada uma investigada em dois níveis). Desta forma, $2^k = N$, onde N é o número de experimentos a serem construídos para a definição das relações dos fatores com as variáveis resposta.^{151,153}

De maneira geral, os níveis dos fatores são codificados como +1 (nível mais alto) e -1 (nível mais baixo). Caso os fatores sejam qualitativos, os sinais são atribuídos aleatoriamente. Desta forma, elabora-se uma matriz de experimentos, alternando os sinais +1 e -1 nas colunas.

O procedimento experimental consiste na realização de testes em todos os tratamentos possíveis, ou seja, todas as combinações de níveis dos fatores, seguindo a matriz de experimentos determinada pelo planejamento.^{151,153} Para cada experimento haverá uma ou mais respostas a serem coletadas, normalmente representadas por y .

Em alguns casos, a realização de repetições autênticas pode ser inconveniente, principalmente, devido ao grande número de experimentos gerados. Como alternativa, pode-se empregar o planejamento fatorial, completo ou fracionário, com ponto central. Nestes casos, inclui-se um experimento no centro do planejamento, utilizando o valor médio dos níveis das variáveis analisadas (nível zero). O experimento do ponto central será realizado de forma repetida, e a sua variação aplicada ao ensaio.^{151,153}

Após a realização dos experimentos, os dados gerados são avaliados utilizando softwares, que possibilitam a utilização de técnicas de planejamento e análise de experimentos. Desta forma, avalia-se a significância dos efeitos ou coeficientes sob o processo e as possíveis interações entre os fatores.

As variáveis significativas podem ser selecionadas e uma metodologia de otimização, como a análise de superfície de resposta, pode ser aplicada, a fim de obter os valores das variáveis que irão produzir a melhor condição experimental.^{151,153}

2.7.2. Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (RSM, do inglês *Response Surface Methodology*) baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que empregam funções polinomiais, lineares ou quadráticas, para descrever o sistema em estudo, com o objetivo de explorá-lo até obter a sua otimização.¹⁵³ Para a análise estatística dos resultados e a determinação da superfície de resposta é fundamental utilizar recursos computacionais, como os softwares Excel ® ou Statistica ®.

A análise de sistemas pela RSM segue as seguintes etapas:¹⁵¹

1. *Amostragem*: nesta etapa, obtém-se um conjunto de dados experimentais, seguindo uma metodologia de planejamento de experimentos de ordem 2, como o Delineamento Composto Central (CCD, do inglês "*Central Composite Design*") ou o Delineamento de Box-Behnken.

2. *Modelagem e análise dos modelos de superfície de resposta*: nesta etapa, ajusta-se o modelo implementado e se faz uso de técnicas estatísticas para analisá-lo. Para tanto, utiliza-se as técnicas: Modelos de Regressão, Estimção dos Parâmetros (MQ), Técnicas de Inferência Estatística, ANOVA e Falta de Ajuste. A inclusão de réplicas torna-se crucial quando se considera modelos quadráticos, devido à necessidade de detectar o grau de curvatura do modelo.

3. *Otimização*: nesta etapa, obtém-se a condição ótima dos níveis das variáveis independentes e verifica-se a necessidade da realização de novos experimentos. Para a otimização do modelo ajustado, utiliza-se as técnicas: Cálculo de Máximo ou Mínimos, Curvas de Nível, Visualização Gráfica, Métodos Numéricos, *Steepest Ascendent* ou *Descent* ou Simulação de Monte Carlo.

No processo, os dados experimentais gerados na amostragem (respostas ou y) devem ser submetidos a um modelo. Segundo Myers *et al.*¹⁵⁴ existe uma relação que descreve uma resposta y em função das variáveis independentes x_1, x_2, \dots, x_k em um sistema:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon \quad (\text{Equação 1})$$

Onde k é o número de variáveis independentes estudadas e ε é o erro aleatório associado à determinação experimental.

Ao estudar um sistema, a função que o descreve ainda é desconhecida, mas pode ser aproximada por meio de uma relação polinomial. As funções de

aproximação são denominadas de Modelos de Regressão. O primeiro modelo de regressão a ser avaliado, por ser o mais simples, é o polinômio de 1ª ordem, que representa o efeito linear. O polinômio de 1ª ordem é descrito por:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (\text{Equação 2})$$

Onde $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ representam os coeficientes.

Caso o teste estatístico aponte que o modelo linear não satisfaz as condições de operação do sistema, a função a ser aproximada no conjunto de resultados é um polinômio de ordem maior, como o modelo de 2ª ordem, descrito por:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (\text{Equação 3})$$

O modelo de segunda ordem inclui todos os termos de primeira ordem, somado aos termos quadráticos $\beta_{ii} x_i^2$ e os termos das interações dos modelos $\beta_{ij} x_i x_j$, sendo que β representa os estimadores dos parâmetros do modelo juntamente com os índices i e j .

O delineamento composto central (CCD) pode ser empregado na obtenção dos dados para criação de uma superfície de um modelo de 2ª ordem.¹⁵¹ Esta metodologia consiste no planejamento fatorial clássico em dois níveis (2^k), acrescido de alguns pontos experimentais, que permitem a estimativa dos coeficientes de uma superfície de 2ª ordem. Este é um dos planejamentos mais utilizados em RSM.¹⁵³

O CCD apresenta notável superioridade sobre o planejamento fatorial para se estimar os parâmetros do modelo, pois proporciona o teste para a variância da estabilidade. Além disso, o modelo de segunda ordem pode ser ajustado com o número de graus de liberdade fornecido pela combinação de tratamentos do CCD.¹⁵³

Os resultados da RSM podem ser apresentados sob a forma de gráficos de superfície de resposta, que são superfícies tridimensionais sobre um plano com dois parâmetros, ou gráficos de contorno, que são superfícies bidimensionais em relação a um dos parâmetros.

2.7.3. Experimentos multiresposta: função Desejabilidade

Quando o procedimento de otimização envolve múltiplas variáveis resposta, pode não ser vantajoso otimizá-las separadamente, e sim, reuni-las em uma solução

global. Esta solução global deve estar em uma região ideal, segundo determinados critérios propostos, para cada variável.¹⁵⁵

Baseado na ideia de que a qualidade de um processo deva estar dentro de um limite desejável, Derringer *et al.*¹⁵⁶ desenvolveram uma metodologia de otimização de múltiplas respostas, chamada função Desejabilidade. Neste contexto, busca-se encontrar uma condição que garanta o cumprimento dos critérios estipulados para todas as variáveis envolvidas e, ao mesmo tempo, proporcionar o melhor valor de compromisso na resposta conjunta desejável.

Segundo esta abordagem, o resultado é obtido convertendo as múltiplas respostas em uma única, mediante a combinação das respostas individuais em uma função composta. Desta forma, cada resposta terá uma função de Desejabilidade e, uma vez que as funções tenham sido especificadas, deve-se combiná-las numa desejabilidade global, dada pela média das desejabilidades individuais.¹⁵⁶

2.8. Métodos de análise de compostos bioativos

Os extratos obtidos a partir dos resíduos agroindustriais são misturas complexas, compostas por uma variedade de classes de metabólitos secundários, como alcaloides, flavonóides, cumarinas, terpenos, ácidos graxos, entre outras.^{45,50} A caracterização química destes extratos pode ser considerada a primeira etapa para o reaproveitamento dos resíduos ou mesmo, para o seu descarte seguro.

As técnicas cromatográficas estão entre as principais técnicas de separação em química analítica, especialmente na análise de substâncias presentes em matrizes complexas. A escolha da técnica cromatográfica baseia-se nas características físico-químicas dos compostos a serem analisados.¹⁵⁷ A cromatografia líquida vem sendo aplicada com sucesso na separação de constituintes de misturas complexas, obtendo alto grau de resolução e permitindo a análise de compostos pouco voláteis e sensíveis à temperatura.^{71,103}

A técnica de HPLC, aliada a detectores de absorção espectrofotométrica na faixa do ultravioleta, como o DAD, permite a identificação e quantificação de compostos conhecidos, que contenham grupos cromóforos. Para ambas as aplicações, faz-se necessário a utilização de padrões analíticos.¹⁵⁸

Na análise dos extratos de café, a HPLC-DAD tem sido utilizada para a determinação de CAF e CGAs, compostos que possuem as características

estruturais descritas acima.¹⁰³ Para tanto, a coluna de fase reversa C₁₈ (característica apolar) tem sido a mais utilizada. Com relação às fases móveis, a utilização de metanol, acetonitrila e água, no modo gradiente, tem permitido boa separação entre os componentes das amostras, com tempos razoáveis de análise. Uma consideração importante quando se trabalha com compostos fenólicos, é a utilização de solventes acidificados durante as separações cromatográficas. Os solventes acidificados garantem que os compostos fenólicos estarão abaixo do seu pK_a, ou seja, na forma não dissociada (característica apolar).^{48,159-162}

No entanto, a técnica de HPLC-DAD fornece apenas o espectro de UV-VIS como informação estrutural de um composto, o que não é suficiente para sua identificação, visto que vários compostos de um mesmo grupo químico apresentam espectros similares, impossibilitando sua distinção.¹⁵⁸ Diante destas limitações, as técnicas hífenadas são fundamentais para a caracterização de extratos vegetais.

As técnicas hífenadas empregam os métodos cromatográficos, que separam os constituintes da amostra, de modo concomitante à aquisição de dados de espectrometria de massas, a fim de identificar os seus constituintes. Dentre as técnicas hífenadas utilizadas para o estudo de compostos bioativos, destaca-se a LC/MS. Esta técnica é uma excelente ferramenta para a análise qualitativa, pois permite a obtenção de informações estruturais dos compostos. Os principais analisadores de massas acoplados à cromatografia líquida são os do tipo aprisionadores de íons (IT, do inglês "*Ion Trap*"), tempo de voo (TOF, do inglês "*Time-of-Flight*") e quadrupolo (Q).¹⁵⁸

O desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica, como a ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês "*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*") e a ionização por eletronebulização ou eletrospray (ESI, do inglês "*EletroSpray Ionization*") tornaram a técnica de LC/MS aplicável para uma grande variedade de matrizes.¹⁶³ No entanto, as interfaces APCI e ESI produzem ionizações brandas, gerando informação apenas da massa molecular dos compostos, ou seja, são formados íons pseudo-moleculares intactos, [M+H]⁺ no modo positivo e [M-H]⁻ no modo negativo.¹⁶³ Consequentemente, a LC/MS tem maior emprego em estudos que visam a confirmação de compostos alvo, do que na determinação da identidade de compostos desconhecidos.¹⁵⁷

O desenvolvimento, e posterior aprimoramento, das técnicas denominadas “tandem MS” (ou MS/MS) e seu acoplamento à cromatografia líquida, gerando os sistemas LC/MS/MS, representam um grande avanço na química analítica.¹⁵⁷

A tandem MS utiliza dois estágios de espectrometria de massas (MS^1 e MS^2). O primeiro é utilizado para isolar o íon de interesse e o segundo, para estabelecer uma relação entre este íon e os íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida. A técnica é empregada na análise de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, uma vez que possibilita o aumento na quantidade de informação estrutural dos analitos e da detectabilidade, pois reduz a interferência espectral da matriz.¹⁶³

Crupi *et al.*¹⁶⁴ descrevem duas configurações para as técnicas de MS/MS: a “*tandem-in-space*”, que utiliza múltiplos analisadores em sequência, por exemplo o triplo quadrupolo (QqQ) e o quadrupolo por tempo de voo (Q-TOF); e a “*tandem-in-time*”, no qual a seleção de íons pais e sua subsequente fragmentação, ocorre dentro do mesmo analisador, caso do “*ion trap*” (IT). O analisador IT possui a vantagem de permitir análises por meio de experimentos MS^n (n=número de fragmentações). Contudo, ambas as configurações têm como intuito obter informações acerca do padrão de fragmentação dos compostos, a fim de compará-los com padrões analíticos ou, até mesmo, com dados da literatura.

O estudo detalhado dos padrões de fragmentação dos CGAs, obtidos por LC/MSⁿ, foi publicado por Clifford *et al.*¹⁶⁵ em 2003 e serve como base para a identificação tentativa desta classe de compostos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Etapas experimentais

A primeira etapa experimental consistiu na validação da metodologia analítica para quantificação dos compostos 5-CQA, CAF, teobromina, teofilina e ácido cafeico, por HPLC-DAD. Na segunda etapa, foi realizada a avaliação das variáveis significativas ao processo de UAE do 5-CQA e CAF da *silverskin*. Na terceira etapa, os parâmetros significativos da UAE para a extração do 5-CQA e CAF foram otimizados. Além disso, foram realizadas extrações sólido-líquido da *silverskin*, a fim de comparar a eficiência, em termos de extração do 5-CQA e CAF, entre as duas metodologias extrativas. Por fim, o extrato obtido por UAE teve seus compostos majoritários identificados e quantificados, e sua capacidade antioxidante e toxicidade avaliadas. A **Figura 9** apresenta um fluxograma das etapas experimentais realizadas no presente estudo.

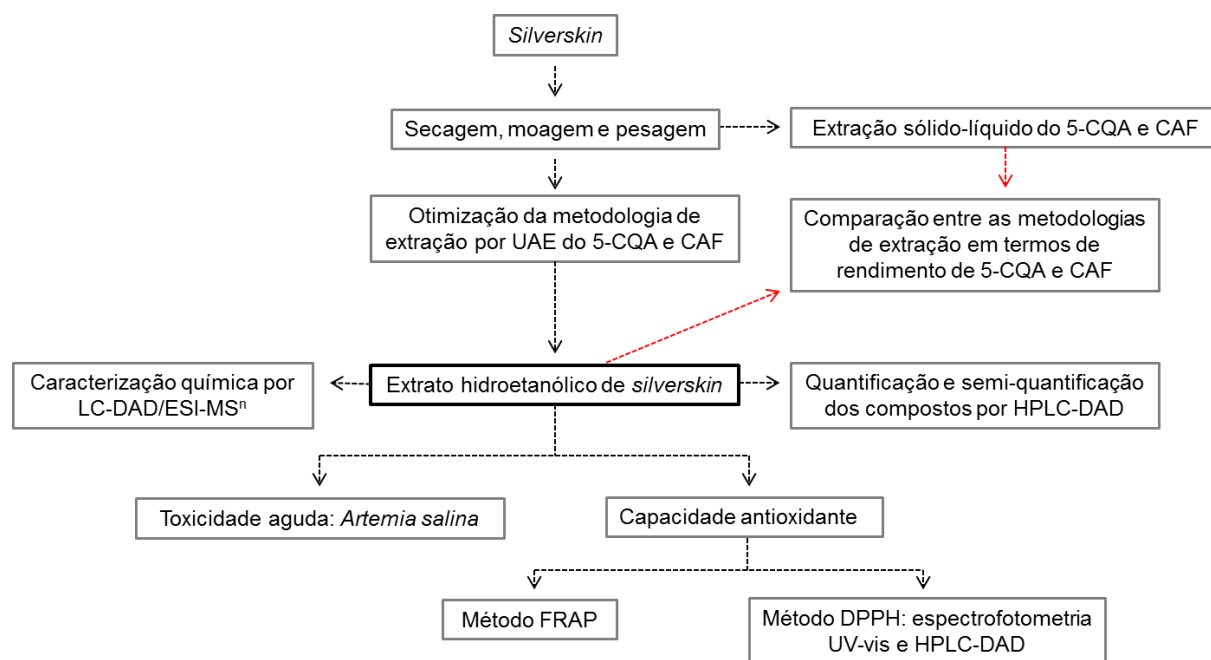


Figura 9: Fluxograma das etapas experimentais realizadas durante o estudo de obtenção e caracterização do extrato de *silverskin*.

3.2. Reagentes, solventes e equipamentos

Os solventes orgânicos metanol e etanol, grau HPLC, e os ácidos fórmico e clorídrico, grau para análise, foram adquiridos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). Os padrões: ácido 5-cafeoilquínico (95 % de pureza), cafeína (99 % de pureza), teobromina (99 % de pureza), teofilina (99 % de pureza), ácido cafeico (98 % de pureza), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (98 % de pureza) e TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) (98 % de pureza), foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Milwaukee, EUA). O cloreto férrico, sulfato ferroso, cloreto de sódio e hidróxido de sódio foram adquiridos da empresa Synth (São Paulo, Brasil). A fita indicadora de pH foi adquirida da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). A coluna cromatográfica C₁₈ Synergi Hydro-RP 80A (25 cm x 4,6 mm x 4 µm), foi adquirida da empresa Phenomenex (Califórnia, EUA). Os filtros de politetrafluoretileno/teflon (PTFE) para seringa, 0,20 micra, 25 mm, foram adquiridos da Macherey Nagel (Duren, Alemanha). Os ovos de *Artemia salina* Leach foram adquiridos no comércio local. A água desionizada foi purificada pelo sistema Milli-Q, adquirido da empresa Millipore (Darmstadt, Alemanha).

Os equipamentos utilizados no estudo foram: estufa (315 SE) da Fanem (São Paulo, Brasil), moinho de facas (MA340MF) da Marconi (São Paulo, Brasil), peneira granulométrica número 20 (0,84 mm de abertura) da Bertel (São Paulo, Brasil), banho de ultrassom (USC 1800) da Unique (São Paulo, Brasil), balança analítica (Adventurer) da Ohaus (Nova Jérсия, EUA), agitador de tubos tipo vortex (VTX-2500-220) da Biomixer (Biomex Biotecnologia, São Paulo, Brasil), evaporador rotatório (R-300) da Buchi (Flawil, Suíça), liofilizador (ModulyoD) da Thermo Fisher (Massachusetts, EUA), centrífuga (Excelsa i 2206) da Fanem (São Paulo, Brasil) e espectrofotômetro (UV – 6100S) da Global Trade Technology (São Paulo, Brasil).

O sistema de cromatografia líquida utilizado foi o modelo 20-AD, provido de amostrador SIL-20A, degaseificador de fase móvel DGU-20A3, forno de aquecimento de coluna CTO-20A e detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M-20A, adquirido da empresa Shimadzu (Quioto, Japão). O software para aquisição e tratamento de dados instalado no sistema LC-DAD/ESI-MSⁿ foi o LCsolution versão 1.25 também da Shimadzu (Quioto, Japão).

O espectrômetro de massas do tipo *Ion Trap*, equipado com fonte de ionização *electrospray* (ESI-MS) (Esquire 6000), foi adquirido da Bruker (Massachusetts, EUA).

3.3. Matéria-prima

A matéria prima utilizada no estudo (tegumento do grão de café, conhecido pelo nome *silverskin*) foi obtida no complexo industrial "Café Maratá", situado no município de Itaporanga D'Ajuda, em Sergipe. O resíduo era proveniente da mistura das espécies de café Arábica e Robusta.

A *silverskin* foi submetida ao processo de secagem em estufa, por 5 horas a 50 °C. O material seco foi armazenado em recipientes de vidro, recobertos com papel alumínio para evitar a ação da luz, até ser submetido ao processo de extração. Para os experimentos, uma quantidade suficiente do material foi triturada, em moinho de facas, e posteriormente passada por peneira número 20.

3.4. Análises cromatográficas

A separação, identificação e quantificação dos compostos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de diodos acoplada à espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (LC-DAD/ESI-MSⁿ). As separações cromatográficas foram efetuadas utilizando coluna de fase reversa C₁₈.

As condições cromatográficas utilizadas foram aquelas desenvolvidas por Rodrigues *et al.*¹⁵⁹ com modificações: temperatura do forno de 30 °C, vazão de fase móvel de 1 mL min⁻¹ e tempo de análise cromatográfica de 70 minutos. As fases móveis consistiram de mistura de 80 % de água ultrapura acidificada a 0,3 % (ácido fórmico) e 20 % de metanol (Fase A); e 100 % metanol acidificado a 0,3 % com ácido fórmico (Fase B). A eluição ocorreu em modo gradiente: 100 % de (A) por 19 minutos; passando a 80 % de A em 6 minutos e permanecendo assim por 10 minutos, passando a 60 % de (A) em 15 minutos e permanecendo por 10 minutos e chegando a 100 % de (B) em 1 minuto e permanecendo assim por 9 minutos. Para a detecção dos compostos, o espectro UV-Vis foi obtido entre 200 e 800 nm e os cromatogramas processados à 272 e 325 nm.

O sistema HPLC-DAD foi acoplado ao espectrômetro de massas do tipo *Ion Trap*, equipado com fonte de ionização *eletrospray* (ESI-MS), operando nas seguintes condições: capilar: -3000 V; *skimmer*: -72 V; gás de nebulização (N₂), T: 310 °C; vazão 8 L min⁻¹; pressão 30 psi; energia de fragmentação 1,6 V. A detecção no ESI-MS foi realizada com ionização no modo negativo e positivo em uma faixa de massas de 100 a 800 *m/z*.

Os dados foram adquiridos e processados pelo software LCsolution. A identificação positiva dos compostos foi realizada por meio da comparação dos dados cromatográficos (tempo de retenção), espectrofotométricos (espectro de absorção no UV-Vis) e espectrométricos (íons moleculares e fragmentos) com os de padrões analíticos. A identificação tentativa foi realizada por meio da comparação entre os espectros de massas dos compostos com dados da literatura.¹⁶⁵

3.4.1. Validação da metodologia analítica

Os parâmetros de validação avaliados para os compostos 5-CQA, CAF, teobromina, teofilina e ácido cafeico, no sistema HPLC-DAD foram: seletividade, faixa de trabalho e linearidade, precisão e limites de detecção de quantificação. A validação analítica seguiu as recomendações de trabalhos publicados na literatura pertinente.¹⁶⁶

Seletividade

A especificidade do método analítico foi verificada por meio da análise de uma solução contendo os padrões de interesse e uma amostra de extrato de *silverskin*, fortificada com os analitos. A pureza dos picos dos compostos na amostra foi avaliada pela comparação dos espectros, em três diferentes regiões (início, vértice e final) com os dos padrões,¹⁶⁷ indicando assim, a presença ou não de coeluições.

Curva analítica e linearidade

A quantificação foi realizada pelo método da padronização externa. Para tanto, foram preparadas soluções estoque, utilizando metanol como solvente, dos compostos individualmente (200 µg mL⁻¹). As curvas analíticas foram preparadas unindo os compostos (*mix*), a partir da diluição das soluções estoque na fase móvel

A. Obteve-se assim, faixas de concentração de 1 a 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a CAF (10 níveis), 1 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para teobromina, teofilina e 5-CQA (8 níveis) e de 0,1 a 1,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (8 níveis) para o ácido cafeico. Para a avaliação da linearidade, foram preparadas 3 curvas analíticas, de forma independente. A faixa de linearidade de cada composto foi determinada pela avaliação das equações de regressão linear por meio do gráfico (área de pico *versus* concentração de padrão), empregando o método dos mínimos quadrados e expresso por meio do coeficiente de determinação (r^2).

Os derivados clorogênicos identificados tentativamente no extrato foram semi-quantificados em relação ao 5-CQA (equivalentes do 5-CQA).^{74,168} Desta forma, a área cromatográfica destes compostos foi aplicada à curva de calibração do 5-CQA.

Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de quantificação e detecção foram determinados utilizando as equações:

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

$$LOQ = \frac{\sigma}{S} \times 10 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde σ é o desvio padrão da intercepção da curva e S é a inclinação (*slope*) da curva de calibração.

Precisão (repetitividade)

A precisão foi avaliada efetuando-se 6 injeções, de um único nível de concentração (ponto médio da curva de calibração), para cada um dos analitos. A precisão foi expressa pelo desvio padrão das áreas de cada composto.

3.5. Caracterização do estudo, delineamento experimental e análise estatística dos dados

As extrações foram realizadas em banho de ultrassom. Em cada extração, utilizou-se 0,5 g ($\pm 0,001$ g) de *silverskin*, pesada em balança analítica. A massa fixa de amostra permitiu, mediante a variação do volume do solvente extrator, avaliar a

variável razão amostra-solvente. As outras variáveis independentes estudadas foram a natureza do solvente extrator, o tempo e a temperatura de extração.

Cada extrato obtido foi filtrado em algodão e recolhido em balão volumétrico de 25 mL, avolumado com solução etanol-água (1:1). As amostras de extrato foram diluídas (1:1), utilizando solução etanol-água (1:1), filtradas em filtro para seringa, transferidas para vials de injeção e imediatamente submetidas à análise. Como o objetivo do estudo foi maximizar as quantidades de 5-CQA e CAF extraídos da *silverskin* utilizando a técnica de UAE, todas as amostras geradas nas etapas de triagem de variáveis e otimização do processo de extração, foram quantificadas, em termos de 5-CQA e CAF, por meio do sistema HPLC-DAD.

3.5.1. Ensaio de triagem das variáveis significativas

Para a etapa de triagem, realizou-se a estimativa e a avaliação dos efeitos das variáveis independentes pré-selecionadas: volume de solvente extrator, % de etanol nas soluções extrativas, temperatura e tempo de extração, no processo de extração dos compostos de interesse. Para tanto, empregou-se um planejamento fatorial completo (2^4). Os níveis das variáveis foram codificados como: -1 (baixo), 0 (ponto central) e +1 (alto). As estimativas dos erros para o planejamento foram obtidas com a inclusão de experimentos no ponto central (5 repetições).

O ensaio consistiu na realização dos 21 experimentos de extração, previstos no planejamento 2^4 . A análise por HPLC-DAD de cada extrato gerou duas variáveis resposta: concentração de 5-CQA (y_1) e de CAF (y_2), expressas em mg g^{-1} de resíduo seco (*silverskin*). Os códigos e valores das variáveis independentes estão apresentados na **Tabela IV**.

Tabela IV: Variáveis e níveis decodificados para o planejamento fatorial completo (2^4) com ponto central.

Fatores	Símbolo	Escala Codificada		
		-1	0	1
Volume solvente (mL)	x_1	10	15	20
% etanol no solvente	x_2	30	50	70
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	x_3	35	45	55
Tempo (min)	x_4	7	12	17

Os valores, codificados e decodificados, das variáveis independentes para cada experimento estão dispostos na **Tabela V**.

Tabela V: Ensaios para o planejamento fatorial completo (2^4) com ponto central.

Ensaio	Variáveis Independentes							
	x ₁ volume (mL)		x ₂ % etanol		x ₃ temperatura (°C)		x ₄ tempo (min.)	
	código	valor	código	valor	código	valor	código	valor
1	-1	10	-1	30	-1	35	-1	7
2	1	20	-1	30	-1	35	-1	7
3	-1	10	1	70	-1	35	-1	7
4	1	20	1	70	-1	35	-1	7
5	-1	10	-1	30	+1	55	-1	7
6	1	20	-1	30	+1	55	-1	7
7	-1	10	1	70	+1	55	-1	7
8	1	20	1	70	+1	55	-1	7
9	-1	10	-1	30	-1	35	+1	17
10	1	20	-1	30	-1	35	+1	17
11	-1	10	1	70	-1	35	+1	17
12	1	20	1	70	-1	35	+1	17
13	-1	10	-1	30	+1	55	+1	17
14	1	20	-1	30	+1	55	+1	17
15	-1	10	1	70	+1	55	+1	17
16	1	20	1	70	+1	55	+1	17
R1	0	15	0	50	0	45	0	12
R2	0	15	0	50	0	45	0	12
R3	0	15	0	50	0	45	0	12
R4	0	15	0	50	0	45	0	12
R5	0	15	0	50	0	45	0	12

Na matriz acima, cada linha representa um experimento do ensaio. Os resultados obtidos foram submetidos a avaliação estatística (teste *t* de Student), utilizando o software STATISTICA® 10, a fim de verificar quais variáveis independentes tiveram influencia significativa no processo de extração.

3.5.2. Otimização das condições da UAE utilizando a metodologia de superfície de resposta

O delineamento composto central rotativo foi aplicado às duas variáveis independentes consideradas significativas no ensaio de triagem de variáveis significativas. As variáveis foram recodificadas como: x₁ (% de etanol no solvente extrator) e x₂ (temperatura da extração). As variáveis independentes que não influenciaram significativamente o sistema (tempo e volume de solvente) foram mantidas fixas, nos seus níveis mais baixos (-1).

A **Tabela VI** apresenta os códigos e valores das variáveis independentes para o planejamento. As variáveis dependentes foram rendimento de 5-CQA e de CAF.

Tabela VI: Variáveis e níveis decodificados para o planejamento delineamento composto central rotativo.

Fatores	Símbolo	Escala Codificada				
		-1,41	-1	0	1	+1,41
% etanol	x_1	22	30	50	70	78
temperatura (°C)	x_2	31	35	45	55	59

Os valores, codificados e decodificados, das variáveis independentes para cada experimento estão dispostos na **Tabela VII**.

Tabela VII: Ensaios para o planejamento delineamento composto central rotativo.

Ensaio	Variáveis Independentes			
	x_1 % etanol		x_2 temperatura (°C)	
	código	valor	código	valor
1	-1	30	-1	35
2	+1	70	-1	35
3	-1	30	+1	55
4	+1	70	+1	55
5	-1,41	22	0	45
6	+1,41	78	0	45
7	0	50	-1,41	31
8	0	50	+1,41	59
9	0	50	0	45
10	0	50	0	45
11	0	50	0	45

O delineamento experimental consistiu de 9 pontos: 4 do fatorial básico, 4 axiais à distância de $\pm 1,41$ do centro (escala codificada) e 1 ponto central (3 repetições), totalizando 11 experimentos.

O modelo de segundo grau correspondente a esse delineamento composto é:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon_i \quad (\text{Equação 3})$$

em que y é a variável resposta; β_0 é a constante do modelo; β_i é o coeficiente linear; β_{ii} é o coeficiente quadrático; β_{ij} o coeficiente de interação; ε_i representa o erro aleatório; k é o número de fatores estudados no experimento; x_i e x_j são os valores das variáveis independentes na escala real ($i \neq j$). A equação polinomial ajustada foi apresentada como gráficos de superfície de respostas, no intuito de ilustrar a relação entre a resposta e os níveis experimentais de cada fator e para deduzir as condições ótimas.

3.5.2.1. Ajuste e testes do modelo de regressão

As análises estatísticas (ANOVA e de regressão) dos dados experimentais foram realizadas utilizando-se o software STATISTICA® (versão 10). A adequação do modelo foi determinada pela avaliação da probabilidade de F para a falta de ajuste na análise de variância da regressão. O Teste t de Student foi utilizado para testar a significância das estimativas dos coeficientes da regressão.

3.5.2.2. Validação do modelo de regressão ajustado

Para verificar a validade das estimativas da equação de regressão (valores preditos) foram realizados experimentos de confirmação (3 repetições), utilizando os valores das variáveis independentes nas condições ótimas estimadas pelo modelo.

3.6. Obtenção dos extratos de *silverskin* por UAE na condição otimizada

Os valores ótimos determinados para as variáveis independentes que influenciaram o sistema, assim como, os níveis mais baixos das variáveis independentes não significativas, foram utilizados na UAE para gerar extratos ricos em 5-CQA e CAF. Os extratos gerados foram quantificados em termos de teobromina, teofilina e ácido cafeico, utilizando metodologia por padronização externa, e HPLC-DAD. Além disso, os extratos foram caracterizados por LC/MSⁿ e os compostos identificados como derivados clorogênicos, foram quantificados em termos de equivalentes do 5-CQA.

3.7. Obtenção dos extratos de *silverskin* por metodologia convencional de extração

Os ensaios de extração do 5-CQA e da CAF, empregando extração sólido-líquido, foram realizados com o objetivo de comparar a eficiência de extração da metodologia convencional com a UAE, desenvolvida no presente estudo. O parâmetro utilizado para a comparação foi a quantidade, em mg g⁻¹, de 5-CQA e CAF extraídos da matriz. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para a extração sólido-líquido do 5-CQA, utilizou-se a metodologia de extração sequencial desenvolvida por Jeszka-Skowron *et al.*¹⁰³ Pesou-se cerca de 0,1g de amostra, que foi acondicionada em tudo de ensaio, e adicionou-se 5 mL de solução metanol-água (8:2). A mistura foi agitada em agitador de tubos do tipo vortex, por 5 minutos e centrifugada, a 5000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, filtrado em filtro para seringa e analisado por HPLC-DAD, nas condições descritas na **seção 3.4**. O resíduo foi novamente submetido ao processo de extração, de forma sequencial, até que o composto não fosse identificado no sobrenadante coletado.

Para a extração sólido-líquido da CAF, utilizou-se a metodologia de extração sequencial desenvolvida por Zuo *et al.*¹⁶⁹ Pesou-se cerca de 2 g de amostra em tubo de ensaio e adicionou-se 20 mL de solução metanol-água (8:2). Após 3 horas de extração, o sobrenadante foi coletado. O resíduo foi novamente submetido ao procedimento extrativo utilizando metanol-água (total 3 vezes). Após esta primeira etapa de extração, adicionou-se ao resíduo, 20 mL de solução metanol-água (8:2), acidificada com 0,15 % de HCl. Após 3 horas de extração, o sobrenadante foi coletado e o procedimento repetido (total 2 vezes). Os volumes dos cinco sobrenadantes foram combinados e filtrados em algodão, gerando o extrato. O extrato foi diluído em água Milli-Q, filtrado em filtro para seringa e analisado por HPLC-DAD, nas condições descritas na **seção 3.4**.

3.8. Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de *silverskin*

O extrato hidroetanólico, obtido por UAE, e os padrões analíticos 5-CQA e CAF, foram submetidos à avaliação da capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP. Para a avaliação da atividade dos padrões analíticos, foram

preparadas soluções estoque individuais dos compostos, em concentrações idênticas as dos compostos no extrato, ou seja, 40 mg L⁻¹ de 5-CQA e 125 mg L⁻¹ de CAF.

3.8.1. Método do sequestro do radical DPPH

A capacidade antioxidante das amostras foi determinada pela redução do DPPH[•], segundo metodologia espectrofotométrica proposta por Brand-Williams *et al.*¹⁰¹ A identificação dos compostos responsáveis pelo sequestro do DPPH[•] foi realizada por HPLC-DAD.¹⁰⁶

Ambos os ensaios, utilizaram solução metanólica do radical DPPH (0,06 mM), preparada imediatamente antes do início do ensaio.

Método Espectrofotométrico

O extrato foi diluído a 0,1; 1,0; 5,0; 7,5 e 10 % (v/v), utilizando metanol. Considerando o rendimento em extrato seco (2,09 g L⁻¹), obtido mediante evaporação do extrato líquido, sob fluxo de nitrogênio, até a secura, as diluições do extrato hidroetanólico corresponderam as seguintes concentrações respectivamente: 2,10; 20,96; 104,82; 157,23 e 209,64 mg L⁻¹.

Para fins de comparação, as soluções estoque dos padrões de 5-CQA e CAF foram diluídas em metanol, nas mesmas proporções (v/v) do extrato, gerando soluções nas seguintes concentrações: 0,04; 0,40; 2,00; 3,00 e 4,00 mg L⁻¹ de 5-CQA e 0,13; 1,25; 6,26; 9,39 e 12,52 mg L⁻¹ de CAF.

Inicialmente, selecionou-se uma amostra do extrato diluído para a avaliação do tempo de reação com o DPPH[•]. Para o procedimento, uma alíquota de 0,5 mL da amostra foi transferida para um tubo de ensaio e adicionou-se 1,0 mL da solução de DPPH[•] (0,06 mM). A solução foi homogeneizada em agitador de tubos do tipo vortex e o volume transferido para uma cubeta de vidro. Realizou-se a leitura da absorvância da amostra em espectrofotômetro, a 517 nm, em intervalos de 5 minutos, até a estabilização da absorvância. Utilizou-se metanol para a calibração do equipamento e como amostra controle (amostra sem adição de antioxidante). Determinado o tempo de reação (30 minutos), todas as outras diluições do extrato e dos padrões foram submetidas ao mesmo procedimento.

A absorvância de cada amostra foi correlacionada com a absorvância do controle, estabelecendo-se assim, o percentual de inibição do DPPH•, conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de Inibição do DPPH}\bullet = \frac{\text{absorvância do controle} - \text{absorvância da amostra}}{\text{absorvância do controle}} \times 100$$

(Equação 6)

Os resultados do ensaio foram expressos em termos de EC₅₀, que corresponde a concentração da amostra necessária para reduzir 50 % da absorvância do DPPH•. O valor de EC₅₀ é obtido substituindo-se a absorvância equivalente a 50 % de inibição do radical na equação da reta que relaciona os dados de % de inibição do DPPH• *versus* concentração das amostras. O experimento foi realizado em ambiente escuro, em triplicata.

Método DPPH-HPLC-DAD

No ensaio DPPH-HPLC-DAD foi avaliada a diluição a 10 % (v/v), tanto do extrato, quanto das soluções dos padrões. De cada amostra, foram retiradas duas alíquotas de 0,5 mL. As alíquotas foram acondicionadas em tubos de ensaio, ao primeiro tubo, adicionou-se 1,0 mL da solução de DPPH (0,06 mM), enquanto ao segundo, 1 mL de metanol. As soluções foram homogeneizadas em agitador de tubos do tipo vortex e deixadas em repouso, em ambiente escuro, durante 30 minutos. Transcorrido o tempo de reação, as amostras foram analisadas por HPLC-DAD, nas condições descritas na seção 3.4. A avaliação dos resultados foi realizada mediante a diferença de área cromatográfica dos picos dos compostos da amostra com e sem adição de DPPH.

3.8.2. Método FRAP

Para a avaliação da capacidade antioxidante por meio da redução do ferro, utilizou-se a metodologia desenvolvida para a avaliação em frutas.¹⁷⁰ O reagente FRAP foi obtido a partir da mistura de 25 mL de tampão acetato (0,3 M); 2,5 mL de uma solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) (10 mM) e 2,5 mL de cloreto de ferro em solução aquosa (20 mM). O reagente foi preparado imediatamente antes do início do ensaio.

O ensaio foi realizado utilizando as seguintes diluições do extrato hidroetanólico: 0,1; 1,0; 5,0; 75 e 100 % (v/v) em metanol. Considerando rendimento da extração ($2,09 \text{ g L}^{-1}$) as diluições corresponderam as seguintes concentrações respectivamente: 2,10; 20,96; 104,82; 1572,30 e 2096,40 mg L^{-1} . As soluções estoque dos padrões 5-CQA e CAF foram diluídas a 0,1; 1,0; 75 e 100 % (v/v) em metanol, gerando soluções nas seguintes concentrações: 0,04; 0,40; 30 e 40 mg L^{-1} , de 5-CQA e 0,13; 1,25; 93,75 e 125 mg L^{-1} de CAF.

Para a avaliação da atividade antioxidante, alíquotas de 2,7 mL do reagente FRAP foram transferidas para tubos de ensaio. A cada tubo contendo o reagente, foram adicionados 270 μL de água destilada e 90 μL da amostra a ser avaliada. As soluções foram homogeneizadas em agitador de tubos do tipo vortex e incubadas à 37 °C, durante 30 minutos. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro, a 595 nm. A quantificação foi realizada a partir de uma curva analítica, utilizando sulfato ferroso como padrão (500 a 2000 μM). O resultado foi expresso em μmol de sulfato ferroso por grama de amostra ($\mu\text{M FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$).

3.9. Avaliação da toxicidade aguda do extrato de *silverskin* frente à *Artemia salina* Leach

O extrato hidroetanólico, obtido por UAE, foi submetido ao ensaio de avaliação da toxicidade aguda frente à *Artemia salina* Leach. Para tanto, utilizou-se a metodologia desenvolvida por Meyer *et al.*:¹¹⁰ preparou-se uma solução de sal marinho (30 g L^{-1}), ajustou-se o pH da solução a 9,0, por meio da adição de solução de hidróxido de sódio (0,1 M). A solução salina foi utilizada para a eclosão dos ovos do microcrustáceo e para o preparo das diluições do extrato.

Os ovos da *Artemia salina* foram adicionados à solução salina. A solução contendo os ovos foi mantida sob aeração constante e temperatura de 25 °C, por 48 horas, período necessário para a eclosão das larvas.

O extrato hidroetanólico foi reduzido em rota-evaporador e após, liofilizado. O extrato seco foi ressuspense em solução salina, gerando o extrato bruto. O extrato bruto foi diluído, também em solução salina, gerando soluções nas seguintes concentrações: 0,1; 1,0; 5,0; 7,5 e 10 % (v/v), que correspondem a respectivamente 2,10; 20,96; 104,82; 157,23 e 209,64 mg L^{-1} . Estas soluções foram utilizadas para o ensaio de toxicidade.

Transcorrido o período de eclosão dos ovos, um conjunto de larvas foi selecionado e transferido para tubos de ensaio, de forma que cada tubo continha 10 mL de solução de extrato diluído e 10 larvas. A contagem dos indivíduos vivos e mortos foi realizada após 24 horas de contato das larvas com a solução do extrato. Os dados de % de larvas mortas, em relação à concentração do extrato, foram utilizados para estimar a concentração letal média de extrato (LC_{50}) responsável por matar 50 % das larvas. O teste foi acompanhado de um controle negativo (solução salina) e realizado em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Validação da metodologia analítica por HPLC-DAD para a quantificação dos compostos

As condições cromatográficas estabelecidas por Rodrigues *et al.*¹⁵⁹ foram utilizadas para a análise da mistura de padrões: CAF, teobromina, teofilina, ácido cafeico e 5-CQA. Os cromatogramas obtidos foram processados e os picos cromatográfico integrados em dois λ máximos: (I) 272 nm (máximo de absorção da CAF), para a análise das metilxantinas, e (II) 325 nm (máximo de absorção do 5-CQA), para a análise do 5-CQA e do ácido cafeico. Como pode ser visualizado nos cromatogramas **A** e **B** da **Figura 10**, o método proporcionou separação satisfatória entre os compostos, com tempo razoável de análise.

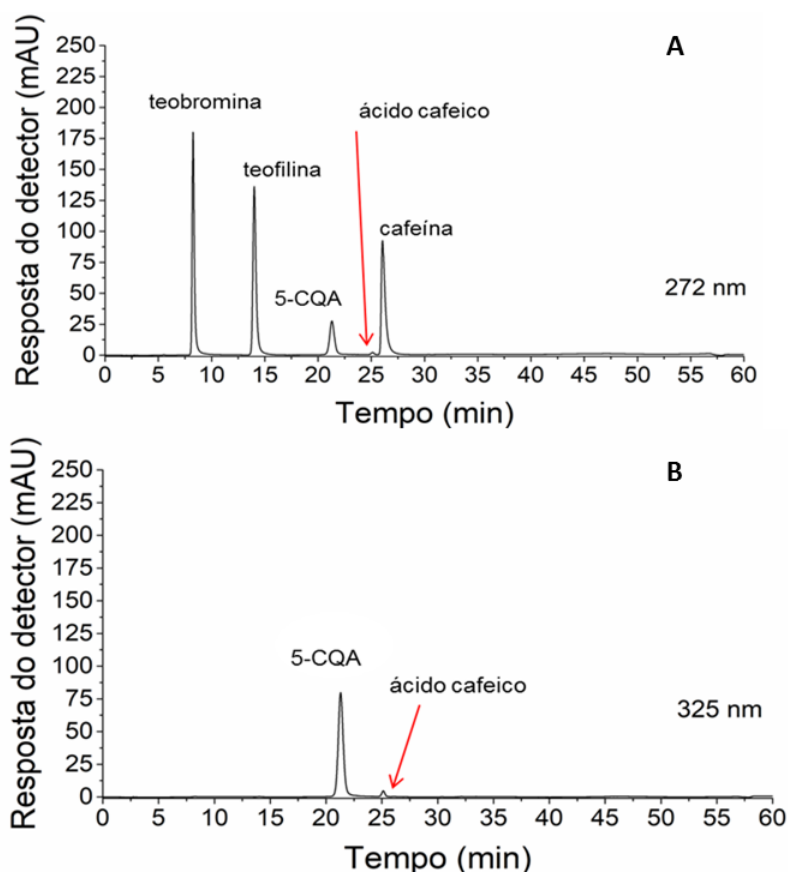


Figura 10: Cromatograma obtido por HPLC-DAD, da solução dos padrões analíticos: teobromina, teofilina, 5-CQA, ácido cafeico e cafeína. **A:** $\lambda = 272$ nm e **B:** $\lambda = 325$ nm. Condições cromatográficas descritas na seção 3.4 da Parte Experimental.

A metodologia foi validada segundo as figuras de mérito: seletividade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.

A) Seletividade

A seletividade é a capacidade que o método analítico possui de determinar o analito de forma inequívoca, mesmo na presença de outros componentes.¹⁶⁷ A seletividade do método foi avaliada mediante obtenção de cromatogramas de varredura do extrato hidroetanólico de *silverskin*, fortificado com os padrões, e da solução contendo os padrões analíticos.¹⁶⁷ A pureza dos picos cromatográficos dos 5 compostos no extrato foi indicada pela semelhança entre os espectros de UV dos compostos na amostra e na solução padrão. O método se mostrou seletivo para todos os compostos.

B) Linearidade

Os intervalos de concentração avaliados para os analitos apresentaram linearidade, uma vez que, os incrementos de concentração utilizados na construção da curva padrão, obtiveram áreas cromatográficas diretamente proporcionais, com coeficiente de correlação (r^2) superiores a 0,99. A **Tabela VIII** apresenta os intervalos de concentração avaliados para cada analito, com suas respectivas equações e coeficientes de correlação.

C) Limite de detecção e quantificação

Os resultados obtidos nos ensaios de avaliação dos limites de detecção e quantificação dos cinco compostos ficaram dentro da faixa esperada para amostras de café e produtos derivados.^{171,172} A **Tabela VIII** apresenta os resultados dos ensaios para os compostos.

Tabela VIII: Resultados dos ensaios de linearidade, limite de detecção e limite de quantificação.

Composto	Equação da reta	r^2	Intervalo linear(*)	LOD(*)	LOQ(*)
Teobromina	$y = 31996x - 4055,8$	0,999	1-50	0,6024	1,8254
Teofilina	$y = 35266x - 3932,9$	0,999	1-50	0,3949	1,1966
Cafeína	$y = 29832x - 9057,1$	0,999	1-75	0,7081	2,1458
Ácido cafeico	$y = 59221x - 288,5$	0,998	0,1-1,1	0,0551	0,1668
5-CQA	$y = 31704x - 11171$	0,999	1-50	0,8965	2,7168

(*) intervalo linear; LOD e LOQ em $\mu\text{g.mL}^{-1}$

D) Precisão (repetitividade)

Os ensaios realizados para a análise da precisão (repetitividade) apresentaram desvio padrão entre 0,5 e 1,4 %. Os valores obtidos comprovam a precisão instrumental, visto que não excederam 5 % de variação.¹⁶⁷

4.2. Otimização dos parâmetros da UAE para a extração do ácido 5-cafeoilquínico e da cafeína

4.2.1. Ensaio de triagem das variáveis significativas

Na etapa de triagem das variáveis significativas, foi utilizado o planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central. As variáveis independentes avaliadas foram: razão amostra-solvente (x_1), % de etanol no solvente extrator (x_2), temperatura (x_3) e tempo de extração (x_4). As duas variáveis dependentes monitoradas foram os rendimentos de 5-CQA (y_1) e CAF (y_2). A **Tabela IX** apresenta os resultados dos 21 experimentos realizados.

Tabela IX: Resultados do planejamento fatorial completo 2^4 com ponto central.

Experimento	Variáveis Independentes				Variáveis Dependentes	
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	y ₁	y ₂
1	10	30	35	7	1,78	5,67
2	20	30	35	7	1,84	5,64
3	10	70	35	7	1,53	5,80
4	20	70	35	7	1,57	5,83
5	10	30	55	7	1,99	6,04
6	20	30	55	7	2,07	6,02
7	10	70	55	7	1,88	6,01
8	20	70	55	7	1,90	6,12
9	10	30	35	17	1,89	5,79
10	20	30	35	17	1,92	5,72
11	10	70	35	17	1,68	5,77
12	20	70	35	17	1,84	5,83
13	10	30	55	17	1,96	6,15
14	20	30	55	17	2,12	6,05
15	10	70	55	17	1,97	6,18
16	20	70	55	17	2,00	6,20
R1	15	50	45	12	1,81	6,15
R2	15	50	45	12	1,90	6,08
R3	15	50	45	12	1,89	6,13
R4	15	50	45	12	1,90	6,05
R5	15	50	45	12	1,90	6,12

Os dados da **Tabela IX** foram submetidos ao teste *t* de Student, a fim de avaliar a significância das variáveis independentes, ou seja, quais variáveis afetaram o processo de extração. A **Tabela X** apresenta os resultados do teste.

Tabela X: Resultados da aplicação do teste *t* aos dados do planejamento fatorial.

Variável independente	5-CQA	CAF
	<i>p</i> -valores	<i>p</i> -valores
X ₁	0,0989	1,0000
X ₂	0,0260	0,0446
X ₃	0,0113	0,0028
X ₄	0,0533	0,0604
X ₁ X ₂	0,7244	0,0927
X ₁ X ₃	1,0000	0,9024
X ₁ X ₄	0,4579	0,3383
X ₂ X ₃	0,1671	0,3828
X ₂ X ₄	0,1799	0,4929
X ₃ X ₄	0,1799	0,2667
X ₁ X ₂ X ₄	0,7244	0,7178
X ₁ X ₃ X ₄	1,0000	0,3828
X ₂ X ₃ X ₄	0,7898	0,1425
X ₁ X ₂ X ₃ X ₄	0,3809	0,6349

Toda variável independente cujo *p*-valor foi menor que o nível de significância $\alpha=0,05$, foi considerada significativa ao processo de extração. Por consequência, as variáveis: % de etanol no solvente extrator (x_2) e temperatura de extração (x_3), foram consideradas significativas, tanto para o 5-CQA, quanto para a CAF. As demais variáveis e interações foram consideradas não significativas.

As variáveis independentes significativas foram otimizadas nas etapas seguintes do processo. Para os experimentos de otimização, as variáveis não significativas foram mantidas nos seus níveis mais baixos (-1): tempo de extração 7 minutos e razão amostra-solvente 1/20 (10 mL de solvente), a fim de economizar solvente, energia e tempo de trabalho.

4.2.2. Otimização dos parâmetros de extração utilizando a metodologia de superfície de resposta

Para a etapa de otimização, as variáveis independentes foram recodificadas da seguinte forma: % de etanol no solvente extrator (x_1) e temperatura de extração (x_2). O efeito da variação das variáveis independentes sobre as variáveis resposta foi investigado. Para tanto, realizou-se uma série de experimentos de extração,

seguinto o planejamento delineamento composto central rotativo. Cada experimento gerou duas variáveis resposta: rendimento de 5-CQA (y_1) e de CAF (y_2). A **Tabela XI** apresenta os resultados obtidos nos 11 experimentos do planejamento.

Tabela XI: Resultados do planejamento delineamento composto central rotativo.

Ensaio	% Etanol (x_1)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (x_2)	5-CQA (mg g^{-1}) (y_1)	CAF (mg g^{-1}) (y_2)
1	30	35	1,77	5,80
2	70	35	1,70	5,83
3	30	55	1,99	6,05
4	70	55	1,75	6,20
5	22	45	1,84	5,63
6	78	45	1,52	5,82
7	50	31	1,86	5,99
8	50	59	2,04	6,32
9	50	45	1,92	6,12
10	50	45	1,92	6,15
11	50	45	1,91	6,17

Para melhor compreensão, os próximos resultados do processo de otimização serão apresentados de forma separada para o 5-CQA e para a CAF.

A) Ajuste da equação de regressão e interpretação do modelo de superfície de resposta para o rendimento do 5-CQA

Ao conjunto de respostas y_1 , rendimento de 5-CQA (**Tabela XI**), foi ajustado um modelo de regressão estimado (função matemática), a fim de explicar o comportamento (variações) da resposta. Desta forma, avaliou-se a adequação do modelo proposto na explicação dos resultados experimentais. O modelo utilizado para a aproximação foi o quadrático (Equação 3). A **Tabela XII** apresenta o resultado da análise do modelo quadrático.

Tabela XII: Resultados da análise do modelo quadrático para o 5-CQA.

	Coefficientes	Erro	$t_{\text{calculado}}$	p
b_0	1,9181	± 0,0042	452,8223	0,0000
b_1	-0,0953	± 0,0026	36,6885	0,0007
b_2	0,0654	± 0,0026	25,1557	0,0016
b_{11}	-0,1228	± 0,0031	39,6084	0,0006
b_{22}	0,0133	± 0,0031	4,2917	0,0502
b_{12}	-0,0427	± 0,0037	11,6508	0,0073

Os coeficientes (b) foram calculados pelo método de mínimos quadrados. A significância de cada coeficiente foi determinada pelo teste t de Student.

Verificou-se a significância estatística, a um nível de 95 % de confiança ($p < 0,05$), dos coeficientes b_0 , b_1 , b_2 , b_{11} e b_{12} . Os três ensaios repetidos no ponto central foram utilizados para calcular $s^2 = 0,00005$, uma estimativa da variância relacionadas ao erro puro.

Substituindo os valores de b na equação do modelo quadrático, obtém-se a equação de regressão ajustada, que explica a variação do rendimento de 5-CQA em função das variáveis independentes:

$$\hat{y} = 1,92 - 0,09x_1 + 0,06x_2 - 0,12x_1^2 - 0,04x_1x_2 \quad (\text{Equação 7})$$

A equação de regressão ajustada foi utilizada para calcular os valores preditos (\hat{y}_1) para cada uma das 11 condições experimentais estudadas. O gráfico da **Figura 11** apresenta a relação entre os valores experimentais (y_1) versus valores preditos (\hat{y}_1) pelo modelo para o 5-CQA.

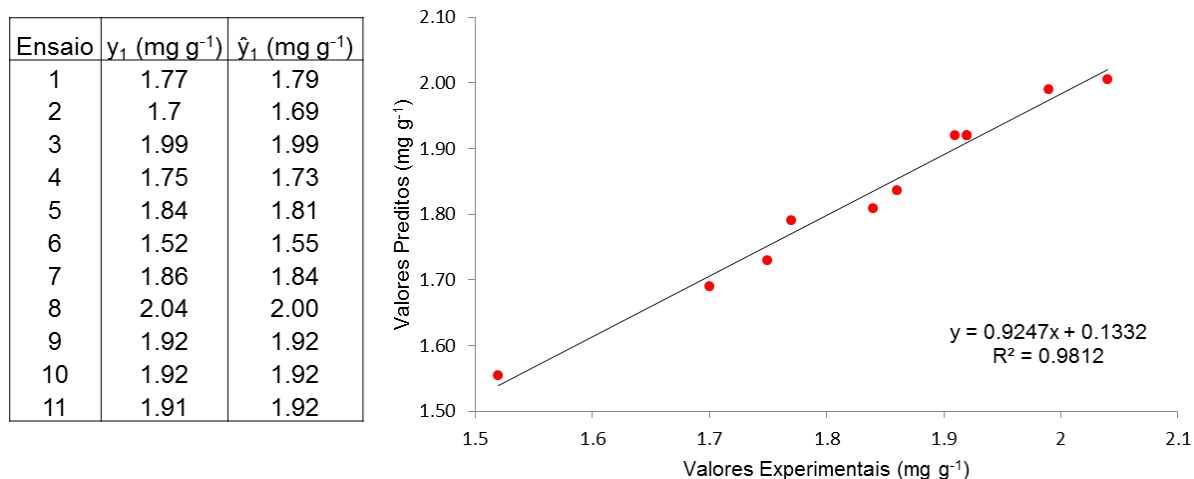


Figura 11: Gráfico dos valores experimentais (y_1) versus preditos pelo modelo quadrático ajustado (\hat{y}_1) para o 5-CQA.

A proximidade dos resultados à reta identidade do gráfico de valores indicou concordância entre os valores experimentais e os obtidos pela equação de regressão ajustada para a maioria dos experimentos.

O modelo quadrático ajustado foi adequado, de acordo com os resultados obtidos na ANOVA (**Tabela XIII**).

Tabela XIII: Análise de variância para o modelo quadrático ajustado.

Fonte de variação	SQ	Nº de g. l.	MQ	$F_{\text{calculado}}$	p
Regressão	0,2130	5	0,0426	70,20	0,0001
Resíduos	0,0030	5	0,0006		
Falta de Ajuste	0,0029	3	0,0010	18,13	0,0527
Erro Puro	0,0001	2	0,0001		
Total	0,2161	10			
% Variação Explicada:		98,60			
% Máxima Variação Explicável:		99,95			

SQ: soma quadrática da regressão; **MQ:** média quadrática da regressão.

Os resultados da ANOVA mostraram que o modelo quadrático ajustado não apresenta falta de ajuste significativo e, portanto, explica com razoável fidelidade os dados experimentais. Este fato fica comprovado mediante o teste F envolvendo esta fonte de variação, uma vez que não existe nenhuma evidência de falta de ajuste, no nível de 95 % de confiança ($p > 0,05$). Além disso, o modelo quadrático ajustado

explica 98,60 % da variação em torno da média, dos 99,95 % de variação explicáveis.

Os resultados também mostraram que a variação em torno da média devido aos parâmetros da regressão foi significativa, verificada mediante o teste F , a um nível de confiança de 99,99 %, uma vez que esta fonte de variação apresentou um valor de p de 0,0001.

A regressão mostrou-se válida para fins preditivos, uma vez que o coeficiente de determinação foi 98,60 % e a razão $F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$ foi maior que 10 (70,20/3,45 \approx 20,34).

Diante da adequação, o modelo quadrático ajustado (Equação 7) foi utilizado para a construção do gráfico da superfície de resposta para o rendimento de 5-CQA em função das variáveis % de etanol no solvente extrator e temperatura de extração (**Figura 12**).

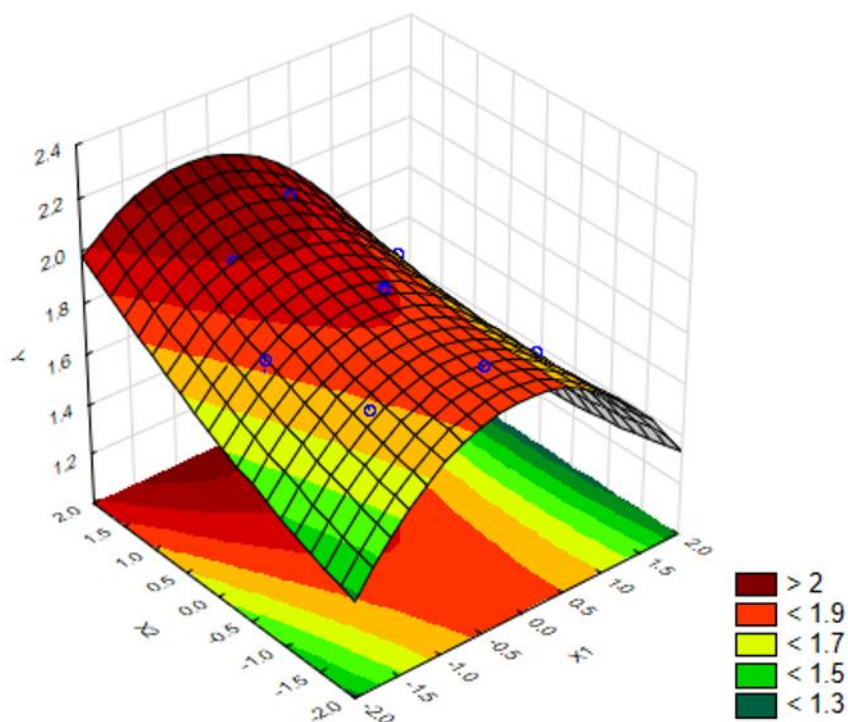


Figura 12: Superfície de resposta do modelo quadrático ajustado mostrando os efeitos do % de etanol no solvente extrator (x_1) e da temperatura de extração (x_2) sobre o rendimento de extração do 5-CQA (y_1).

A localização do ponto ótimo (maior rendimento de 5-CQA) é obtida avaliando os coeficientes quadráticos do modelo ajustado (**Tabela XII**). Como o coeficiente quadrático b_{11} , % de etanol, foi negativo e b_{22} , temperatura, não apresentou

significância estatística, a superfície gerada pelo modelo não possui um ponto estacionário, ou seja, um ponto onde ambas as derivadas parciais sejam nulas:

$$\frac{\partial \hat{y}}{\partial x_1} = \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_2} = 0 \quad (\text{Equação 8})$$

O procedimento recomendado no caso da variável temperatura, é o deslocamento no intervalo estudado até uma região onde a superfície apresente curvatura. Entretanto, devido às limitações experimentais, visto que o banho de ultrassom alcançava a temperatura máxima de 60 °C, definiu-se como temperatura ideal 59 °C (+1,41 em valor codificado), uma vez que o coeficiente linear relacionado ao parâmetro temperatura era positivo (**Tabela XII**).

Com relação ao percentual de etanol, verificou-se o valor que maximiza a resposta, a uma temperatura de 59 °C, derivando-se parcialmente a função do modelo em relação a essa variável:

$$\frac{\partial \hat{y}}{\partial x_1} = -0,09 - 0,24x_1 - 0,04x_2 \quad (\text{Equação 9})$$

Substituindo o valor de x_2 por 1,41, temos que $x_1 = -0,61$ (37,8 % em valor decodificado), ou seja, etanol a 37,8 % é o valor ótimo para obtenção do 5-CQA. Desta forma, as condições definidas para a obtenção do maior rendimento extrativo de 5-CQA na *silverskin* foram: volume de solvente = 10 mL; % de etanol no solvente extrator = 37,8; temperatura = 59 °C e tempo de extração = 7 minutos.

Substituindo os valores ótimos das variáveis independentes no modelo ajustado, obtém-se o rendimento estimado de 5-CQA: 2,07 mg g⁻¹. A validação do modelo preditivo de extração foi realizada comparando-se os rendimentos do 5-CQA, obtidos experimentalmente (n=3), e o estimado pelo modelo. O resultado experimental, 2,04 (±0,02) mg g⁻¹ de *silverskin*, não difere significativamente do valor predito, a um nível de confiança de 95 %, resultado que validou o modelo preditivo.

B) Ajuste da equação de regressão e interpretação do modelo de superfície de resposta para o rendimento da CAF

O modelo quadrático (Equação 3) foi aplicado ao conjunto de dados referentes ao rendimento experimental de CAF (**Tabela XI**). A **Tabela XIV** apresenta os resultados da análise do modelo.

Tabela XIV: Resultados da análise do modelo quadrático para CAF.

	Coefficientes	Erro	t_{calculado}	p
b_0	6,147	± 0,0145	423	0,00001
b_1	0,056	± 0,0089	6,302	0,02427
b_2	0,136	± 0,0089	15,27	0,00426
b_{11}	-0,204	± 0,0106	19,2	0,00270
b_{22}	0,012	± 0,0106	1,139	0,37279
b_{12}	0,03	± 0,0126	2,384	0,13993

Os coeficientes (b) foram calculados pelo método de mínimos quadrados. A significância de cada coeficiente foi determinada pelo teste t de Student.

Verificou-se a significância estatística, a um nível de 95 % de confiança ($p < 0,05$), dos coeficientes b_0 , b_1 , b_2 e b_{11} . Os três ensaios repetidos no ponto central foram utilizados para calcular $s^2 = 0,00063$. Os valores de b foram utilizados para obter a equação de regressão ajustada, que explica a variação do rendimento de CAF em função das variáveis independentes:

$$\hat{y} = 6,15 + 0,06x_1 + 0,14x_2 - 0,20x_1^2 \quad (\text{Equação 10})$$

O gráfico da **Figura 13** apresenta a relação entre os valores experimentais (y_2) versus valores preditos pela equação de regressão ajustada (\hat{y}_2) para a CAF.

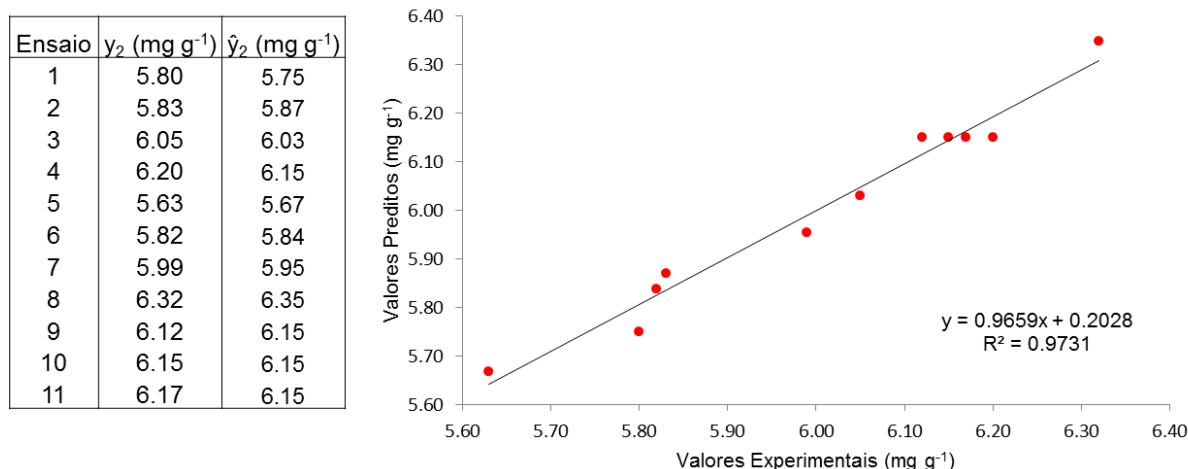


Figura 13: Gráfico dos valores experimentais (y_2) versus preditos pelo modelo quadrático ajustado (\hat{y}_2) para a CAF.

A proximidade dos resultados à reta identidade indicou concordância entre as respostas estimadas pelo modelo e as observadas experimentalmente.

O modelo quadrático ajustado apresentou-se adequado, de acordo com os resultados obtidos na ANOVA (**Tabela XV**).

Tabela XV: Análise de variância para o modelo quadrático ajustado.

Fonte de variação	SQ	Nº de g. l.	MQ	$F_{calculado}$	p
Regressão	0,4413	5	0,0883	62,3269	0,00017
Resíduos	0,0071	5	0,0014		
Falta de Ajuste	0,0058	3	0,0019	3,0602	0,2559
Erro Puro	0,0013	2	0,0006		
Total	0,4484	10			
% Variação Explicada: 98,42					
% Máxima Variação Explicável: 99,71					

SQ: soma quadrática da regressão; **MQ**: média quadrática da regressão,

Os resultados da ANOVA demonstraram que o modelo quadrático ajustado não apresenta falta de ajuste. Este fato fica comprovado mediante o teste F envolvendo esta fonte de variação, uma vez que não existe nenhuma evidência de falta de ajuste, no nível de 95 % de confiança ($p > 0,05$). Além disso, o modelo quadrático ajustado explica 98,42 % da variação em torno da média, dos 99,71 % de variação explicável.

Os resultados também demonstraram que a variação em torno da média foi significativa, verificada mediante o teste F , à um nível de confiança de 99,99 %, uma vez que esta fonte de variação apresentou um valor de p de 0,0001.

A regressão mostrou-se válida para fins preditivos, uma vez que o coeficiente de determinação foi de 98,42 % e a razão $F_{calculado}/F_{tabelado}$ foi maior que 10 ($62,33/3,45 \approx 18,06$).

Diante da adequação, o modelo quadrático ajustado (Equação 10) foi utilizado para a construção do gráfico da superfície de resposta para o rendimento de CAF em função das variáveis % de etanol no solvente extrator e temperatura de extração (**Figura 14**).

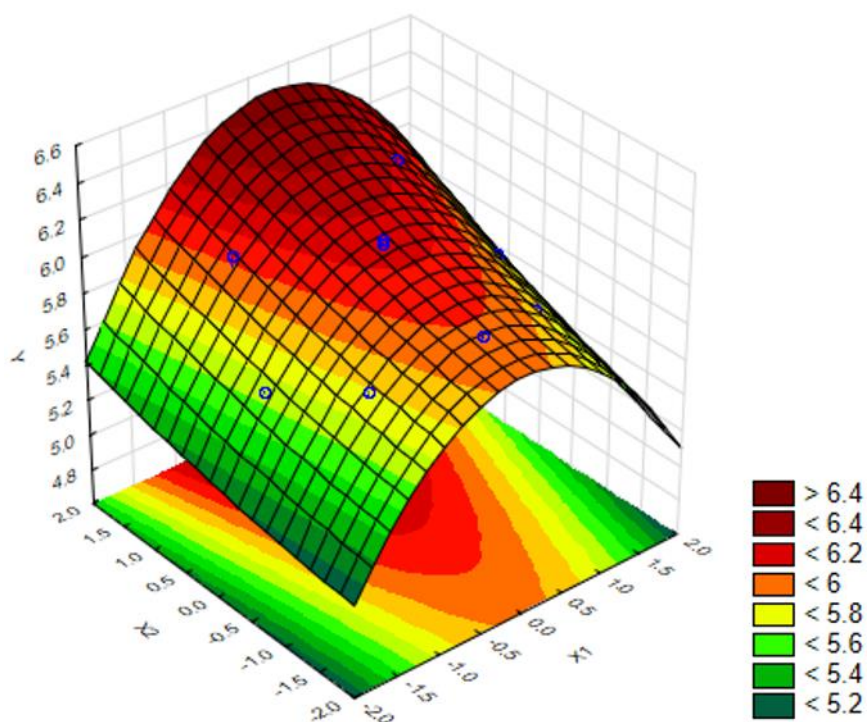


Figura 14: Superfície de resposta do modelo quadrático ajustado mostrando os efeitos do % de etanol no solvente extrator (x_1) e da temperatura de extração (x_2) sobre o rendimento de extração da CAF (y_2).

Novamente, o coeficiente quadrático do modelo ajustado para o % de etanol (b_{11}) foi negativo e para a temperatura (b_{22}) foi não significativo (**Tabela XIV**). Logo, a superfície gerada pelo modelo não apresenta um ponto estacionário. Em consequência disto, optou-se por realizar a extração à 59 °C (+1,41 em valor codificado), uma vez que o coeficiente linear relacionado a esse parâmetro é positivo.

Com relação a variável % de etanol, verificou-se o valor que maximiza a resposta a uma temperatura de 59 °C derivando parcialmente a função do modelo em relação a essa variável:

$$\frac{\partial \hat{y}}{\partial x_1} = 0,06 - 0,40x_1 \quad (\text{Equação 11})$$

Igualando a derivada a zero e isolando a variável independente x_1 , temos que $x_1 = 0,15$ (53 % em valor decodificado). Desta forma, as condições para a extração da *silverskin* com o maior rendimento em CAF, foram: volume de solvente = 10 mL; % de etanol no solvente extrator = 53; temperatura = 59 °C e tempo de extração = 7 minutos.

O rendimento estimado em CAF para a condição otimizada foi 6,33 mg g⁻¹ de *silverskin*. O resultado experimental, 6,29 (±0,08) mg g⁻¹, não difere significativamente do valor predito, a um nível de confiança de 95 %, resultado que validou o modelo preditivo.

4.2.3. Otimização de múltiplas variáveis resposta

Uma vez que os valores ótimos para a variável % de etanol no solvente extrator não foram os mesmos para a extração de 5-CQA (37,8 %) e CAF (53%), adotou-se a abordagem de otimização simultânea das variáveis respostas. O procedimento consiste na combinação das diversas respostas em uma única resposta composta. A utilização desta ferramenta requer a definição do intervalo de especificação, do nível de importância relativa e do peso, para cada uma das variáveis resposta.¹⁵⁵

Diante da atividade antioxidante apresentada, tanto pelo 5-CQA, quanto pela CAF,⁶³ definiu-se que as duas variáveis resposta eram igualmente importantes, atribuindo-lhes assim, igual peso, limites de especificações para os níveis e importância. Definido o critério (igualdade de importância das variáveis resposta no processo de extração) e por se tratarem de apenas duas respostas, a resposta combinada foi a média aritmética dos valores ótimos para a variável independente cujos valores não coincidiam (x_1):

$$x_1\text{médio} = \frac{x_1a + x_1b}{2} \quad (\text{Equação 12})$$

$$x_1\text{médio} = \frac{-0,61 + 0,15}{2} = -0,46 \text{ (45 \% em valor decodificado).}$$

onde:

x_1a é o valor ótimo para 5-CQA x_1b é o valor ótimo para CAF

Os valores ótimos para as variáveis independentes na condição de otimização simultânea foram: volume de solvente = 10 mL; % de etanol no solvente extrator = 45; temperatura = 59 °C e tempo de extração = 7 minutos.

Os valores das variáveis independentes foram aplicados aos modelos quadráticos ajustados, obtendo-se rendimentos estimados de 5-CQA e CAF respectivamente de 2,03 e 6,29 mg g⁻¹. Enquanto os rendimentos obtidos nas extrações para a validação do modelo foram 2,00 (± 0,018) mg g⁻¹ para o 5-CQA e 6,26 (± 0,199) mg g⁻¹ para a CAF (n=3), resultados que não diferem significativamente dos valores preditos, em um nível de confiança de 95 %, validando o modelo preditivo. Desta forma, chegou-se a uma condição experimental que, dentro das condições avaliadas, propiciou o maior rendimento no processo de extração do 5-CQA e CAF da *silverskin*, simultaneamente.

A UAE possui eficiência reconhecida no âmbito das extrações de produtos naturais, sendo capaz de alcançar os objetivos de diminuição do uso de solventes e consumo de energia, refletindo na redução do impacto ambiental.¹³¹ Contudo, o planejamento de experimentos, visando a otimização do processo de extração, mostra-se imprescindível para alcançar resultados satisfatórios.⁴⁴ Os resultados obtidos ao longo do presente estudo, demonstraram que mudanças na temperatura e nas proporções do solvente extrator, levaram a aumentos no rendimento de extração em cerca de 25 % para o 5-CQA e 11 % para a CAF. Além disso, o planejamento de experimentos proporcionou a utilização das variáveis não significativas aos processos nos seus níveis mais baixos: tempo de extração (7 minutos) e razão amostra-solvente 1/20 (10 mL). Aliou-se assim, o maior rendimento de extração dos compostos alvo, ao menor consumo de solvente, energia e tempo de trabalho.

É importante salientar que o modelo de regressão ajustado obtido no estudo, representando a variação dos rendimentos de 5-CQA e CAF no processo de extração por UAE, mostrou-se preditivo, ou seja, é possível aplicá-lo a novas situações experimentais, dentro dos limites estudados. Contudo, estes modelos não preveem situações fora dos limites experimentais avaliados.

Em decorrência da elevação da temperatura do sistema, os rendimentos de CAF e 5-CQA aumentaram, continuamente, até 59 °C (temperatura limite estudada). No entanto, não foi possível definir a condição ótima para esta variável, devido às limitações de configuração do banho de ultrassom. Em temperaturas superiores ao limite estudado, o comportamento térmico dos dois compostos diferencia-se. A CAF é extremamente estável termicamente, enquanto o 5-CQA, é termossensível.⁶³ A

degradação do 5-CQA se inicia, lentamente, próximo aos 40 °C, aumenta rapidamente entre 80 e 100 °C e, em temperaturas próximas a 220 °C, o composto encontra-se completamente degradado.^{126,127,128} Em consequência desta diferença na estabilidade térmica, não é possível inferir o quanto a limitação instrumental possa ter limitado o rendimento da extração simultânea dos compostos.

A utilização de etanol, água e a mistura dos dois solventes na extração de compostos bioativos é frequente, devido à baixa toxicidade em humanos e à aceitação dos produtos por parte dos consumidores.¹⁷³ A mistura dos solventes apresenta a vantagem de poder modular a polaridade, ou constante dielétrica, da solução extrativa.^{173,174} Diversos estudos aplicaram a mistura etanol-água, em diferentes proporções, na extração de ácidos clorogênicos^{25,26,27} e cafeína^{46,136} de alimentos e/ou resíduos de alimentos. No presente estudo, a mistura foi utilizada em diversas proporções (22:78 a 78:22), abrangendo uma ampla gama de polaridades, o que propiciou avaliar o comportamento dos compostos alvo frente às mudanças na composição do solvente extrator.

A solubilidade dos compostos de matrizes vegetais nos processos de extração é governada por fatores como polaridade do solvente usado e natureza dos compostos alvo, mas também, pela interação dos compostos com os outros constituintes da matriz complexa.¹⁷⁵ Desta forma, a diferença observada entre os valores ótimos da variável % de etanol no solvente extrator para os compostos alvo do estudo, pode ser creditada a este conjunto de fatores.

As técnicas de extração convencionais (extração por solvente) foram as mais aplicadas à *silverskin*.^{20,22,24-27,37,40,41,42,85} Nos processos tradicionais, a eficiência da extração baseia-se no poder de extração do solvente e na aplicação de aquecimento e/ou agitação.¹⁷⁶

Regazzoni *et al.*²² utilizaram a extração sólido-líquido na preparação de extratos hidroalcoólicos de *silverskin* da espécie Arábica. As concentrações de CAF e 5-CQA foram respectivamente 13,6 e 11,7 mg g⁻¹ de *silverskin*. Jimenez-Zamora *et al.*²⁰ determinaram teores de 2,2 mg g⁻¹ de *silverskin* para o 5-CQA, utilizando resíduo da mesma espécie de café e aplicando os mesmos métodos de extração e análise. O teor de 5-CQA reportado por Jimenez-Zamora *et al.*²⁰ é muito inferior ao encontrado por Regazzoni *et al.*²² No entanto, é mais próximo dos citados na literatura para a matriz^{21,42} e também, do encontrado no presente estudo.

Panusa *et al.*⁴² utilizaram a extração sólido-líquido na preparação de extratos aquosos de *silverskin* (Arábica e Robusta). O teor de CAF foi praticamente o mesmo nos dois tipos de extratos, 3,7 mg g⁻¹ de *silverskin*. No entanto, o total de CGAs foi superior no extrato de Robusta, 1,24 mg g⁻¹ de *silverskin*, quando comparado ao de Arábica, 0,26 mg g⁻¹. A semelhança entre os teores de CAF nas duas espécies de *silverskin* foi confirmada por Toschi *et al.*³⁷ que determinou valores entre 7,7 e 10,03 mg g⁻¹ de *silverskin* nos extratos aquosos, obtidos por extração sólido-líquido.

Bresciane *et al.*²¹ utilizaram a UAE em conjunto com a extração sólido-líquido para a extração dos compostos bioativos da *silverskin* (Arábica). Os extratos aquosos apresentaram teores de 5-CQA e CAF de respectivamente 1,99 e 10 mg g⁻¹ de *silverskin*. Narita *et al.*²³ utilizaram a PLE, associada à análise univariada de dados, para a obtenção de extratos bioativos de *silverskin*. O resíduo era proveniente da mistura das duas espécies de café. O extrato com maior atividade antioxidante apresentou teor de CAF de 4 mg g⁻¹ de *silverskin* e não continha 5-CQA.

Estudos incluindo a avaliação dos parâmetros de extração para a produção de extratos de *silverskin* são escassos. Além do trabalho desenvolvido por Narita *et al.*²³ outros dois estudos,^{25,26} utilizaram a extração sólido-líquido e a análise univariada de dados para a obtenção de extratos. Em ambos os casos, a variável resposta foi o teor de polifenóis totais nos extratos gerados.

A seleção da estratégia de extração dos compostos em matrizes vegetais depende do propósito do estudo.¹⁷⁵ Pesquisas têm demonstrado quantidades significativas de 5-CQA e da CAF no resíduo do processo de produção do café - *silverskin*.^{20,21,22,42} Devido à pronunciada capacidade antioxidante destes compostos,^{75,83} é possível considerá-los marcadores da eficiência de processos extrativos, que visem a obtenção de extratos com elevada atividade antioxidante.

A comparação da eficiência da metodologia desenvolvida no presente estudo, em termos de rendimento de extração do 5-CQA e CAF, com as técnicas convencionais descritas pela literatura, demonstra que os rendimentos obtidos utilizando UAE, associada ao planejamento de experimentos, foram superiores ou muito próximos, para ambos os compostos.^{20,37,42} Exceção ao estudo conduzido por Regazzoni *et al.*²² que encontrou concentrações muito superiores aos demais trabalhos. A comparação dos resultados com os obtidos por técnicas não

convencionais de extração, demonstra que o rendimento de CAF na metodologia desenvolvida foi superior ao obtido por PLE (4 mg g^{-1}),²³ contudo, inferior ao obtido por UAE (10 mg g^{-1}).²¹ Além disso, o rendimento de 5-CQA do presente estudo foi semelhante ao obtido por UAE ($1,99 \text{ mg g}^{-1}$),²¹ sem avaliação dos parâmetros de extração.

4.3. Comparação entre os métodos de extração dos compostos alvo: UAE e extração convencional

As extrações sólido-líquido tiveram como objetivo a comparação da eficiência de extração dos compostos 5-QCA e CAF com a UAE. Os rendimentos para as extrações (mg g^{-1} de resíduo) foram: extração sólido-líquido ($2,04 \pm 0,03$ e $7,37 \pm 0,22$) e extração assistida por ultrassom ($2,00 \pm 0,02$ e $6,26 \pm 0,20$), para respectivamente 5-CQA e CAF.

O rendimento obtido pela UAE para a extração do 5-CQA foi muito próximo da extração convencional. A metodologia utilizada para a extração sólido-líquido do composto pode ser considerada exaustiva, uma vez que foram realizadas extrações sequenciais, nas quais o 5-CQA foi monitorado por HPLC-DAD em todas as frações geradas (*seção 3.7 da Parte Experimental*). A etapa final foi considerada aquela na qual o pico do composto não mais foi detectado. O processo de extração durou 6 horas, gerou 12 frações e consumiu 600 mL g^{-1} de solvente.

O rendimento obtido pela UAE na extração de CAF foi cerca de 10 % inferior à extração convencional. O tempo total do procedimento convencional foi 15 horas e o consumo de solvente foi 50 mL g^{-1} de *silverskin*. Apesar do rendimento inferior, o método desenvolvido para a extração por UAE apresenta vantagens em relação à extração convencional empregada, como menor consumo de solvente e tempo trabalho. Além disso, a metodologia convencional utilizou metanol como solvente extrator, considerado tóxico para humanos.¹⁷³

4.4. Caracterização do extrato utilizando LC/MSⁿ

O extrato hidroetanólico de *silverskin*, obtido por UAE, foi caracterizado por LC/MSⁿ. A identificação positiva de 4 compostos ocorreu por meio de padrões analíticos, enquanto 9 identificações tentativas foram feitas com base nos resultados

cromatográficos e na comparação do padrão de fragmentação dos analitos no MSⁿ com dados da literatura.¹⁶⁵

A **Figura 15** apresenta dois cromatogramas do extrato, obtidos por HPLC-DAD, processados em 325 nm (máximo de absorção do 5-CQA) e 272 nm (máximo de absorção da CAF).

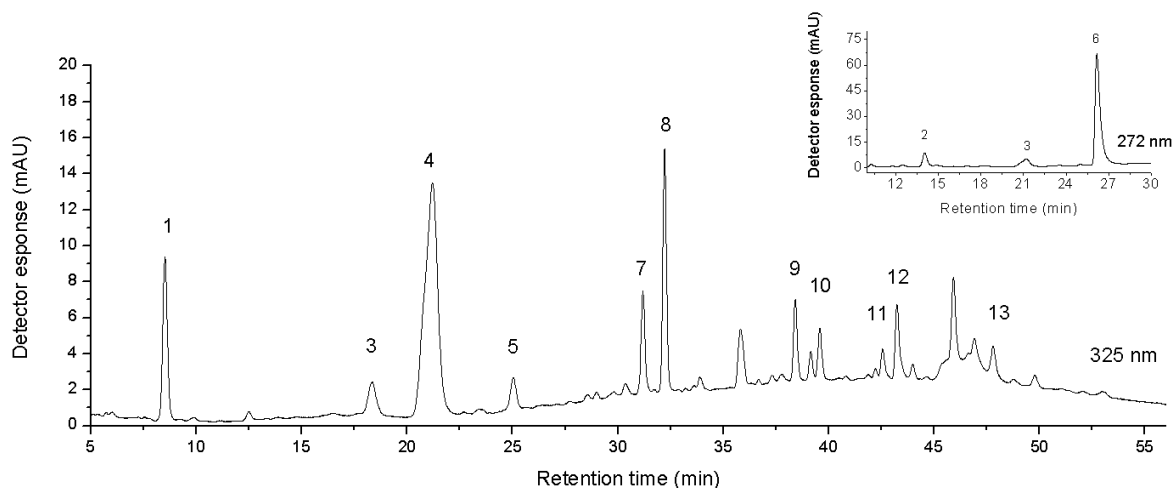


Figura 15: Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (processados em 325 e 272 nm) do extrato hidroetanólico de *silverskin*. Condições cromatográficas descritas na seção 3.4 da Parte Experimental. A identificação dos picos está apresentada na Tabela XVI.

O método cromatográfico utilizado para a análise dos extratos,¹⁵⁹ promoveu separação aceitável dos componentes da amostra, como pode ser visualizado nos cromatogramas da **Figura 15**.

Os picos cromatográficos numerados como 2, 4, 5 e 6 (**Figura 15**), foram identificados pelo uso de padrões analíticos e correspondem respectivamente aos compostos teofilina, 5-CQA, ácido cafeico e CAF. A **Tabela XVI** apresenta os resultados cromatográficos e espectrométricos dos compostos identificados positiva e tentativamente no extrato.

Os picos: 1, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13, do cromatograma (**Figura 15**), foram tentativamente identificados como CGAs. Os detalhes sobre a identificação destes compostos serão apresentados a seguir.

Tabela XVI: Compostos identificados positivamente e tentativamente no extrato hidroetanólico de *silverskin* obtido por UAE.

Pico	t _R (min.)	Composto	Abreviatura	λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmentos (m/z)
1	8,51	ácido 3-cafeoilquínico	3-CQA	325	353	191 , 135
2	14,0	teofilina	—	271	181*	163 , 124
3	18,3	ácido 3-feruloilquínico	3-FQA	325	367	193
4	21,2	ácido 5-cafeoilquínico	5-CQA	325	353	191 , 179, 161
5	25,0	ácido cafeico	—	319	179	-
6	26,1	cafeína	CAF	272	195*	138
7	31,1	ácido 4-feruloilquínico	4-FQA	321	367	173
8	32,2	ácido 5-feruloilquínico	5-FQA	325	367	191
9	38,4	ácido 3,4-dicafeoilquínico	3,4-diCQA	321	515	353 , 173
10	39,1	ácido 3,5-dicafeoilquínico	3,5-diCQA	319	515	353 , 191
11	42,5	ácido 3-cafeoil-4-feruloilquinico	3C,4FQA	318	529	367 , 349, 335
12	43,2	ácido 4,5-dicafeoilquínico	4,5-diCQA	325	515	353 , 173, 179
13	47,8	ácido 4-cafeoil-5-feruloilquínico	4C,5FQA	319	529	367, 353 , 173

* [M-H]⁺ (m/z). Em negrito: pico-base. *Condições cromatográficas descritas na seção 3.4 da Parte Experimental.*

4.4.1. Identificação dos isômeros do ácido cafeoilquínico

O pico 1 do cromatograma (**Figura 15**), gerou no MS¹ o íon desprotonado de m/z 353 (**Figura 16A1**), típico dos ácidos cafeoilquínicos (CQA).⁶³ A fragmentação deste íon no MS², gerou os fragmentos de m/z 191 e 135 (**Figura 16A2**). Devido a este padrão de fragmentação, o composto foi tentativamente identificado como o isômero 3-CQA. Os fragmentos de m/z 191 e 135 correspondem respectivamente as estruturas [ácido quínico-H⁺] e [ácido cafeico-CO₂-H⁺].¹⁶⁵ Desta forma, dois isômeros CQA foram identificados na amostra, o 5-CQA, identificado pelo uso de padrão analítico, e o 3-CQA, tentativamente identificado.

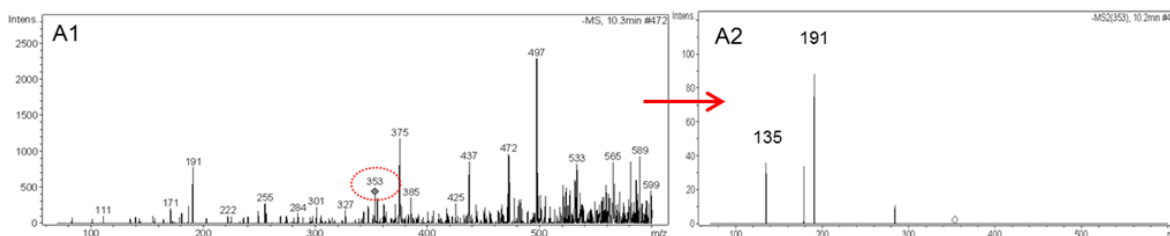


Figura 16: Espectro de massas do composto tentativamente identificado como **3-CQA**. Em **A1**: íon desprotonado m/z 353 e **A2**: seus fragmentos característicos.

4.4.2. Identificação dos isômeros do ácido feruloilquínico

Os três picos: 3, 7, e 8 (**Figura 15**), geraram no MS¹ o íon desprotonado de m/z 367, que podem ser visualizados na **Figura 17**, respectivamente regiões **A1**, **B1** e **C1**. Este íon é característico dos ácidos feruloilquínicos (FQA), uma subclasse dos CGAs. Existem 3 isômeros FQA: 3-FQA, 4-FQA e 5-FQA e a fragmentação no MS² permite diferenciá-los.¹⁶⁵

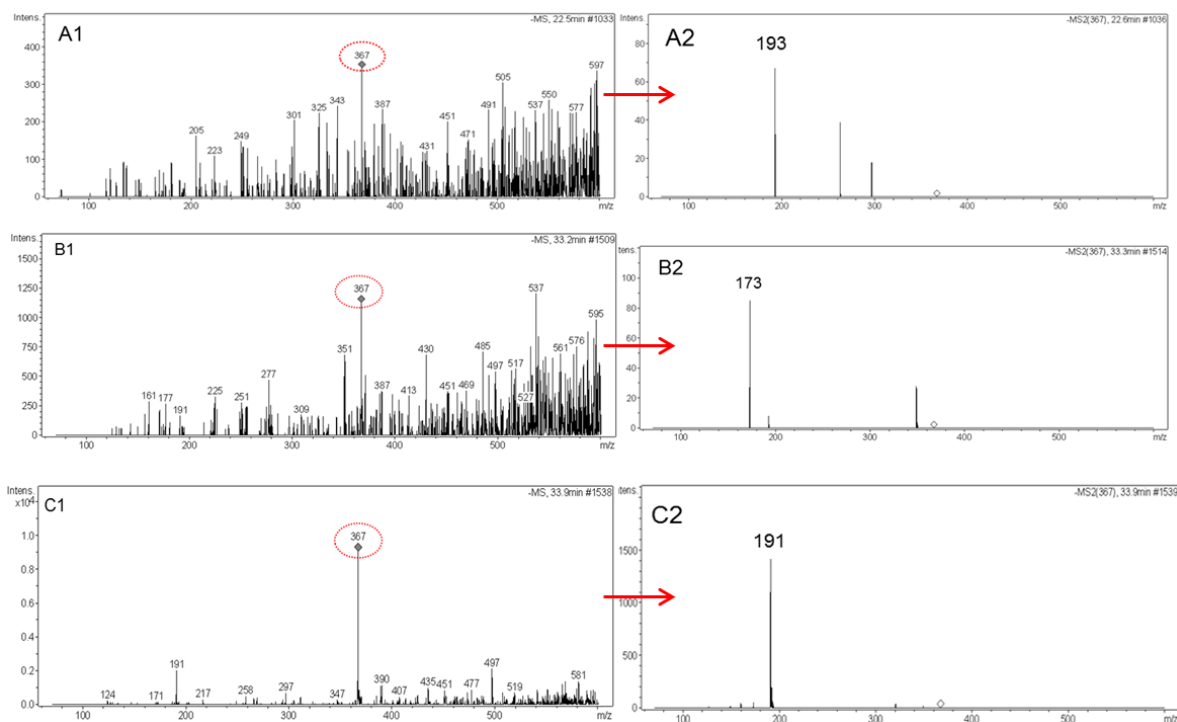


Figura 17: Espectros de massas dos compostos tentativamente identificados como isômeros do ácido feruloilquínico. Em **A1**: íon desprotonado de m/z 367 e **A2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **3-FQA**. Em **B1**: íon desprotonado de m/z 367 e **B2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **4-FQA**. Em **C1**: íon desprotonado de m/z 367 e **C2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **5-FQA**.

No caso do pico 3, o íon desprotonado de m/z 367 gerou no MS² o fragmento majoritário de m/z 193 (**Figura 17A2**). Esta é a fragmentação característica do composto 3-FQA e o m/z 193, corresponde a estrutura [ácido ferúlico-H⁺]⁻.¹⁶⁵ Para o pico 7, o m/z 367 gerou no MS² o fragmento majoritário de m/z 173 (**Figura 17B2**). Este é o padrão de fragmentação do 4-FQA e o m/z 173, correspondente à estrutura [ácido quínico-H₂O-H⁺]⁻.¹⁶⁵ O pico 8 foi identificado como sendo o composto 5-FQA, devido à fragmentação no MS² do íon de m/z 367 ter gerado o fragmento majoritário de m/z 191 (**Figura 17C2**). O fragmento de m/z 191 corresponde ao [ácido quínico-H⁺]⁻.¹⁶⁵

4.4.3. Identificação dos isômeros do ácido dicafeoilquínico

Os três picos: 9, 10 e 12 (**Figura 15**) geraram no MS¹ o íon desprotonado de m/z 515, que podem ser visualizados na **Figura 18**, respectivamente regiões **A1**, **B1** e **C1**. Este íon é característico dos ácidos dicafeoilquínicos (diCQA),¹⁶⁵ outra

subclasse dos CGAs. Os três isômeros diCQA são: 3,4-diCQA, 3,5-diCQA e 4,5-diCQA.⁷² Estes compostos são formados pela reação de esterificação entre um resíduo de ácido quínico e dois resíduos de ácido caféico.⁷² Como consequência, a fragmentação do m/z 515 gera, nos três casos, o fragmento majoritário de m/z 353, correspondente ao $[CQA-H^+]$. A fragmentação subsequente (MS^3) possibilita diferenciar os isômeros, da mesma forma como ocorre com os isômeros do CQA.¹⁶⁵

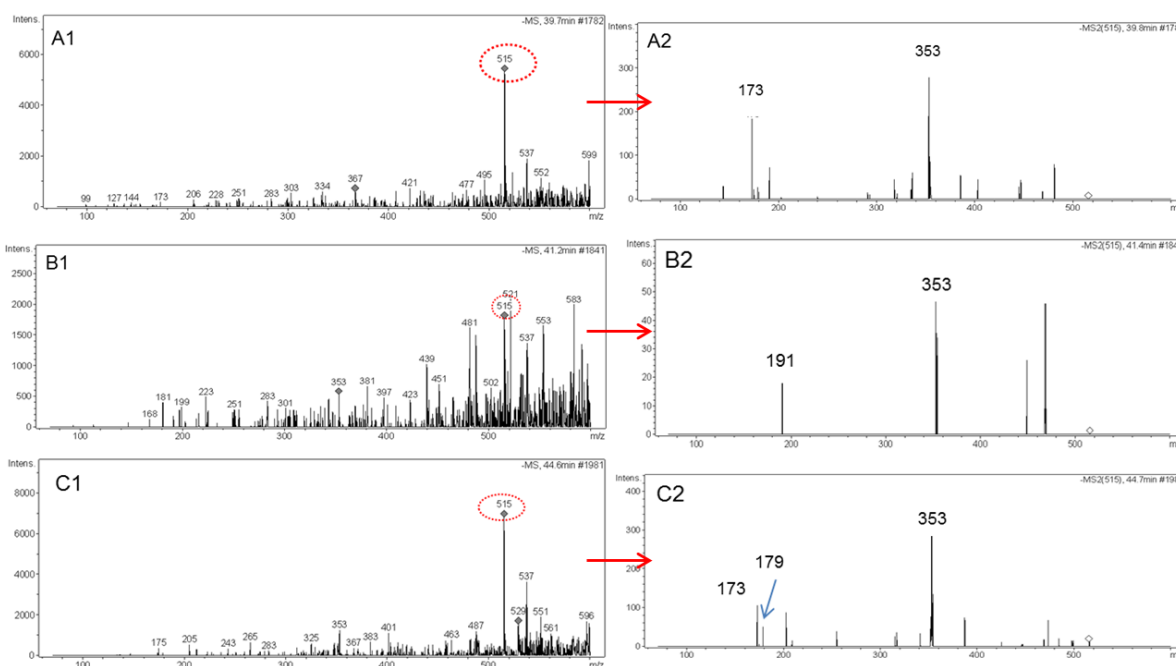


Figura 18: Espectros de massas dos compostos tentativamente identificados como isômeros do **diCQA**. Em **A1**: íon desprotonado de m/z 515 e **A2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **3,4-diCQA**. Em **B1**: íon desprotonado de m/z 515 e **B2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **3,5-diCQA**. Em **C1**: íon desprotonado de m/z 515 e **C2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **4,5-diCQA**.

No caso do pico 9, a fragmentação do íon de m/z 353 (MS^3), gerou o fragmento de m/z 173 (**Figura 18A2**). Segundo dados da literatura, este é o padrão de fragmentação do 3,4-diCQA e a estrutura de m/z 173, corresponde ao [ácido quínico- H_2O-H^+].¹⁶⁵ Para o pico 10, a fragmentação do íon de m/z 353 (MS^3), gerou o fragmento de m/z 191 (**Figura 18B2**). O isômero 3,5-diCQA apresenta este padrão de fragmentação e o fragmento de m/z 191 corresponde ao [ácido quínico- H^+].¹⁶⁵ O pico 12 foi identificado como sendo o isômero 4,5-diCQA, devido à fragmentação do íon de m/z 353 (MS^3) gerar dois íons: um de m/z 173, correspondendo ao [ácido

quínico- $\text{H}_2\text{O}-\text{H}^+$], e outro de m/z 179, correspondendo ao [ácido cafeico- H^+] (**Figura 18C2**).¹⁶⁵

4.4.4. Identificação dos isômeros do ácido cafeoilferuloilquínico

Os picos 11 e 13 (**Figura 15**) geraram no MS^1 o íon desprotonado de m/z 529, que podem ser visualizados na **Figura 19**, respectivamente regiões **A1** e **B1**. O íon é característico dos ácidos cafeoilferuloilquínicos (CFQA),¹⁶⁵ outra subclasse dos CGAs. Este grupo de isômeros é formado pela reação de esterificação entre os ácidos quínico, cafêico e ferúlico.⁷² Apesar da MS^1 idêntica para todos os isômeros, a diferença na natureza e intensidade dos íons gerados nas fragmentações subsequentes (MS^2 e MS^3) possibilita diferenciá-los.¹⁶⁵

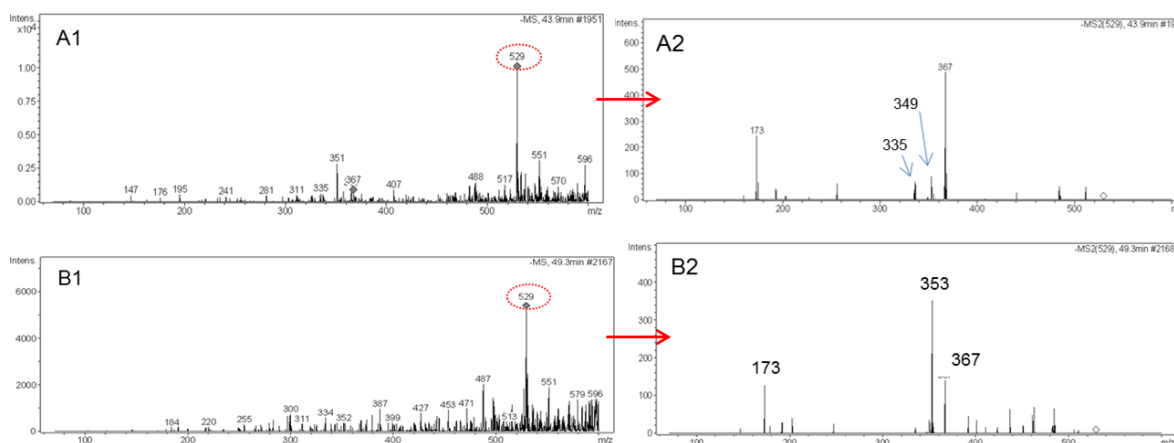


Figura 19: Espectros de massas dos compostos tentativamente identificados como isômeros do **CFQA**. Em **A1**: íon desprotonado de m/z 529 e **A2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **3C,4FQA**. Em **B1**: íon desprotonado de m/z 529 e **B2**: seus fragmentos característicos; composto identificado como **4C,5FQA**.

A fragmentação do íon desprotonado de m/z 529 (MS^2) no pico 11, gerou o fragmento majoritário de m/z 367 e dois fragmentos secundários, de m/z 349 (intensidade média) e 335 (intensidade baixa) (**Figura 19A2**). Com base na literatura, este é o padrão de fragmentação do 3C,4FQA e os fragmentos de m/z 367, 349 e 335, correspondem respectivamente às estruturas: $[\text{FQA}-\text{H}^+]$, $[\text{FQA}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}^+]$ e $[\text{CQA}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}^+]$.¹⁶⁵

No caso do pico 13, a fragmentação subsequente do íon de m/z 529 (MS^2), gerou o fragmento majoritário de m/z 353 e o íon secundário de m/z 367 (**Figura 19B2**). O MS^3 do íon de m/z 353 gerou o fragmento de m/z 173. De acordo com este

padrão de fragmentação, o composto foi identificado como o 4C,5FQA e os fragmentos de m/z 353, 367 e 173, correspondem respectivamente as estruturas: $[CQA-H^+]$, $[FQA-H^+]$ e $[\text{ácido quínico}-H_2O-H^+]$.¹⁶⁵

A técnica de LC/MSⁿ permitiu a identificação de 9 derivados clorogênicos no extrato hidroalcoólico de *silverskin*. Os ácidos cafeoilquínicos (CQA) são a principal subclasse de ácidos clorogênicos presentes no café.⁷² Dos três isômeros CQA, dois foram identificados no extrato: o 5-CQA e o 3-CQA. Os outros derivados clorogênicos identificados foram os três isômeros do ácido feruloilquínico (FQA), os três isômeros do ácido dicafeoilquínico (diCQA) e 2 dois isômeros do ácido cafeoilferuloilquínico (CFQA). Além disso, o extrato apresentou duas metilxantinas (cafeína e teofilina) e um ácido hidroxicinâmico (ácido cafeico).

A identificação positiva dos três isômeros CQA e diCQA em extratos hidroalcoólicos de *silverskin* foi descrita por Jimenez-Zamora *et al.*²⁰ A utilização de padrões analíticos na identificação dos CGAs é uma prática incomum, devido ao alto custo e pouca disponibilidade mesmos.

Regazzoni *et al.*²² utilizaram a cromatografia líquida acoplada ao *Íon Trap* (MSⁿ) para caracterizar os extratos hidroalcoólicos de *silverskin*. A aplicação da técnica permitiu a identificação tentativa dos três isômeros CQA e diCQA. Além disso, foi possível identificar algumas subclasses de compostos: *p*-CoQA, FQA e CFQA. Os extratos aquosos de *silverskin* foram caracterizados utilizando a mesma instrumentação.²¹ Os resultados mostraram um perfil semelhante ao do extrato hidroetanólico: três isômeros CQA, dois isômeros FQA e dois isômeros do ácido coumaroilquínico. Além disso, foi possível a identificação da cafeína e duas lactonas do ácido cafeoilquínico.

A utilização do analisador de massas do tipo *TOF* permitiu a identificação de uma maior diversidade de CGAs no extrato aquoso de *silverskin*.⁴² Contudo, os 18 CGAs citados como tentativamente identificados no estudo, foram identificados apenas pela sua subclasse. O resultado se deve às limitações instrumentais: o *TOF* fornece apenas o MS¹ dos compostos. Desta forma, foram identificados compostos das subclasses: FQA, diCQA, ácidos coumaroilquínicos, ácidos dimetoxicinâmicos, ácidos dimetoxicinamoilquínicos, cafeoil triptofanos e cumaroil triptofanos. O 4-CQA foi tentativamente identificado, enquanto a CAF, o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o 5-CQA, foram identificados por meio de padrões analíticos.

De maneira geral, os extratos hidroetanólicos obtidos no presente estudo, tiveram um perfil qualitativo semelhante ao dos extratos hidroalcoólico e aquoso descritos na literatura,^{20,21,22,42} marcado pela predominância dos CGAs, principalmente os CQA, diCQA e FQA, e a cafeína. Contudo, cabe salientar que a utilização do LC/MSⁿ permitiu a identificação, mesmo que tentativa, de um maior número de CGAs (não apenas pela subclasse), caso dos dois isômeros do ácido cafeoilferuloilquínico (3C,4FQA e 4C,5FQA), diferenciados pela primeira vez na matriz.

O perfil qualitativo do extrato de *silverskin*, obtido por UAE, apresenta semelhanças com o dos grãos de café torrados. Assim como o extrato, os grãos apresentam como principais CGAs os CQA, principalmente o 5-CQA, diCQA e FQA, e as metilxantinas, cafeína e teofilina.⁶³

4.5. Quantificação das metilxantinas, ácido cafeico e derivados clorogênicos no extrato utilizando HPLC-DAD

A técnica de HPLC-DAD foi utilizada para a quantificação dos compostos no extrato hidroetanólico obtido por UAE. Para tanto, duas abordagens foram utilizadas: (I) método da padronização externa, aplicado aos compostos: CAF, 5-CQA, teobromina, teofilina e ácido cafeico e (II) quantificação em termos de equivalentes do 5-CQA, aplicada aos CGAs tentativamente identificados no extrato: 3-CQA, 3-FQA, 4-FQA, 5-FQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA, 3C,4FQA e 4C,5FQA. A **Tabela XVII** apresenta os resultados obtidos para a quantificação dos compostos.

A CAF e o 5-CQA foram os compostos majoritários quantificados no extrato hidroetanólico. Dentre os derivados clorogênicos quantificados por equivalência, destacam-se, pelos teores, os 5-FQA e o 3-CQA. A metilxantina teobromina não foi identificada no extrato.

O total de CGAs, obtido pela soma das concentrações dos 9 derivados clorogênicos identificados no extrato, foi 4,44 mg g⁻¹ de *silverskin*. O teor de derivados clorogênicos totais é um parâmetro muito empregado na análise de produtos naturais, devido à associação destes compostos com atividades biológicas e pela indisponibilidade de padrões para quantificações individuais.⁶³

Tabela XVII: Compostos quantificados no extrato hidroetanólico de *silverskin* obtido por UAE.

Pico	t _R	Composto	Abreviatura	Concentração média (mg g ⁻¹)
1	8,51	Ácido 3-cafeoilquínico ^a	3-CQA	0,476 (±0,012)
2	14,04	Teofilina ^b	—	0,525 (±0,003)
3	18,33	Ácido 3-feruloilquínico ^a	3-FQA	0,192 (±0,014)
4	21,20	Ácido 5-cafeoilquínico ^b	5-CQA	2,000 (±0,018)
5	25,04	Ácido cafeico ^b	—	0,062 (±0,001)
6	26,16	Cafeína ^b	CAF	6,260 (±0,199)
7	31,18	Ácido 4-feruloilquínico ^a	4-FQA	0,290 (±0,012)
8	32,21	Ácido 5-feruloilquínico ^a	5-FQA	0,567 (±0,022)
9	38,41	Ácido 3,4-dicafeoilquínico ^a	3,4-diCQA	0,236 (±0,025)
10	39,14	Ácido 3,5-dicafeoilquínico ^a	3,5-diCQA	0,112 (±0,015)
11	42,55	Ácido 3-cafeoil-4-feruloilquínico ^a	3C,4FQA	0,131 (±0,021)
12	43,23	Ácido 4,5-dicafeoilquínico ^a	4,5-diCQA	0,260 (±0,027)
13	47,80	Ácido 4-cafeoil-5-feruloilquínico ^a	4C,5FQA	0,180 (±0,022)

^a composto quantificado como equivalente do 5-CQA
^b composto quantificado por de padronização externa

A quantificação por equivalentes de 5-CQA é uma abordagem utilizada na determinação de concentrações estimadas de CGAs.^{74,168} Ela relaciona compostos estruturalmente semelhantes, podendo ser aplicada tanto em quantificações empregando método espectrofotométrico, quanto por HPLC. A grande vantagem da metodologia é permitir uma boa estimativa das concentrações dos compostos individualmente, uma vez que os mesmos são quantificados em relação à curva de calibração de um padrão analítico com o qual possuem relação estrutural.

Os extratos hidroetanólicos de *silverskin* (Arábica) apresentaram teores de CGAs superiores ao do presente estudo. Em estudo utilizando padronização externa e HPLC-DAD, Jimenez-Zamora *et al.*²⁰ determinaram teores de CGAs de 9,1 mg g⁻¹ de *silverskin*. Os autores consideraram apenas os isômeros CQA e diCQA para o cálculo dos CGAs. Regazzoni *et al.*²² encontraram teores muito superiores de CGAs, 26 mg g⁻¹ de *silverskin*. Os autores utilizaram a padronização por equivalência, englobando 12 derivados clorogênicos, e análise por HPLC-DAD. Adicionalmente, os teores de outros compostos presentes no extrato, como o 5-CQA e a CAF (quantificados por padronização externa), também são superiores aos dados da

literatura para este tipo de matriz. Logo, a discrepância entre os resultados não pode ser atribuída à abordagem de quantificação dos CGA utilizada.

Os extratos aquosos de *silverskin* (Arábica), também apresentaram teores de CGAs superiores aos determinados no presente estudo. Iriundo *et al.*⁴⁰ utilizaram quantificação por equivalência e espectrofotometria no UV, para determinar teores de CGA de 6,9 mg g⁻¹ de *silverskin*. Bresciane *et al.*²¹ obtiveram teores de CGAs de 5,89 mg g⁻¹, utilizando quantificação por equivalência e análise por HPLC-DAD. No total, 9 compostos foram identificados como CGAs e quantificados em conjunto.

Os grãos de café da espécie Robusta possuem teores de CGAs superiores à Arábica.⁶³ Panusa *et al.*⁴² compararam a concentração destes compostos em extratos aquosos de *silverskin* das duas espécies de café. Os autores utilizaram a estratégia de quantificação por equivalência ao 5-CQA e HPLC-DAD. Os extratos de *silverskin* da espécie Robusta apresentaram concentração de CGAs superior à Arábica: 1,27 e 0,27 mg g⁻¹ de *silverskin*. No entanto, ambas foram inferiores as obtidas no presente estudo.

Diversos fatores podem ter contribuído para as diferenças observadas entre os teores de CGAs. Entre eles, fatores experimentais, como o método de quantificação dos compostos, ou relacionados à matéria-prima, como a espécie da planta utilizada no estudo. O resíduo utilizado no presente estudo era proveniente da mistura das duas espécies de café, o que prejudica, de certa forma, a comparação com estudos que utilizaram resíduos de uma única espécie.

A comparação entre os teores de CGAs do extrato desenvolvido e dos grãos de café torrados é difícil, devido à variabilidade na concentração dos grãos, resultado das diferenças entre as espécies e da degradação dos compostos ao longo do processo de produção. Grãos verdes da espécie Robusta possuem entre 7 e 14 % de CGAs, enquanto os da Arábica, entre 4 e 8 %. A torrefação diminui estes teores em 60-95 %.^{63,168} Desta forma, não existe um teor de CGAs nos grãos torrados aproximado o bastante para ser válida a comparação.

Contudo, é possível comparar os teores de CGAs do extrato desenvolvido com os dos grãos de café verde. O valor encontrado (0,44 %) representa, em média, 10 % da quantidade presente nos grãos verdes.

4.6. Capacidade antioxidante do extrato

4.6.1. Método DPPH

O método DPPH foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante do extrato obtido por UAE. Para tanto, diferentes diluições do extrato foram submetidas a reação com o radical. A identidade dos compostos responsáveis pela atividade foi investigada, por meio da avaliação da atividade dos padrões de 5-CQA e CAF. As diluições dos padrões utilizadas no ensaio tinham concentrações idênticas às dos compostos nas diluições do extrato bruto. Desta forma, além de investigar os responsáveis pela atividade, foi possível comparar a atividade do extrato com a dos padrões isolados.

A análise de regressão dos dados de concentração e seus respectivos percentuais de inibição sobre o DPPH (I %) forneceu equações, utilizadas para calcular os valores de concentração eficiente (EC_{50}), que corresponde à concentração de amostra capaz de provocar a perda de 50 % da absorvância do radical. As diluições, as concentrações, os percentuais de inibição, os coeficientes de correlação linear das equações (r^2) e os valores de EC_{50} obtidos no ensaio encontram-se dispostos na **Tabela XVIII**.

O extrato apresentou capacidade antioxidante superior a do padrão de 5-CQA. Por exemplo, o extrato 1 %, inibiu 45,16 % do radical, enquanto o padrão a 1 %, inibiu 31,61 %. É importante ressaltar que o padrão de 5-CQA 1 % possui a mesma concentração, em termos de 5-CQA, do extrato a 1 %. É provável que o resultado se deva à contribuição dos demais CGAs presentes na amostra, visto que a CAF não demonstrou sensibilidade ao método.

A atividade antioxidante dos CGAs está fortemente vinculada aos grupamentos hidroxila do anel aromático do ácido cafeico, aceptores de radicais livres. Como consequência, os derivados cafeoilquínicos, como o 5-CQA e o 3-CQA, presentes no extrato, seriam mais ativos que os derivados feruloilquínicos,⁷² pois possuem maior número destes grupamentos.

Tabela XVIII: Resultados do ensaio da capacidade antioxidante pelo método DPPH.

Amostra	Diluição (%)	Con. (mg L ⁻¹)	I %	r ²	EC ₅₀ (mg L ⁻¹)
Extrato	0,1	2,10	36,63	0.94	46,87
	1	20,96	45,16		
	5	104,82	69,94		
	7,5	157,23	71,14		
	10	209,64	82,28		
Solução de 5-CQA	0,1	0,04	30,28	0.95	4,13
	1	0,40	31,61		
	5	2,00	44,34		
	7,5	3,00	45,85		
	10	4,00	49,38		
Solução de CAF	0,1	0,13	—	—	—
	1	1,25	—		
	5	6,26	—		
	7,5	9,39	—		
	10	12,52	—		

Diferentes parâmetros são utilizados para expressar os resultados do ensaio do DPPH. A apresentação dos resultados mediante os valores de EC₅₀ é a indicada quando se deseja comparar a capacidade antioxidante de diferentes compostos ou extratos vegetais.¹⁷⁷ Regazzoni *et al.*²² obtiveram 11 µg mL⁻¹ como valor de EC₅₀ para o extrato hidroetanólico de *silverskin* utilizando a mesma metodologia. O resultado foi superior ao do presente estudo (46,87 mg L⁻¹), uma vez que quanto menor o valor de EC₅₀, maior a capacidade antioxidante da amostra.

Os resultados do ensaio também podem ser expressos por meio da comparação da capacidade antioxidante da amostra com padrões de referência, como o ácido ascórbico, tocoferol, trolox.¹⁷⁷ A escolha do padrão é arbitrária, porém comparações utilizando padrões de referência que possuam diferenças estruturais significativas às dos compostos antioxidantes presentes na amostra, podem gerar distorções nos resultados. No presente estudo, o 5-CQA foi utilizado como padrão de comparação da atividade do extrato, pois está presente na amostra e possui pronunciada atividade antioxidante. Desta forma, o EC₅₀ do extrato, em termos de atividade antioxidante equivalente ao 5-CQA, foi 11,29 µmoles L⁻¹, que corresponde a 25,25 µmoles g⁻¹ de *silverskin*.

Uma abordagem comum, e utilizada por alguns autores que trabalharam com extratos de *silverskin*,^{23,25,26,27,42} é expressar os resultados da capacidade antioxidante no ensaio do DPPH por meio da equivalência ao padrão trolox (AAET). A relação entre os resultados de EC₅₀ e AAET pode ser aproximada pela aplicação de cálculos matemáticos.¹⁷⁸ Desta forma, o valor de EC₅₀ obtido para o extrato desenvolvido no presente estudo foi aplicado à equação de conversão,¹⁷⁸ resultando em 24,9 µmol de trolox L⁻¹ de extrato (1252 µmol g⁻¹ ou 313 mg g⁻¹ de *silverskin*).

A AAET do extrato desenvolvido no presente estudo foi superior a dos extratos aquosos de *silverskin* produzidos por Panusa *et al.*⁴² e similar aqueles obtidos para os extratos hidroetanólicos.^{26,27} No entanto, foi inferior aos obtidos por Narita *et al.*²³ e Ballestros *et al.*²⁵ respectivamente para os extratos aquoso e hidroetanólico.

Comparando a capacidade antioxidante, avaliada pelo método DPPH, do extrato de *silverskin* desenvolvido no estudo, com outras fontes naturais de antioxidantes, verificou-se que o extrato apresenta atividade semelhante a apresentada por infusões de café¹⁷⁹ e extratos de óleo de oliva, cacau e alecrim.¹⁸⁰ Além disso, a atividade foi superior a demonstrada por extratos de resíduos da produção de cacau.¹⁸¹

O ensaio DPPH-HPLC-DAD apresentou concordância com os resultados espectrofotométricos. A **Figura 20** apresenta os cromatogramas das soluções dos padrões de CAF (**A**) e 5-CQA (**B**). Em vermelho, estão as soluções sem a adição de DPPH e em azul, as soluções que sofreram reação com o radical.

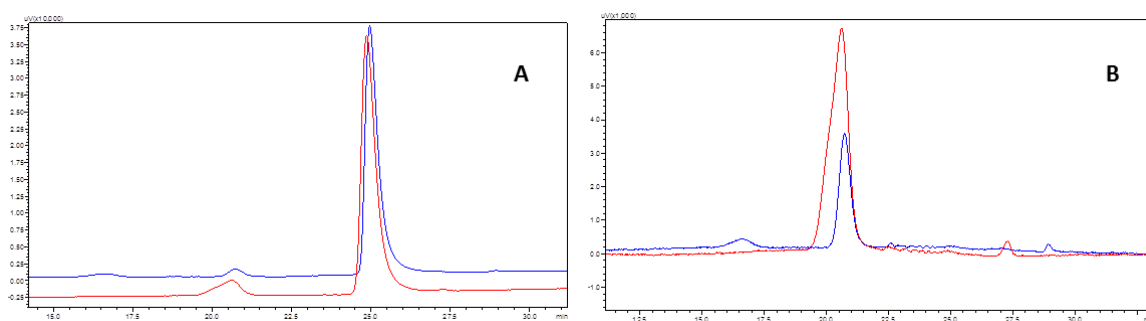


Figura 20: (A) Cromatogramas do padrão de CAF: em vermelho, solução do padrão sem adição de DPPH, em azul, após a reação com o radical. Ambos processados em 272 nm. (B) Cromatogramas do padrão de 5-CQA: em vermelho, solução do padrão sem adição de DPPH, em azul, após a reação com o radical. Ambos processados em 325 nm.

Como pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 20A**, não ocorreu alteração significativa da área do pico da CAF após a adição do radical. O resultado demonstra a falta de sensibilidade do composto para o método. A diminuição da área do pico do 5-CQA após a adição do DPPH (**Figura 20B**) confirma a reação do composto com o radical, evidenciando sua capacidade antioxidante.

O extrato hidroetanólico de *silverskin* demonstrou o mesmo comportamento antioxidante demonstrado pelos padrões. A **Figura 21** apresenta os cromatogramas da amostra, em vermelho, sem adição de DPPH, e em azul, após a adição do radical, processados nos $\lambda = 272$ nm (**A**) e $\lambda = 325$ nm (**B**).

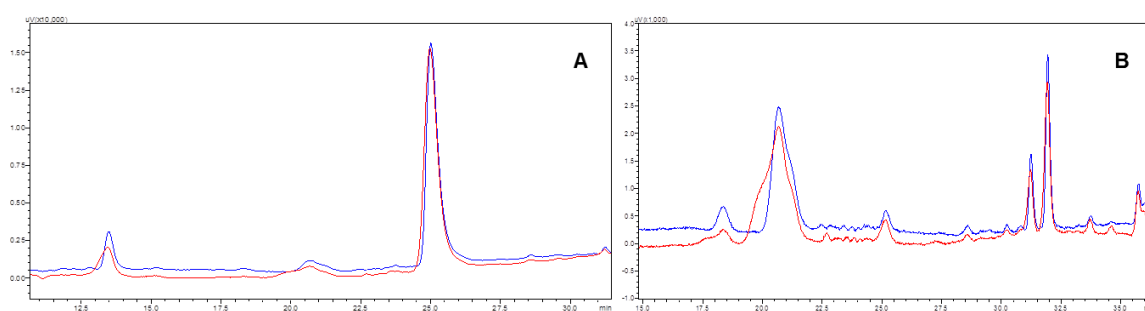


Figura 21: (A) Cromatogramas do extrato hidroetanólico de *silverskin*: em vermelho, sem adição do DPPH, em azul, após a reação com o radical. Ambos processados em 272 nm. (B) Cromatogramas do extrato hidroetanólico de *silverskin*: em vermelho, sem adição de DPPH, em azul, após a reação com o radical. Ambos processados em 325 nm.

A manutenção da área cromatográfica do pico da cafeína (**Figura 21A**) demonstrou a ausência de reação do composto com o radical. Contudo, a redução de cerca de 35 % da área do pico do 5-CQA após a adição do DPPH (**Figura 21B**) evidencia sua capacidade de sequestro do radical, traduzida em capacidade antioxidante.

4.6.2. Método FRAP

O método FRAP também foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante do extrato obtido por UAE. Por meio da utilização dos padrões de 5-CQA e CAF, foi investigada a identidade dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante demonstrada pelo extrato no ensaio. As diluições e concentração utilizadas, os valores de absorvância, as equações e seus respectivos coeficientes lineares (r^2) obtidos no ensaio, encontram-se dispostos na **Tabela XIX**.

Tabela XIX: Resultados do ensaio da capacidade antioxidante pelo método FRAP.

Amostra	Concentração (%)	Concentração (mg L ⁻¹)	Absorvância	Equação da reta	r ²
Extrato	0,1	2,1	0,077	$y = 0,0006x - 0,2007$	0.98
	1	20,96	0,220		
	5	104,82	0,398		
	75	1572,3	1,189		
	100	2096	1,550		
5-CQA	0,1	0,04	0,068	$y = 0,0051x - 0,0876$	0.98
	1	0,4	0,109		
	75	30	0,242		
	100	40	0,289		
CAF	0,1	0,13	—		
	1	1,25	—		
	75	93,75	—		
	100	125	—		

A absorvância relativa a 1000 µM do padrão de sulfato ferroso foi 0,5075. A concentração do extrato equivalente a 1000 µM de sulfato ferroso foi 511,33 mg L⁻¹ de extrato. A capacidade antioxidante avaliada pelo ensaio FRAP pode ser expressa de diferentes formas, ou seja, o resultado obtido equivale a 3054,18 µM de FeSO₄ L⁻¹ de extrato, 152,71 µM de FeSO₄ g⁻¹ de *silverskin*, 463,95 mg de FeSO₄ L⁻¹ de extrato ou 23,20 mg de FeSO₄ g⁻¹ de *silverskin*.

A capacidade antioxidante do extrato foi superior a do padrão de 5-CQA (569,45 µM de FeSO₄ L⁻¹). É provável que o resultado se deva à contribuição dos outros derivados clorogênicos presentes na amostra, visto que a CAF, de forma semelhante ao ocorrido no ensaio com o DPPH, não demonstrou sensibilidade ao método. Provavelmente, a falta de resposta da cafeína à metodologia se deva a ausência de grupos redutores de ferro na estrutura molecular.⁹⁸

O resultado da capacidade antioxidante do extrato, avaliada pelo método FRAP, foi superior as obtidas para os extratos aquosos de *silverskin*^{21,41} e na mesma ordem de grandeza do extrato hidroetanólico obtido por Rodrigues *et al.*²⁷ No entanto, foi inferior aos extratos hidroetanólicos desenvolvidos por Costa *et al.*²⁶ e Ballestros *et al.*²⁵

Cabe salientar que a capacidade antioxidante do extrato desenvolvido no presente estudo (3054,18 µM de FeSO₄ L⁻¹) foi semelhante à apresentada por alguns alimentos, reconhecidos como fontes de compostos antioxidantes, como o chocolate preto (182 µM de FeSO₄ g⁻¹), o orégano (104 µM de FeSO₄ g⁻¹), a páprica (167 µM de FeSO₄ g⁻¹) e a pimenta preta (144 µM de FeSO₄ g⁻¹), entre outros.¹⁸²

4.7. Toxicidade aguda do extrato frente à *Artemia salina* Leach

Para a realização do ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, o extrato hidroetanólico obtido por UAE foi seco e ressuspenso em água. O procedimento foi necessário devido ao etanol, presente originalmente no extrato, ter apresentado efeito tóxico às larvas do microcrustáceo em ensaio prévio. A **Tabela XX** apresenta as concentrações do extrato utilizadas no ensaio e seus respectivos valores de letalidade, após 24 horas de exposição das larvas.

Tabela XX: Resultados do ensaio da toxicidade aguda frente à *Artemia salina*.

Tubo	Concentração do extrato ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Mortes
Controle	0	0
1	2,10	0
2	20,96	0
3	104,82	0
4	157,23	2,3 ($\pm 0,5$)
5	209,64	5,3 ($\pm 0,5$)

A toxicidade, representada pelo número de indivíduos mortos, variou de acordo com a concentração do extrato. Enquanto não houve letalidade nos tubos contendo extratos diluídos nas concentrações entre 2,10 e 104,82 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em 157,23 e 209,64 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o índice de letalidade foi alto. O valor de LD_{50} para o extrato foi 205,74 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtido por meio dos dados de concentração e percentual de letalidade dos tubos 3,4 e 5.¹¹⁰

Os resultados de LD_{50} para extratos vegetais no ensaio da *A. salina* são classificados em: altamente tóxicos (0 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), moderadamente tóxicos (500 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e não tóxicos (acima de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$).¹⁸³ Segundo este critério de classificação, o extrato de *silverskin* estaria na categoria altamente tóxico.

O ensaio da *Artemia salina* tem sido empregado na avaliação da toxicidade de extratos ou substâncias puras, entre elas micotoxinas.¹⁸⁴ No entanto, estudos utilizando a metodologia, ou ensaios com outros invertebrados, para a avaliação da toxicidade da ocratoxina A, são escassos. Harwig *et al.*¹¹⁸ avaliaram a toxicidade da OTA, purificada de extratos de fungos, frente à *A. salina*, encontrando valores de

LD₅₀ de 10 µg mL⁻¹. Extratos de cereais contaminados com OTA se mostraram altamente tóxicos às larvas de *A. salina*.¹²⁵ No entanto, o estudo não foi conclusivo, pois extratos que não apresentavam a micotoxina apresentaram toxicidade semelhante.

Compostos presentes no extrato, como a CAF, apresentaram valores de LD₅₀ entre 160 e 4661 µg mL⁻¹, em ensaios de toxicidade utilizando invertebrados.¹⁸⁵ Não foram encontrados na literatura consultada, estudos avaliando a toxicidade dos CGAs frente a organismos invertebrados.

Resultados como os demonstrados pelo extrato de *silverskin* no ensaio de toxicidade indicam a necessidade de futuras avaliações. A alta toxicidade observada pode indicar a contaminação da amostra por micotoxinas, uma vez que estudos anteriores demonstram, tanto a presença destes compostos em amostras de *silverskin*,^{36,37} quanto a sensibilidade do ensaio à presença da ocratoxina A^{118,125} e outras micotoxinas.^{121,124}

Por outro lado, o ensaio de toxicidade frente à *A. salina* foi desenvolvido, e tem sido utilizado, para a prospecção de compostos com atividade biológica.^{110,184} Desta forma, compostos que apresentam elevada atividade biológica, quando em altas concentrações, se mostram tóxicos aos alvos do ensaio, como por exemplo os compostos com atividade citotóxica (potencial capacidade antitumoral) ou inseticida.¹¹¹ Estudos indicam que os CGAs, presentes no extrato de *silverskin*, apresentam propriedades antioxidantes, citotóxicas, antitumorais, entre outras.¹⁸⁶ Sendo assim, a elevada toxicidade apresentada pelo extrato, poderia ser resultado das atividades biológicas destes compostos, e seria interpretada como um resultado altamente positivo.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÃO

O planejamento de experimentos permitiu avaliar a relação existente entre as variáveis do processo de UAE e a eficiência de extração dos compostos antioxidantes 5-CQA e CAF do resíduo *silverskin*. Desta forma, determinou-se que as variáveis independentes: tempo de extração e volume de solvente extrator, não tinham efeito significativo sobre a eficiência do processo, enquanto temperatura de extração e % de etanol no solvente extrator eram significativas. Por meio das superfícies de resposta desenvolvidas para cada uma das variáveis independentes significativas, foram determinadas as melhores condições de extração para o 5-CQA e para a CAF. Condições estas, que divergiram com relação ao % de etanol.

O procedimento de otimização global, por meio da aplicação da função Desejabilidade, indicou o nível ótimo da variável % de etanol para os dois compostos, simultaneamente. Os níveis ótimos das variáveis foram: solvente extrator (45 % etanol), temperatura (59 °C), razão amostra solvente 1/20 (10 mL) e tempo de extração (7 min.) Nestas condições, os rendimentos de 5-CQA e CAF foram respectivamente 2,00 e 6,26 mg g⁻¹ de *silverskin*.

A eficiência da metodologia de extração por ultrassom foi semelhante a obtida na extração sólido-líquido para o 5-CQA, no entanto, foi aproximadamente 10 % inferior a obtida para a CAF. Contudo, a metodologia por UAE apresentou vantagens frente à extração convencional, como o tempo reduzido de extração, o emprego de menor volume de solvente, assim como, a utilização de água e etanol como solventes extratores, considerados menos tóxicos que o metanol, utilizado na extração sólido-líquido.

O extrato, obtido sob condições otimizadas apresentou teores de teofilina, ácido cafeico e derivados clorogênicos de respectivamente 0,53, 0,062 e 4,44 mg g⁻¹ de *silverskin*. A análise dos padrões de fragmentação dos compostos presentes no extrato, permitiu a identificação de 9 derivados clorogênicos, das subclasses CQA, CFA, diCQA e CFQA.

O extrato apresentou considerável capacidade antioxidante, com concentração eficiente de 46,87 mg L⁻¹ no ensaio DPPH e capacidade redutora de ferro de 152,71 µM de FeSO₄ g⁻¹ de *silverskin*. A avaliação da capacidade

antioxidante do padrão de CAF permitiu concluir que o composto não apresentou sensibilidade às metodologias de avaliação empregadas, levando a inferir que a atividade demonstrada pelo extrato resume-se, principalmente, a contribuição dos derivados clorogênicos. A elevada toxicidade frente à *Artemia salina* demonstra a necessidade de futuras avaliações referentes a citotoxicidade do extrato.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a presença da ocratoxina A no extrato de *silverskin* desenvolvido;
- Na ausência da ocratoxina A, ou presença dentro dos limites permitidos pela legislação, planeja-se determinar a capacidade antioxidante do extrato, por meio de metodologias sensíveis à presença de cafeína;
- Desenvolver estudos de citotoxicidade do extrato;
- Avaliar a capacidade anti-inflamatória do extrato;
- Avaliar a capacidade fotoprotetora do extrato;

7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

7. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

A) Participações em congressos:

1. Santos, A.L.; Dias, B.B.; Polidoro, A.S.; Jacques, R.A.; Caramão, E.B. Ultrasound-assisted Extraction Applied to Recovery of Bioactive Compounds from Industrial Coffee By-products. In: Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO XVI), Lisboa, Portugal, Janeiro de 2016.
2. Santos, A.L.; Caramão, E.B. Evaluated of Barrier Discharge Ionization Detector for the Gas Chromatography Determination of Terpenoids Compounds. In: 38th International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC), Riva del Garda, Italia, 2014.
3. Santos, A.L.; Polidoro, A.S.; Cardoso, C.A.L.; Mota, J.S.; Caramão, E.B. Analysis of seasonal variation in chemical profiles of essential oils of *Piper glabratum* leaves from Cerrado Biome (Brazil) using GC X GC/qMS. In: Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO XV), Cartagena das Índias, Colômbia, Outubro de 2014. Trabalho Premiado: Modalidade Melhor Pôster.

B) Artigos publicados em periódicos científicos:

1. Santos, A.L.; Novaes, A.S.; Polidoro, A.S.; Barros, M.E.; Mota, J. S.; Lima, D.B.M.; Krause, L.C.; Cardoso, C.A.L.; Jacques, R.A.; Caramão, E.B.; Chemical characterisation of *Piper amalago* (Piperaceae) essential oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with rapid-scanning quadrupole mass spectrometry (GCxGC/qMS) and their antilithiasic activity and acute toxicity. Periódico: Phytochemical Analysis, 2018, DOI: 10.1002/pca.2747.
2. Santos, A.L.; Polidoro, A.S.; Cardoso, C.A.L.; Batistote, M.; Vieira, M.C.; Jacques, R.A.; Caramão, E.B.; GCxGC/qMS analyses of *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg essential oils and their antioxidant and antimicrobial activity. Periódico: Natural Product Research, 2017, DOI: 10.1080/14786419.2017.1399383.

3. Santos, A.L.; Polidoro, A.S.; Schneider, J.K.; Cunha, M.E.; Saucier, C.; Jacques, R.A.; Cardoso, C.A.L; Mota, J.S.; Caramão, E.B.; Comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry (GC×GC/TOFMS) for the analysis of volatile compounds in *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. essential oils. Periódico: Microchemical Journal, 2015, DOI: 10.1016/j.microc.2014.07.007.

4. Polidoro, A.S.; Scapin, E.; Lazzari, E.; Silva, A.N.; Santos, A.L.; Caramão, E.B.; Jacques, R.A.; Valorization of coffee *silverskin* industrial waste by pyrolysis: From optimization of bio-oil production to chemical characterization by GC × GC/qMS. Periódico: Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2018, DOI: 10.1016/j.jaap.2017.12.005.

C) Artigos submetidos a periódicos científicos:

1. Santos, A.L.; Polidoro, A.S.; Cardoso, C.A.L.; Mota, J.S.; Jacques, R.A.; Caramão, E.B.; Analysis of the seasonal variation in chemical profile of *Piper glabratum* Kunth essential oils using GC×GC/qMS and their antioxidant and antifungal activities. Periódico: Journal of the American Oil Chemists' Society.

2. Santos, A.L.; Krause, L. C.; Schneider, J.K.; Caramão, E.B.; Nogueira; J.M.F.; Evaluation of α and β -Endosulfan Residues in Teas and Yerba Mate by Bar Adsorptive Microextraction (BA μ E) and Large Volume Injection Gas Chromatography – Mass Spectrometry (LVI–GC–MS). Periódico: Food Control.

3. Lima, D.B.M.; Barros, J.A.S.; Celestino, A.O.; Krause, M.C.; Sawata, M.T.; Santos, A.L.; Baldez, J.; Sampaio, N.; Melecchi, M.I.S.; Krause, L.C.; Caramão, E.B.; Preliminary Studies of Ultrasonic Extracts of *Moringa Citrifolia* L.: Characterization by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Periódico: Ultrason Sonochemistry.

D) Artigo em fase de elaboração:

1. Multivariate Optimization of Chlorogenic Acid and Caffeine Extraction from Coffee *Silverskin* by Ultrasound-assisted Extraction.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Narita, Y.; Inouye, K.; *Food Res. Int.* **2014**, *61*, 16–22.
2. Amorati, R.; Valgimigli, L.; *Free Radic. Res.* **2015**, *49*, 633–649.
3. Reuter, S.; Gupta, S. C.; Chaturvedi, M. M.; Aggarwal, B. B.; *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1603–1616.
4. Gülçin, I.; *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 345–391.
5. Carocho, M.; Ferreira, I. C. F. R.; *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *51*, 15–25.
6. Augustyniak, A.; Bartosz, G.; Čipak, A.; Duburs, G.; Horáková, L.; Łuczaj, W.; Majekova, M.; Odysseos, A. D.; Rackova, L.; Skrzydlewska, E.; Stefek, M.; Štrosová, M.; Tirzitis, G.; Venskutonis, P.R.; Viskupicova, J.; Vraka, P.S.; Žarkovic, N.; *Free Radic. Res.* **2010**, *44*, 1216–1262.
7. Taghvaei, M.; Jafari, S. M.; *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 1272–1282.
8. Santana-Gálvez, J.; Cisneros-Zevallos, L.; Jacobo-Velázquez, D. A.; *Molecules* **2017**, *22*, 358–378.
9. Herman, A.; Herman, A. P.; *Skin Pharmacol. Physiol.* **2012**, *26*, 8–14.
10. Peschel, W.; Sánchez-Rabaneda, F.; Diekmann, W.; Plescher, A.; Gartzía, I.; Jiménez, D.; Lamuela-Raventós, R.; Buxaderas, S.; Codina, C.; *Food Chem.* **2006**, *97*, 137–150.
11. Santana-Méridas, O.; González-Coloma, A.; Sánchez-Vioque, R.; *Phytochem. Rev.* **2012**, *11*, 447–466.
12. Van Dyk, J. S.; Gama, R.; Morrison, D.; Swart, S.; Pletschke, B. I.; *Renew. Sustain. Energ. Rev.* **2013**, *26*, 521–531.
13. Capson-Tojo, G.; Rouez, M.; Crest, M.; Steyer, J.P.; Delgenès, J.P.; Escudié, R.; *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2016**, *15*, 499–547.
14. Ravindran, R.; Jaiswal, A. K.; *Trends Biotechnol.* **2016**, *34*, 58–69.
15. Tuck, C. O.; Pérez, E.; Horváth, I. T.; Sheldon, R. A.; Poliakoff, M.; *Science* **2012**, *337*, 695–699.
16. Butt, M. S.; Sultan, M. T.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 363–373.
17. International Coffee Organization, *Historical Data on the Global Coffee Trade*, **2015**.
18. Mussatto, S. I. *In Coffee in Health and Disease Prevention*; Preedy, V. (Edt.); Elsevier: Amsterdã, **2014**, p. 93–106.

19. Murthy, P. S.; Naidu, M. M.; *Resour. Conserv. Recycl.* **2012**, *66*, 45–58.
20. Jiménez-Zamora, A.; Pastoriza, S.; Rufián-Henares, J. A.; *LWT - Food Sci. Technol.* **2015**, *61*, 12–18.
21. Bresciani, L.; Calani, L.; Bruni, R.; Brighenti, F.; Rio, D. D.; *Food Res. Int.* **2014**, *61*, 196–201.
22. Regazzoni, L.; Saligari, F.; Marinello, C.; Rossoni, G.; Aldini, G.; Carini, M.; Orioli, M.; *J. Funct. Foods* **2016**, *20*, 472–485.
23. Narita, Y.; Inouye, K.; *Food Chem.* **2012**, *135*, 943–949.
24. Murthy, P. S.; Naidu, M. M.; *Food Bioproc. Technol.* **2012**, *5*, 897–903.
25. Ballesteros, L. F.; Teixeira, J. A.; Mussatto, S. I.; *Food Bioproc. Technol.* **2014**, *7*, 1322–1332.
26. Costa, A. S. G.; Alves, R. C.; Vinha, A. F.; Barreira, S. V. P.; Nunes, M. A.; Cunha, L. M.; Oliveira, M. B. P. P.; *Ind. Crops Prod.* **2014**, *53*, 350–357.
27. Rodrigues, F.; Palmeira-de-Oliveira, A.; Neves, J.; Sarmiento, B.; Amaral, M. H.; Oliveira, M. B. P. P.; *Pharm. Biol.* **2015**, *53*, 386–394.
28. Rodrigues, F.; Pereira, C.; Pimentel, F. B.; Alves, R. C.; Ferreira, M.; Sarmiento, B.; Amaral, M. H.; Oliveira, M. B. P. P.; *Ind. Crops Prod.* **2015**, *63*, 167–174.
29. Rodrigues, F.; Sarmiento, B.; Amaral, M. H.; Oliveira, M. B. P. P.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2016**, *42*, 880–889.
30. Rodrigues, F.; Gaspar, C.; Palmeira-De-Oliveira, A.; Sarmiento, B.; Amaral, M. H.; Oliveira, M. B. P. P.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2016**, *42*, 99–106.
31. Rodrigues, F.; Matias, R.; Ferreira, M.; Amaral, M. H.; Oliveira, M. B. P. P.; *Exp. Dermatol.* **2016**, *25*, 572–574.
32. Rodrigues, F.; Alves, A. C.; Nunes, C.; Sarmiento, B.; Amaral, M. H.; Reis, S.; Oliveira, M. B. P. P.; *Int. J. Pharm.* **2016**, *513*, 496–503.
33. Pourfarzad, A.; Mahdavian-Mehr, H.; Sedaghat, N.; *LWT - Food Sci. Technol.* **2013**, *50*, 599–606.
34. Garcia-Serna, E.; Martinez-Saez, N.; Mesias, M.; Morales, F. J.; Castillo, M. D.; *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2014**, *64*, 243–251.
35. Martinez-Saez, N.; Ullate, M.; Martin-Cabrejas, M. A.; Martorell, P.; Genovés, S.; Ramon, D.; Castillo, M. D.; *Food Chem.* **2014**, *150*, 227–234.
36. Borrelli, R. C.; Esposito, F.; Napolitano, A.; Ritieni, A.; Fogliano, V.; *J. Agric.*

- Food Chem.* **2004**, *52*, 1338–1343.
37. Toschi, T. G.; Cardenia, V.; Bonaga, G.; Mandrioli, M.; Rodriguez-Estrada, M. T.; *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 10836–10844.
 38. Girotto, F.; Alibardi, L.; Cossu, R.; *Waste Manag.* **2015**, *45*, 32–41.
 39. Galanakis, C. M.; *Trends Food Sci. Technol.* **2012**, *26*, 68–87.
 40. Iriondo-DeHond, A.; Martorell, P.; Genovés, S.; Ramón, D.; Stamatakis, K.; Fresno, M.; Molina, A.; Castillo, M. D.; *Molecules* **2016**, *21*, 721–734.
 41. Conde, T.; Mussatto, S. I.; *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2016**, *46*, 406–409.
 42. Panusa, A.; Petrucci, R.; Lavecchia, R.; Zuurro, A.; *Food Res. Int.* **2017**, *99*, 155–165.
 43. Castro-Muñoz, R.; Yáñez-Fernández, J.; Fíla, V.; *Food Chem.* **2016**, *213*, 753–762.
 44. Picó, Y.; *Trends Anal. Chem.* **2013**, *43*, 84–99.
 45. Banerjee, J.; Singh, R.; Vijayaraghavan, R.; Macfarlane, D.; Patti, A. F.; Arora, A.; *Food Chem.* **2017**, *225*, 10–22.
 46. Choung, M. G.; Hwang, Y. S.; Lee, M. S.; Lee, J.; Kang, S. T.; Jun, T. H.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2014**, *49*, 1572–1578.
 47. Taha, F. S.; Mohamed, G. F.; Mohamed, S. H.; Mohamed, S. S.; Kamil, M. M.; *Am. J. Food Technol.* **2011**, *6*, 1002–1020.
 48. Michail, A.; Sigala, P.; Grigorakis, S.; Makris, D. P.; *Chem. Eng. Commun.* **2016**, *203*, 407–413.
 49. Towards the future we want: end hunger and make the transition to sustainable agricultural and food systems, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2012. Endereço eletrônico: <http://www.fao.org/docrep/015/an894e/an894e00.pdf>
 50. Matharu, A. S.; Melo, E. M.; Houghton, J. A.; *Bioresour. Technol.* **2016**, *215*, 123–130.
 51. Directive 2008/98/EC of the European Parliament and the Council of 19 November 2008 on Waste and Repealing Certain Directives. Official Journal of the European Union, 22/11/2008.
 52. Dobbs, R.; Oppenheim, J.; Thompson, F.; *Mckinsey Global Institute* **2012**.
 53. Kowalska, H.; Czajkowska, K.; Cichowska, J.; Lenart, A.; *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *67*, 150–159.

54. Correia, R. T. P.; Borges, K. C.; Medeiros, M. F.; Genovese, M. I.; *Food Sci. Technol. Int.* **2012**, *18*, 539–547.
55. Emaga, T. H.; Ronkart, S. N.; Robert, C.; Wathelet, B.; Paquot, M.; *Food Chem.* **2008**, *108*, 463–471.
56. Chitturi, S.; Talatam, V. G.; Vuppu, S.; *Der Pharm. Lett.* **2013**, *5*, 13–23.
57. Mamma, D.; Christakopoulos, P.; *Waste Biomass. Valorization* **2014**, *5*, 529–549.
58. Mandawgade, S. D.; Patravale, V. B.; *Indian J. Pharm. Sci.* **2008**, *70*, 539–542.
59. Rubio-Senent, F.; Lama-Muñoz, A.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Fernández-Bolaños, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1235–1248.
60. Zaki, N. A. M.; Rahman, N. A.; Zamanhuri, N. A.; Hashib, S. A.; *Chem. Eng. Trans.* **2017**, *56*, 1369–1374.
61. Silva, A. C.; Jorge, N.; *Food Res. Int.* **2014**, *66*, 493–500.
62. Guo, C.; Yang, J.; Wei, J.; Li, Y.; Xu, J.; Jiang, Y.; *Nutr. Res.* **2003**, *23*, 1719–1726.
63. Ludwig, I. A.; Clifford, M. N.; Lean, M. E. J.; Ashihara, H.; Crozier, A.; *Food Funct.* **2014**, *5*, 1695–1717.
64. Esquivel, P.; Jiménez, V. M.; *Food Res. Int.* **2012**, *46*, 488–495.
65. Campos-Vega, R.; Loarca-Piña, G.; Vergara-Castañeda, H. A.; Oomah, B. D.; *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *45*, 24–36.
66. Cruz, R.; Mendes, E.; Torrinha, A.; Morais, S.; Pereira, J. A.; Baptista, P.; Casal, S.; *Food Res. Int.* **2015**, *73*, 190–196.
67. Silva, M. A.; Nebra, S. A.; Silva, M. J. M.; Sanchez, C. G.; *Biomass Bioenergy* **1998**, *14*, 457–467.
68. Scully, D.; Jaiswal, A.; Abu-Ghannam, N.; *Bioengineering* **2016**, *3*, 33–45.
69. Sung, S. H.; Chang, Y.; Han, J.; *Carbohydr. Polym.* **2017**, *169*, 495–503.
70. Polidoro, A. S.; Scapin, E.; Lazzari, E.; Silva, A. N.; Santos, A. L.; Caramão, E. B.; Jacques, R. A.; *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2018**, *129*, 43–52.
71. Robbins, R. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2866–2887.
72. Maria, C. A. B.; Moreira, R. F. A.; *Quim. Nov.* **2004**, *27*, 586–592.
73. Martini, D.; Bó, C.; Tassotti, M.; Riso, P.; Rio, D.; Brighenti, F.; Porrini, M.; *Molecules* **2016**, *21*, 979–998.
74. Chen, Y.; Yu, Q. J.; Li, X.; Luo, Y.; Liu, H.; *Sep. Sci. Technol.* **2007**, *42*, 3481–

- 3492.
75. Marinova, E. M.; Toneva, A.; Yanishlieva, N.; *Food Chem.* **2009**, *114*, 1498–1502.
 76. Sotillo, D. R.; Hadley, M.; Wolf-Hall, C.; *J. Food Sci.* **1998**, *63*, 907–910.
 77. Jassim, S. A. A.; Naji, M. A.; *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *95*, 412–427.
 78. Bowles, B. L.; Miller, A. J.; *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 905–908.
 79. Kim, J.; Lee, S.; Shim, J.; Kim, H. W.; Kim, J.; Jang, Y. J.; Yang, H.; Park, J.; Choi, S. H.; Yoon, J.; Lee, K.W.; Lee, H.J.; *Neurochem. Int.* **2012**, *60*, 466–474.
 80. Monteiro, J. P.; Alves, M. G.; Oliveira, P. F.; Silva, B. M.; *Molecules* **2016**, *21*, 974–1005.
 81. Oestreich-Janzen, S. In *Encyclopedia of Food and Health*; Caballero, B.; Finglas, P.M.; Toldrá, F. (Edts.); Elsevier: Amsterdã, **2016**, p. 556–572.
 82. Zhang, L.; Kujawinski, D. M.; Federherr, E.; Schmidt, T. C.; Jochmann, M. A.; *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2805–2810.
 83. Kolahdouzan, M.; Hamadeh, M. J.; *CNS Neurosci. Ther.* **2017**, *23*, 272–290.
 84. León-Carmona, J. R.; Galano, A.; *Int. J. Quantum Chem.* **2012**, *112*, 3472–3478.
 85. Napolitano, A.; Fogliano, V.; Tafuri, A.; Ritieni, A.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10499–10504.
 86. Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M.; *Food Chem.* **2011**, *125*, 288–306.
 87. Bayman, P.; Baker, J. L.; *Mycopathologia* **2006**, *162*, 215–223.
 88. Viegas, C.; Pacífico, C.; Faria, T.; Oliveira, A. C.; Caetano, L. A.; Carolino, E.; Gomes, A. Q.; Viegas, S.; *J. Toxicol. Env. Health A* **2017**, *80*, 719–728.
 89. Paterson, R. R. M.; Lima, N.; Taniwaki, M. H.; *Food Res. Int.* **2014**, *61*, 1–15.
 90. García-Moraleja, A.; Font, G.; Mañes, J.; Ferrer, E.; *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *86*, 225–233.
 91. International Agency for Research on Cancer (IARC): monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Endereço eletrônico: <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol56/13-ochra>
 92. Commission Directive 2006/1881/EC: setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs; Off. J. Eur. Commun. 2006, 5–24.
 93. Fernandez-Gomez, B.; Ramos, S.; Goya, L.; Mesa, M. D.; Castillo, M. D.;

- Martín, M. A.; *Food Res. Int.* **2016**, *89*, 1015–1022.
94. Fernandez-Gomez, B.; Lezama, A.; Amigo-Benavent, M.; Ullate, M.; Herrero, M.; Martín, M. A.; Mesa, M. D.; Castillo, M. D.; *J. Funct. Foods* **2016**, *25*, 197–207.
95. Fraga, C. G.; Oteiza, P. I.; Galleano, M.; *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840*, 931–934.
96. Cha, J. W.; Piao, M. J.; Kim, K. C.; Yao, C. W.; Zheng, J.; Kim, S. M.; Hyun, C. L.; Ahn, Y. S.; Hyun, J. W.; *Biomol. Ther. (Seoul)* **2014**, *22*, 136–42.
97. Xu, J. G.; Hu, Q. P.; Liu, Y.; *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11625–11630.
98. Moreira, D. P.; Monteiro, M. C.; Alves, M. R.; Donangelo, C. M.; Trugo, L. C.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1399–1402.
99. Vignoli, J. A.; Bassoli, D. G.; Benassi, M. T.; *Food Chem.* **2011**, *124*, 863–868.
100. Zielinski, A. A. F.; Haminiuk, C. W. I.; Alberti, A.; Nogueira, A.; Demiate, I. M.; Granato, D.; *Food Res. Int.* **2014**, *60*, 246–254.
101. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.; *LWT–Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25.
102. Bandoniene, D.; Murkovic, M.; Pfannhauser, W.; Venskutonis, P. R.; Gruzdiene, D.; *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *214*, 143–147.
103. Jeszka-Skowron, M.; Zgoła-Grześkowiak, A.; Grześkowiak, T.; *Eur. Food Res. Technol.* **2015**, *240*, 19–31.
104. Chandrasekar, D.; Madhusudhana, K.; Ramakrishna, S.; Diwan, P. V.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 460–464.
105. Yan, R.; Cao, Y.; Yang, B.; *Molecules* **2014**, *19*, 4409–4417.
106. Riethmuller, E.; Konczol, A.; Szakal, D.; Vegh, K.; Balogh, G. T.; Kery, A.; *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 641–644.
107. Moon, J. K.; Shibamoto, T.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1655–1666.
108. Bunel, V.; Ouedraogo, M.; Nguyen, A. T.; Stévigny, C.; Duez, P.; *Planta Med.* **2014**, *80*, 1210–1226.
109. Aydin, A.; Aktay, G.; Yesilada, E.; *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 1763–1773.
110. Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; MacLaughlin, J. L.; *J. Med. Plants Res.* **1982**, *45*, 31–34.
111. Mclaughlin, J. L.; Rogers, L. L.; Anderson, J. E.; *Drug Inf. J.* **1998**, *32*, 513–524.

112. Nunes, B. S.; Carvalho, F. D.; Guilhermino, L. M.; Van Stappen, G.; *Environ. Pollut.* **2006**, *144*, 453–462.
113. Carballo, J. L.; Hernández-Inda, Z. L.; Pérez, P.; García-Grávalos, M. D.; *BMC Biotechnol.* **2002**, *2*, 1–5.
114. Logrieco, A.; Moretti, A.; Fornelli, F.; Fogliano, V.; Ritieni, A.; Caiaffa, M. F.; Randazzo, G.; Bottalico, A.; Macchia, L.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 3378–3384.
115. Xu, X.; He, F.; Zhang, X.; Bao, J.; Qi, S.; *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *53*, 46–51.
116. Solfrizzo, M.; Visconti, A.; *Mycotoxin Res.* **1991**, *7*, 2–7.
117. Foremska, E.; Marcinkowska, J.; Chelkowski, J.; *Mycotoxin Res.* **1990**, *6*, 93–97.
118. Harwig, J.; Scott, P. M.; *Appl. Microbiol.* **1971**, *21*, 1011–1016.
119. Zajkowski, P.; Grabarkiewicz-Szcesna, J.; Schmidt, R.; *Mycotoxin Res.* **1991**, *7*, 1–9.
120. Vurro, M.; Zonno, M. C.; Evidente, A.; Capasso, R.; Bottalico, A.; *Mycotoxin Res.* **1992**, *8*, 17–20.
121. Moretti, A.; Mulè, G.; Ritieni, A.; Logrieco, A.; *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *118*, 158–163.
122. Tan, D. C.; Flematti, G. R.; Ghisalberti, E. L.; Sivasithamparam, K.; Chakraborty, S.; Obanor, F.; Barbetti, M. J.; *Mycotoxin Res.* **2011**, *27*, 123–135.
123. Tan, D. C.; Flematti, G. R.; Ghisalberti, E. L.; Sivasithamparam, K.; Barbetti, M.; *J. Toxicon* **2011**, *57*, 817–825.
124. Tan, D. C.; Flematti, G. R.; Ghisalberti, E. L.; Sivasithamparam, K.; Chakraborty, S.; Obanor, F.; Jayasena, K.; Barbetti, M. J.; *Mycotoxin Res.* **2012**, *28*, 89–96.
125. Scudamore, K. A.; Hetmanski, M. T.; *Food Addit. Contam.* **1995**, *12*, 377–382.
126. Zanoelo, E. F.; Benicá, C.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 11564–11569.
127. Dawidowicz, A. L.; Typek, R.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12578–12584.
128. Maria, C. A. B.; Trugo, L. C.; Miranda, L. S. M.; Salvador, E.; *Food Res. Int.* **1998**, *31*, 475–477.
129. Azmir, J.; Zaidul, I. S. M.; Rahman, M. M.; Sharif, K. M.; Mohamed, A.; Sahena,

- F.; Jahurul, M. H. A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. A. N.; Omar, A. K. M.; *J. Food Eng.* **2013**, *117*, 426–436.
130. Knorr, D.; Froehling, A.; Jaeger, H.; Reineke, K.; Schlueter, O.; Schoessler, K.; *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2011**, *2*, 203–235.
131. Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A. G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A. S.; Abert-Vian, M.; *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *34*, 540–560.
132. Awad, T. S.; Moharram, H. A.; Shaltout, O. E.; Asker, D.; Youssef, M. M.; *Food Res. Int.* **2012**, *48*, 410–427.
133. Priego-Capote, F.; Castro, M. D. L.; *Trends Analyt. Chem.* **2004**, *23*, 644–653.
134. Martines, M. A. U.; Davolos, M. R.; Jafelicci Junior, M.; *Quim. Nov.* **2000**, *23*, 251–256.
135. Sereshti, H.; Samadi, S.; Jalali-heravi, M.; *J. Chromatogr. A* **2013**, *1280*, 1–8.
136. Carrillo-Hormaza, L.; Ramírez, A. M.; Osorio, E.; Gil, A.; *Food Anal. Methods* **2017**, *10*, 497–507.
137. Ma, X.; Zhou, X. Y.; Qiang, Q. Q.; Zhang, Z. Q.; *J. Sep. Sci.* **2014**, *37*, 1834–1841.
138. Liu, Q. M.; Yang, X. M.; Zhang, L.; Majetich, G.; *J. Med. Plants Res.* **2010**, *4*, 2503–2511.
139. Zhang, L.; Liu, J.; Zhang, P.; Yan, S.; He, X.; Chen, F.; *Chromatographia* **2011**, *73*, 129–133.
140. Muñoz-Marquez, D. B.; Martínez-Avila, G. C.; Wong-Paz, J. E.; Belmares-Cerda, R.; Rodríguez-Herrera, R.; Aguilar, C. N.; *Ultrason. Sonochem.* **2013**, *20*, 1149–1154.
141. Malejko, J.; Nalewajko-Sieliwoniuk, E.; Nazaruk, J.; Siniło, J.; Kojło, A.; *Food Chem.* **2014**, *152*, 155–161.
142. Tan, T.; Lai, C. J. S.; OuYang, H.; He, M. Z.; Feng, Y.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *120*, 134–141.
143. Xu, D. P.; Zheng, J.; Zhou, Y.; Li, Y.; Li, S.; Li, H. B.; *Food Chem.* **2017**, *217*, 552–559.
144. Zhu, Z.; Wu, Q.; Di, X.; Li, S.; Barba, F. J.; Koubaa, M.; Roohinejad, S.; Xiong, X.; He, J.; *Food Bioprod. Process.* **2017**, *104*, 40–47.
145. Oszmiański, J.; Nowicka, P.; Teleszko, M.; Wojdyło, A.; Cebulak, T.; Oklejewicz, K.; *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 14540–14553.

146. Martí, R.; Valcárcel, M.; Herrero-Martínez, J. M.; Cebolla-Cornejo, J.; Roselló, S.; *Food Chem.* **2015**, *169*, 169–179.
147. Saleh, I. A.; Vinatoru, M.; Mason, T. J.; Abdel-Azim, N. S.; Aboutabl, E. A.; Hammouda, F. M.; *Ultrason. Sonochem.* **2016**, *31*, 330–336.
148. Gullberg, J.; Jonsson, P.; Nordström, A.; Sjöström, M.; Moritz, T.; *Anal. Biochem.* **2004**, *331*, 283–295.
149. Haaland, P. D.; *Experimental Design in Biotechnology*, CRC Press: Nova Iorque, **1989**.
150. Varmuza, K.; In *4 th Autumn School of Chemoinformatics, Toquio, Japão*, **2015**, pp.4–7.
151. Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Como Fazer Experimentos*, Bookman: Porto Alegre, **2010**.
152. Teófilo, R. F.; Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, **2007**.
153. Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M. C.; *Quim. Nov.* **2006**, *29*, 338–350.
154. Myers, R. H.; Montgomery, D. C.; Anderson-Cook, C. M.; *Response Surface Methodology*, Wiley: Nova Jersey, **2009**.
155. Candiotti, L. V.; Zan, M. M.; Camara, M. S.; Goicoechea, H. C.; *Talanta* **2014**, *124*, 123–138.
156. Derringer, G.; Suich, R.; *J. Qual. Technol.* **1980**, *12*, 214–219.
157. Lanças, F. M.; *Sci. Chromatogr.* **2009**, *5*, 27–46.
158. Zhao, J.; Lv, G. P.; Chen, Y. W.; Li, S. P.; *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 7453–7475.
159. Rodrigues, N. P.; Bragagnolo, N.; *J. Food Compos. Anal.* **2013**, *32*, 105–115.
160. Arai, K.; Terashima, H.; Aizawa, S.; Taga, A.; Yamamoto, A.; Tsutsumiuchi, K.; Kodama, S.; *Anal. Sci.* **2015**, *31*, 831–835.
161. Rostagno, M. A.; Manchón, N.; D'Arrigo, M.; Guillamón, E.; Villares, A.; García-Lafuente, A.; Ramos, A.; Martínez, J. A.; *Anal. Chim. Acta* **2011**, *685*, 204–211.
162. Belguidoum, K.; Amira-Guebailia, H.; Boulmokh, Y.; Houache, O.; *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2014**, *45*, 1314–1320.
163. Chiaradia, M. C.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; *Quim. Nov.* **2008**, *31*, 623–636.
164. Crupi, P.; Genghi, R.; Antonacci, D.; *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 1025–1034.
165. Clifford, M. N.; Johnston, K. L.; Knight, S.; Kuhnert, N.; *J. Agric. Food Chem.*

- 2003**, 51, 2900–2911.
166. Wen, J.; Kang, L.; Liu, H.; Xiao, Y.; Zhang, X.; Chen, Y.; *Pharmacognosy Res.* **2012**, 4, 148–153.
167. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nov.* **2004**, 27, 771–780.
168. Craig, A. P.; Fields, C.; Liang, N.; Kitts, D.; Erickson, A.; *Talanta* **2016**, 154, 481–485.
169. Zuo, Y.; Chen, H.; Deng, Y.; *Talanta* **2002**, 57, 307–316.
170. Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F.; In *Comunicado Técnico 125 EMBRAPA* **2006**, 1–6.
171. Shalash, M.; Makahleh, A.; Salhimi, S. M.; Saad, B.; *Talanta* **2017**, 174, 428–435.
172. Rajauria, G.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, 148, 230–237.
173. Bergs, D.; Merz, J.; Delp, A.; Joehnck, M.; Martin, G.; Schembecker, G.; *Chem. Eng. Technol.* **2013**, 36, 1739–1748.
174. Shi, J.; Nawaz, H.; Pohorly, J.; Mittal, G.; Kakuda, Y.; Jiang, Y.; *Food Rev. Int.* **2005**, 21, 139–166.
175. Dai, J.; Mumper, R. J.; *Molecules* **2010**, 15, 7313–7352.
176. Wang, L.; Weller, C. L.; *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, 17, 300–312.
177. Pyrzyńska, K.; Pełkal, A.; *Anal. Methods* **2013**, 5, 4288–4295.
178. Polak, J.; Bartoszek, M.; *Food Chem.* **2018**, 248, 46–51.
179. Çelik, E. E.; Gökmen, V.; *Food Chem.* **2018**, 255, 8–14.
180. Bubonja-Sonje, M.; Giacometti, J.; Abram, M.; *Food Chem.* **2011**, 127, 1821–1827.
181. Martínez, R.; Torres, P.; Meneses, M. A.; Figueroa, J. G.; Pérez-Álvarez, J. A.; Viuda-Martos, M.; *Food Res. Int.* **2012**, 49, 39–45.
182. Pellegrini, N.; Serafini, M.; Salvatore, S.; Rio, D. D.; Bianchi, M.; Brighenti, F.; *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, 50, 1030–1038.
183. Musila, M. F.; Dossaji, S. F.; Nguta, J. M.; Lukhoba, C. W.; Munyao, J. M.; *J. Ethnopharmacol.* **2013**, 146, 557–561.
184. Libralato, G.; Prato, E.; Migliore, L.; Cicero, A. M.; Manfra, L.; *Ecol. Indic.* **2016**, 69, 35–49.

185. Brausch, J. M.; Connors, K. A.; Brooks, B. W.; Rand, G. M.; In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer: Alemanha, **2012**.
- 186 Naveed, M.; Hejazi, V.; Abbas, M.; Kamboh, A. A.; Khan, G. J.; Shumzaid, M.; Ahmad, F.; Babazadeh, D.; FangFang, X.; Modarresi-Ghazani, F.; WenHua, L.; XiaoHui, Z.; *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *97*, 67–74.

9. APÊNDICES

Espectros de massas obtidos por LC/MSⁿ e estruturas químicas dos compostos tentativamente identificados no extrato hidroetanólico de *silverskin* obtido por UAE:

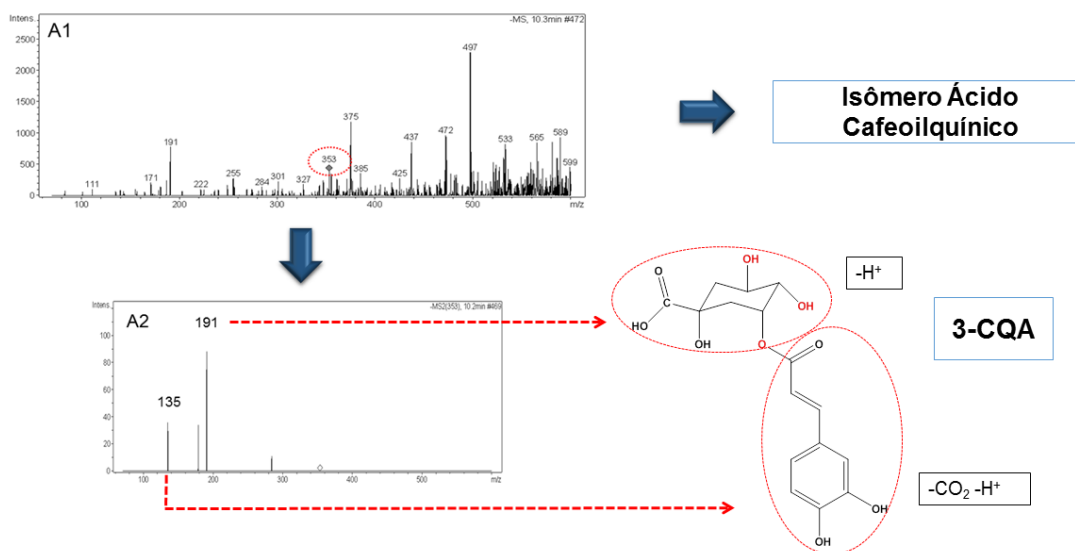


Figura 22: Espectros de massas do composto tentativamente identificado como ácido 3-cafeoilquínico. Em **A1**: íon desprotonado m/z 353 e **A2**: seus fragmentos característicos.

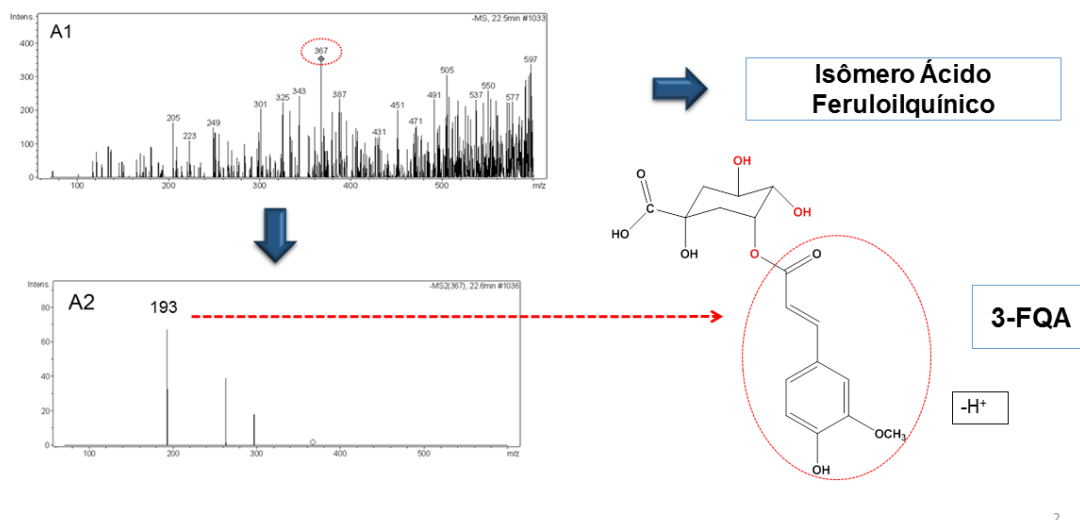
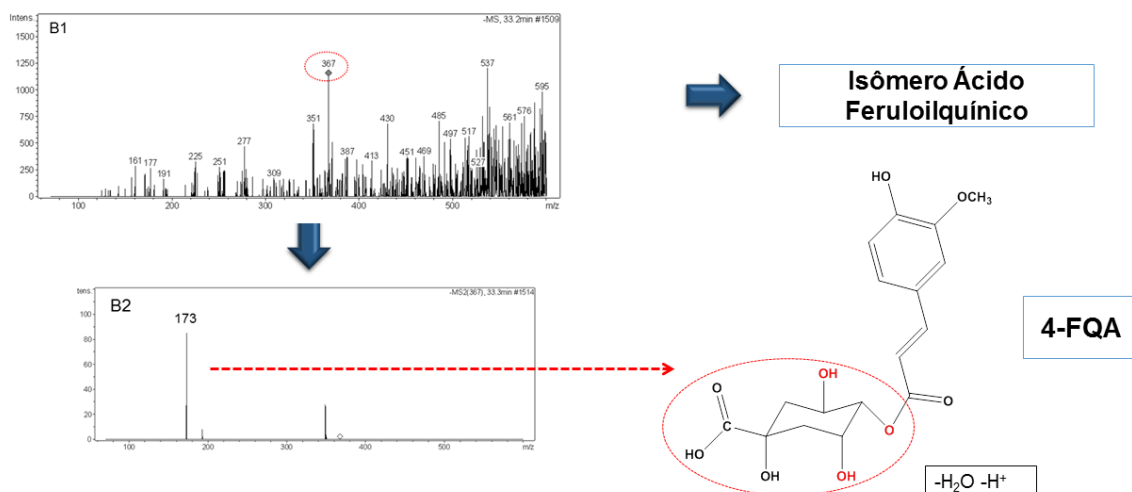
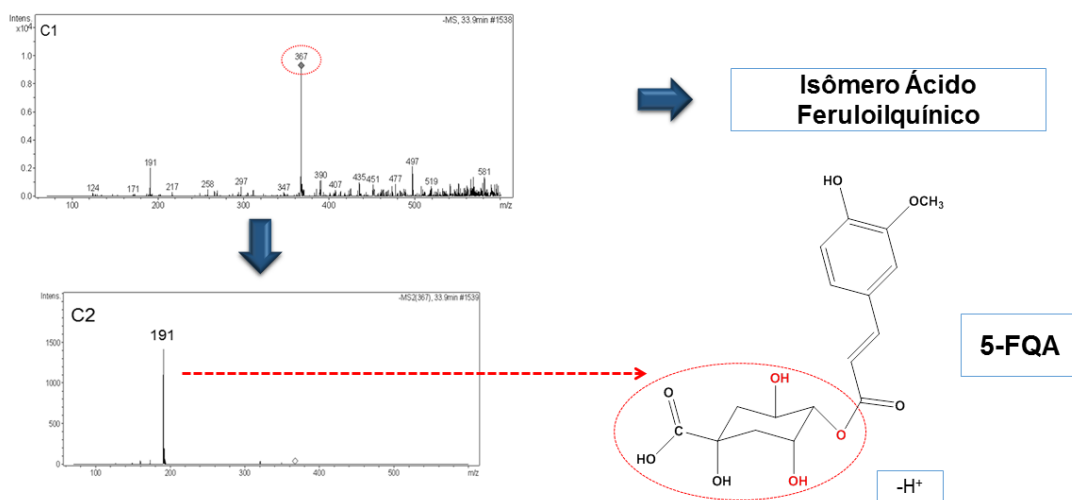


Figura 23: Espectros de massas do composto tentativamente identificado como ácido 3-feruloilquínico. Em **A1**: íon desprotonado de m/z 367 e **A2**: fragmento característico.



3

Figura 24: Espectros de massas do composto tentativamente identificado como ácido 4-feruloilquínico. Em **B1**: íon desprotonado de m/z 367 e **B2**: fragmento característico.



4

Figura 25: Espectros de massas do composto tentativamente identificado como ácido 5-feruloilquínico. Em **C1**: íon desprotonado de m/z 367 e **C2**: fragmento característico.

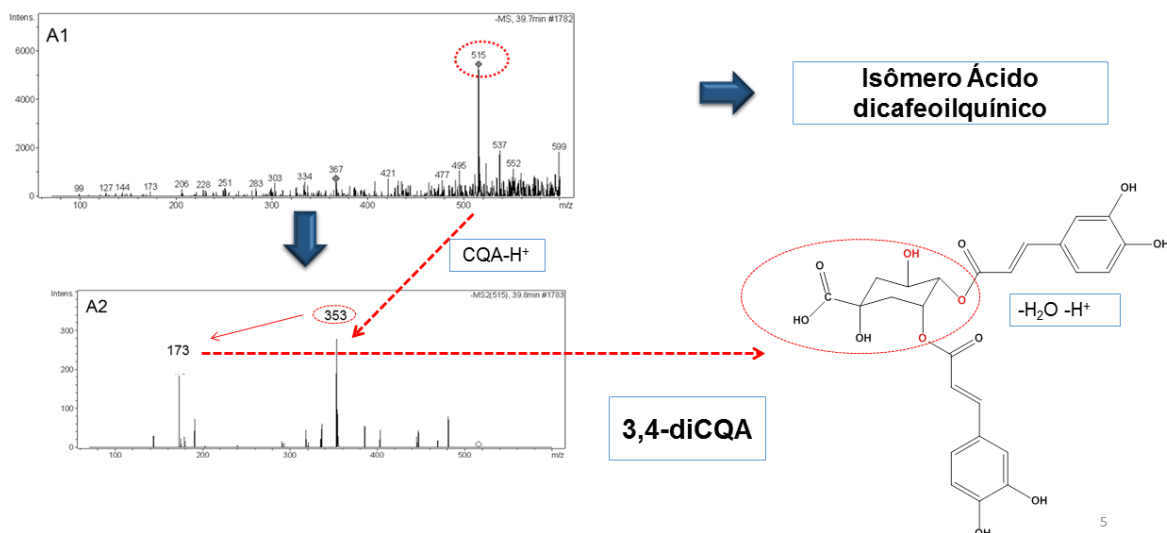


Figura 26: Espectros de massas do composto tentativamente identificado como ácido 3,4-dicafeoilquínico. Em **A1**: íon desprotonado de m/z 515 e **A2**: seus fragmentos característicos.

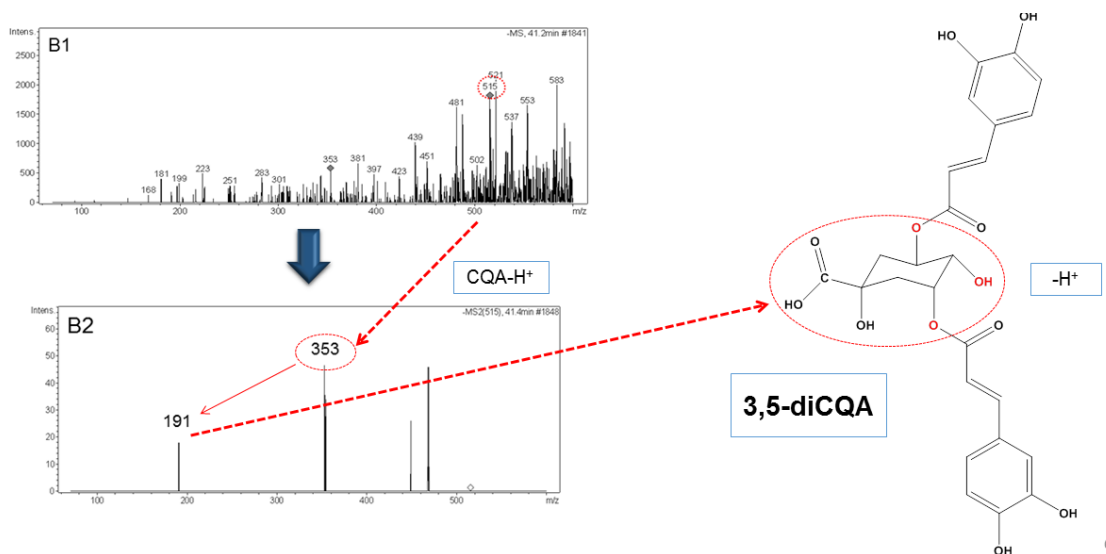


Figura 27: Espectros de massas do composto tentativamente identificado como ácido 3,5-dicafeoilquínico. Em **B1**: íon desprotonado de m/z 515 e **B2**: seus fragmentos característicos.

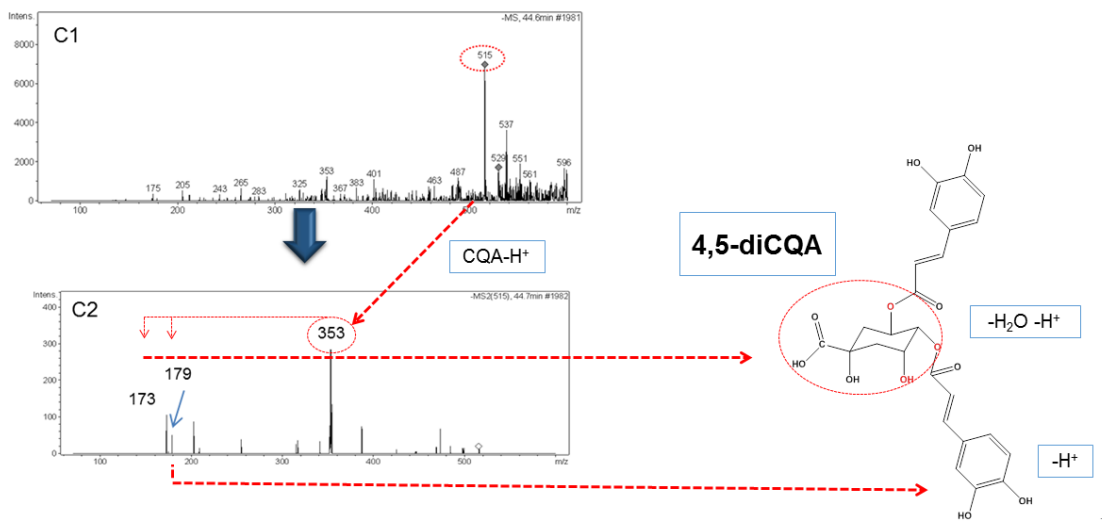


Figura 28: Espectros de massas do composto tentativamente identificado como ácido 4,5-dicafeoilquínico. Em **C1**: íon desprotonado de m/z 515 e **C2**: seus fragmentos característicos.

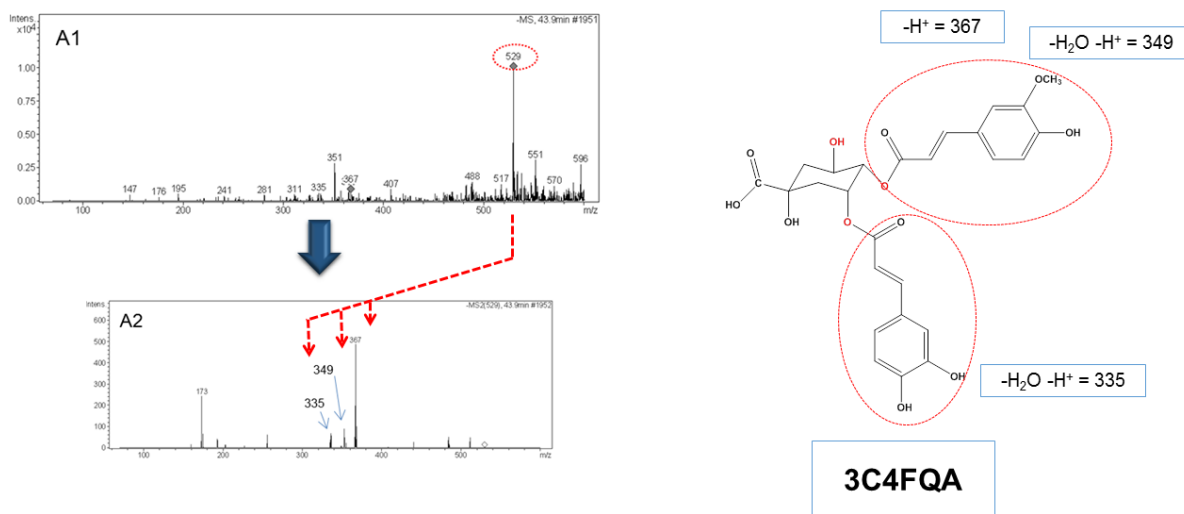


Figura 29: Espectros de massas do composto tentativamente identificado como ácido 3-cafeoil-4-feruloilquínico. Em **A1**: íon desprotonado de m/z 529 e **A2**: seus fragmentos característicos.

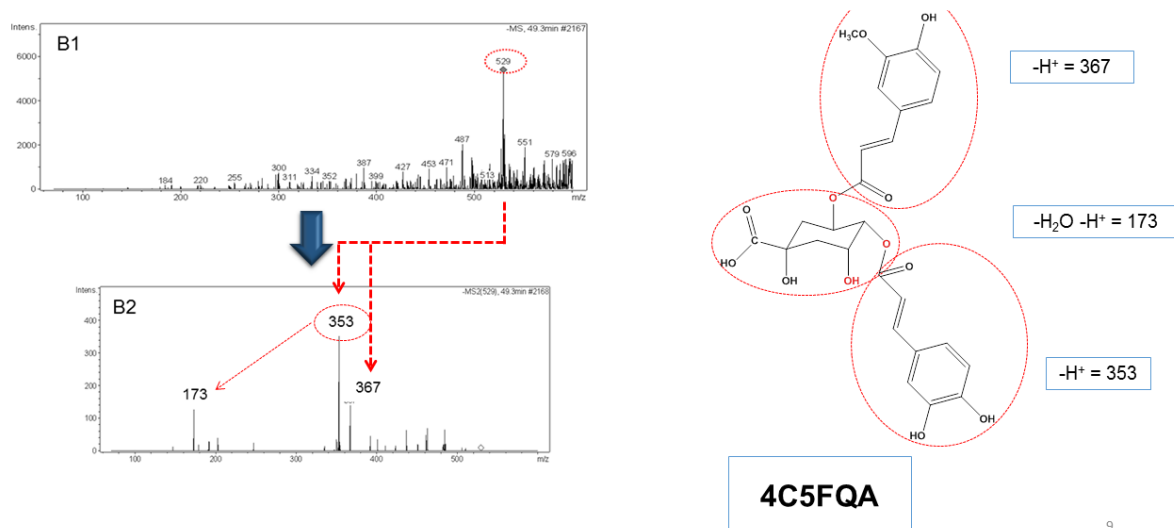


Figura 30: Espectros de massas do composto tentativamente identificado como ácido 4-cafeoil-5-feruloilquínico. Em **B1**: íon desprotonado de m/z 529 e **B2**: seus fragmentos característicos.