



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

Heloisa Patrício Inácio

**EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO SOBRE O PERFIL  
FENÓLICO E POTENCIAL BIOATIVO DE RESÍDUOS OBTIDOS DO  
PROCESSAMENTO DO CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

Florianópolis

2022

Heloisa Patrício Inácio

**EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO SOBRE O PERFIL  
FENÓLICO E POTENCIAL BIOATIVO DE RESÍDUOS OBTIDOS DO  
PROCESSAMENTO DO CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

**Orientadora:** Profa. Dra. Renata Dias de Mello  
Castanho Amboni

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Inácio, Heloisa Patrício

Efeito de diferentes métodos de extração sobre o perfil fenólico e potencial bioativo de resíduos obtidos do processamento do café (*Coffea arabica* L.) / Heloisa Patrício Inácio ; orientador, Renata Dias de Mello Castanho Amboni, 2022.

78 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Subprodutos. 3. Economia circular. 4. Compostos fenólicos. I. Dias de Mello Castanho Amboni, Renata. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Heloisa Patrício Inácio

**Efeito de diferentes métodos de extração sobre o perfil fenólico e potencial bioativo de resíduos obtidos do processamento do café (*Coffea arabica* L.)**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>a</sup> Alícia de Francisco de Casas, Dr.<sup>a</sup>

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.<sup>a</sup> Carlise Beddin Fritzen Freire, Dr.<sup>a</sup>

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.<sup>a</sup> Shirley Kuhnen, Dr.<sup>a</sup>

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em ciência dos alimentos.

---

Prof.<sup>a</sup> Ana Carolina Maisonnave Arisi, Dr.<sup>a</sup>

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.<sup>a</sup> Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dr.<sup>a</sup>

Orientadora

Florianópolis, 2022

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter guiado meus passos, me cuidado e me amparado até aqui.

Ao meu marido, Anthony Thiesen, por estar sempre ao meu lado e por todo amor, parceria e companheirismo, por me apoiar e por vibrar com minhas conquistas. Obrigada por ter sido meu porto seguro e minha força nos momentos que mais precisei.

À minha mãe, Rosana, e ao meu pai, Ivan, por me proporcionarem e me mostrarem que a educação e o conhecimento são os alicerces de tudo. Ao meu irmão, Douglas, por ser meu exemplo de força e coragem. Ao meu avô Dego (*in memoriam*) por sempre me encorajar a conquistar meus sonhos e por me ensinar tanto sobre a vida e sobre o amor.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade, desde a graduação até o mestrado, de um ensino público e de qualidade.

À minha orientadora, Renata Amboni, por toda paciência, confiança, por sempre abraçar minhas ideias e por todo o acolhimento neste período.

Às minhas amigas, Gabriela Santetti e Marina Volpato, por toda amizade, risadas, conselhos, colos, trocas e ajuda desde o início do mestrado. Sem vocês nada disso seria possível.

Às colegas do Laboratório de Frutas e Hortaliças - LFH (especialmente professoras Renata e Carlise, Isabel, Gabriela, Marina, Bruna, Michelly e Aline), por toda parceria e ajuda no desenvolvimento do trabalho e pelas risadas do dia a dia.

Aos professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos (PPGCAL UFSC) por todos os ensinamentos passados e por toda troca.

Ao Rodrigo Hoff e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pela parceria nas análises e por todo conhecimento compartilhado.

À banca examinadora, professoras Alícia, Carlise, Shirley e Vivian, pelo aceite do convite e por todo conhecimento que já me foi dado nesta caminhada.

A todos que de alguma forma contribuíram neste trabalho e na minha formação, meu muito obrigada!

## RESUMO

O café é uma das principais commodities mundiais e seu processamento é responsável por grande geração de resíduos. Dentre os subprodutos da cadeia produtiva do café encontram-se a borra de café e película prateada, os quais possuem compostos bioativos de interesse, como compostos fenólicos. O trabalho objetivou avaliar os extratos da borra de café e película prateada obtidos por três diferentes métodos: extração com auxílio de ultrassom, extração com auxílio de enzimas e na combinação dos métodos de extração assistida por ultrassom e tratamento enzimático. Os extratos foram analisados quanto ao teor de compostos fenólicos totais e perfil fenólico por LC-MS/MS, além das propriedades antioxidantes pelos métodos ABTS, DPPH e ORAC e atividade antibacteriana. As três extrações aplicadas foram eficazes na liberação de compostos fenólicos, tendo sido a extração assistida por ultrassom a mais eficiente com 27,84 mg GAE.g<sup>-1</sup> para borra de café (CG) e 19,98 mg GAE.g<sup>-1</sup> para película prateada (CS). A atividade antioxidante pelo método ABTS foi maior para os extratos na borra de café obtidos pelo método ultrassom e enzima, e a extração assistida por enzima apresentou a melhor atividade antioxidante na película prateada. Já para o método DPPH, a maior atividade antioxidante foi encontrada para as extrações com ultrassom para as duas matrizes. Por fim, o método de ORAC apresentou os maiores resultados para a extração assistida por ultrassom na borra de café. A partir do perfil fenólico foram identificados 29 compostos em ambas as matrizes, e foi observado que a extração assistida por enzimas foi mais eficiente na extração dos compostos fenólicos da borra de café, tendo o ácido clorogênico, ácido caféico e 2,4 DHBA como compostos majoritários; e a extração com os métodos combinados foi a mais eficaz para a película prateada, com o ácido clorogênico, 2,5 DHBA, 3,4 DHB e ácido caféico como os compostos principais. A partir da composição bioativa, a análise de componentes principais mostrou o agrupamento das amostras de acordo com o método de extração empregado. A atividade antibacteriana dos extratos, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas para as duas matrizes, obtidos pelo método combinado apresentaram maior efetividade, variando de 6,24 a 12,48 µg/mL. Em resumo, os extratos aquosos dos subprodutos borra de café e película prateada, principalmente quando utilizado o complexo enzimático como assistente de extração ou a combinação dos métodos, ultrassom e enzima, são alternativas eficazes na recuperação de compostos fenólicos individuais enquanto que, para compostos fenólicos totais, o método auxiliado por ultrassom obteve resultados superiores. Além disso, as metodologias de extração aplicadas são alternativas ambientalmente seguras e promovem a economia circular,

possibilitando a reutilização de compostos naturais, transformando resíduos em matéria-prima para a extração de compostos de interesse.

**Palavras-chaves:** subprodutos; economia circular; compostos fenólicos

## ABSTRACT

Coffee is one of the world's main commodities and its processing is responsible for a large amount of waste. Among the by-products of the coffee production chain are coffee grounds and silver film, which have bioactive compounds of interest, such as phenolic compounds. The study aimed to evaluate the extracts of coffee grounds and silver film obtained by three different methods: extraction with the aid of ultrasound, extraction with the aid of enzymes and in the combination of ultrasound-assisted extraction methods and enzymatic treatment. The extracts were analyzed for total phenolic compounds content and phenolic profile by LC-MS/MS, in addition to antioxidant properties by ABTS, DPPH and ORAC methods and antibacterial activity. The three extractions applied were effective in the release of phenolic compounds, the ultrasound-assisted extraction being the most efficient with 27.84 mg GAE.g<sup>-1</sup> for coffee grounds (GC) and 19.98 mg GAE.g<sup>-1</sup> for silverskin (CSS). The antioxidant activity by the ABTS method was higher for the extracts in the coffee grounds obtained by the ultrasound and enzyme method, and the enzyme-assisted extraction showed the best antioxidant activity in the silverskin. As for the DPPH method, the highest antioxidant activity was found for the ultrasound extractions for the two matrices. Finally, the ORAC method showed the highest results for the ultrasound-assisted extraction of coffee grounds. From the phenolic profile, 29 compounds were identified in both matrices, and it was observed that the enzyme-assisted extraction was more efficient in the extraction of phenolic compounds from coffee grounds, with chlorogenic acid, caffeic acid and 2,4 DHBA as compounds majority; and the extraction with the combined methods was the most effective for the silver film, with chlorogenic acid, 2,5 DHBA, 3,4 DHB and caffeic acid as the main compounds. From the bioactive composition, the analysis of principal components showed the grouping of samples according to the extraction method used. The antibacterial activity of the extracts, against Gram-positive and Gram-negative bacteria for the two matrices, obtained by the combined method showed greater effectiveness, ranging from 6.24 to 12.48 µg/mL. In general, the aqueous extracts of the by-products of coffee grounds and silver film, mainly when using the enzymatic complex as an extraction assistant or the combination of methods, ultrasound and enzyme, are effective alternatives in the recovery of individual phenolic compounds while, for phenolic compounds total, the ultrasound-assisted method obtained superior results. In addition, the extraction methodologies applied are environmentally safe alternatives and promote the circular economy,

enabling the reuse of natural compounds, transforming waste into raw material for the extraction of compounds of interest.

**Keywords:** by-products; circular economy; phenolic compounds

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estruturas do fruto do café alguns subprodutos .....	18
Figura 2 Etapas do processamento do café e produção de resíduos .....	22
Figura 3 Mecanismo de ação das bolhas de cavitação em folhas de boldo .....	29
Figura 4 Esquema de um sistema ultrassônico .....	30
Figura 5 Mecanismo de ação das endo, exo e $\beta$ -glucanases na hidrólise da celulose .....	32
Figura 6 Reação de auto-oxidação .....	33
Figura 7 Teor de compostos fenólicos totais (a) e atividade antioxidante (b, c, d) dos extratos aquosos de borra de café (CG) e película prateada (CS) obtidos utilizando-se os métodos de extração por ultrassom, assistido por enzimas e pela combinação ultrassom e enzimas. ....	42
Figura 8 Análise de componentes principais da composição fenólica individual, polifenóis totais e capacidade antioxidante da borra de café (A) e película prateada (B).....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição química média da borra de café .....	24
Tabela 2 Compostos fenólicos presentes na borra de café .....	25
Tabela 3 Composição química média da película prateada.....	26
Tabela 4 Principais características da enzima Viscozyme L ®.....	37
Tabela 5 Perfil fenólico das amostras de borra de café e película prateada obtidos pelos diferentes métodos de extração.....	47
Tabela 6 Concentração mínima inibitória (MIC) de amostras de borra de café e película prateada obtidos por diferentes métodos de extração frente dezessete bactérias patogênicas .	53

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
2.1	OBJETIVO GERAL .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
3.1	CAFÉ ( <i>Coffea</i> L.) .....	17
3.2	PROCESSAMENTO DO CAFÉ .....	19
3.3	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ .....	20
3.3.1	<b>Borra de café</b> .....	23
3.3.2	<b>Película prateada</b> .....	25
3.4	EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ .....	27
3.4.1	Extração assistida por ultrassom .....	28
3.4.2	Extração assistida por enzimas .....	30
3.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	32
3.6	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
4.1	RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ ( <i>Coffea arábica</i> L.) .....	36
4.2	PREPARO E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS .....	36
4.3	DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> .....	37
4.3.1	<b>Determinação dos teores de Compostos Fenólicos Totais</b> .....	37
4.3.2	<b>Potencial antioxidante pelo método ABTS</b> .....	38
4.3.3	<b>Potencial antioxidante pelo método DPPH</b> .....	38
4.3.4	<b>Potencial antioxidante por absorção do radical oxigênio (ORAC)</b> .....	38
4.4	COMPOSIÇÃO FENÓLICA INDIVIDUAL.....	39
4.5	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	39
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	42
5.1	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> .....	42
5.2	COMPOSIÇÃO FENÓLICA INDIVIDUAL.....	47
5.2.1	<b>Análise de componentes principais (PCA)</b> .....	51

5.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	53
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Mundialmente em destaque pelo seu consumo, a popularidade do café (*Coffea L.*) não está relacionada apenas ao aspecto cultural, mas também com as propriedades inerentes à bebida, como seu poder estimulante e presença de compostos bioativos. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, e a cafeicultura se encontra entre os maiores ramos do agronegócio brasileiro, tendo sido produzido em 2020 cerca de 3,8 milhões de toneladas (ABIC, 2019; BORÉM *et al.*, 2008; DURÁN *et al.*, 2017; OIC, 2021).

Apesar de ser uma das principais *commodities* do mundo e considerada uma potência econômica, o setor de cafeicultura é um grande produtor de resíduos, uma vez que aproximadamente metade do fruto do café é descartado durante o processamento, mesmo dispondo de substâncias biologicamente ativas e de interesse para o consumo humano. O reaproveitamento destes componentes tem sido estudado e aplicado na utilização de outras vertentes, como alimentação animal (MALTA *et al.*, 2015), fármacos e cosméticos (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; RAMIREZ-CORONEL *et al.*, 2004), produção de enzimas (PEÑA-MARAVILLA *et al.*, 2017) ou elaboração de biocombustíveis (LIU *et al.*, 2018; ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012). Dentre os resíduos gerados no processamento do café, destacam-se a casca, a borra de café e a película prateada, todos com propriedades biológicas de interesse, de acordo com suas composições (DURÁN *et al.*, 2017).

A borra de café é obtida após todos os processos de extração de sua bebida, seja ele o café *espresso*, coado, por “prensa francesa” ou para a produção de café solúvel. A quantidade deste resíduo é extremamente alta, equivalendo a aproximadamente 480 kg de borra para cada tonelada de café cru (MUSSATTO *et al.*, 2011; PUJOL *et al.*, 2013). Dentre os componentes majoritários deste subproduto encontram-se açúcares complexos e simples, proteínas, lipídios e cinzas. Ademais, a borra de café possui substâncias bioativas capazes de conferir características funcionais ao resíduo, podendo estar relacionadas à alta atividade antioxidante, antibacteriana, antiviral e anti-inflamatória (BALLESTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO, 2014; KOVALCIK *et al.*, 2018).

A película prateada (ou *Silverskin*), também obtida no processamento do café, é obtida durante o processo de torrefação dos grãos e compreende cerca de 4,2 % da semente do café, sendo produzida 1 tonelada de película prateada a cada 120 toneladas de café torrado. Constituída pelo tegumento delgado que recobre os grãos de café, é formada em sua maior parte por polissacarídeos, além de outros açúcares, proteínas, lipídios, entre outros. Outrossim, a presença de metabólitos secundários, como alcaloides e polifenóis, confere alta atividade

antioxidante a este subproduto, podendo ser aplicado em diversos produtos, como fertilizantes orgânicos (CARNIER *et al.*, 2019), na obtenção de compostos bioativos (CONDE; MUSSATTO, 2016), como ingrediente funcional para produtos alimentícios (IRIONDO-DEHOND *et al.*, 2019; MESÍAS; DELGADO-ANDRADE, 2017), além da validação para uso tópico dos extratos (RODRIGUES *et al.*, 2015).

Ainda que a literatura, em sua maioria, apresente que a extração de compostos fenólicos por solventes orgânicos seja mais eficiente, a utilização destes solventes apresenta uma série de desvantagens, como toxicidade ao ambiente e aos manipuladores, baixa seletividade de extração e decomposição de compostos termolábeis (GLIGOR *et al.*, 2019). Deste modo, pesquisas atuais estão seguindo outras vertentes, com métodos inovadores e ambientalmente seguros, com a redução de solventes, energia e geração de resíduos, denominados de “extrações verdes”, utilizando auxiliares de extrações em solventes aquosos, tais como extrações assistidas por ultrassom (MELÉNDEZ, 2012; WEN *et al.*, 2018), micro-ondas (PETTINATO; CASAZZA; PEREGO, 2019) e por enzimas (SCULLY; JAISWAL; ABU-GHANNAM, 2016).

Com intuito de valorizar e agregar valor à estes resíduos, o presente estudo tem como objetivo avaliar três diferentes métodos de extração, bem como analisar e caracterizar a composição fenólica e as atividades antioxidantes e antibacterianas de todos os extratos, a fim de apresentar e validar estes resíduos como uma promissora base de estudos em busca de novas fontes de compostos bioativos, podendo ser utilizados para diversas finalidades, dentre elas na manutenção da horticultura como bioherbicidas, na indústria alimentícia ou indústria química.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar os subprodutos borra de café e película prateada oriundos do processamento do café (*Coffea arabica* L.) quanto à composição fenólica individual, potencial antioxidante e antimicrobiano, a partir de extrações aquosas com auxiliares de extração.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Realizar a extração aquosa da película prateada e da borra de café com auxílio de ultrassom, com auxílio de enzimas e com a combinação de ultrassom com posterior tratamento enzimático;
- b) Avaliar o teor de compostos fenólicos totais dos extratos;
- c) Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos através dos métodos ABTS, DPPH e ORAC;
- d) Identificar e quantificar os principais compostos fenólicos presentes nos extratos por LC-MS/MS;
- e) Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos frente à onze bactérias Gram-positivas e seis bactérias Gram-negativas.

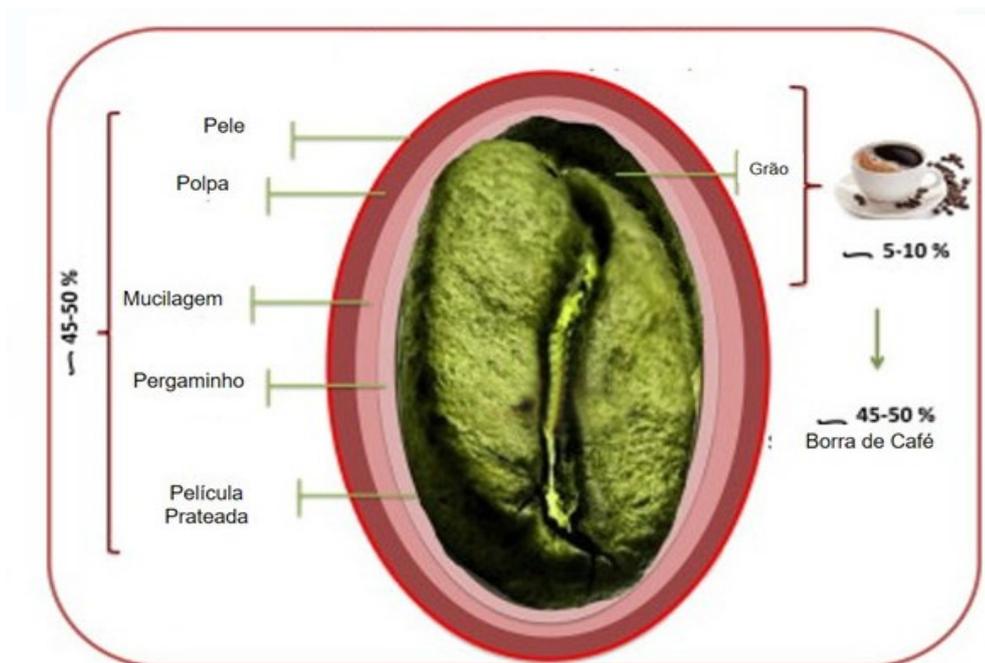
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CAFÉ (*Coffea* L.)

O café é a segunda bebida mais consumida no mundo, ficando atrás apenas da água potável (ABIC, 2018; BUTT; SULTAN, 2011). A notoriedade da bebida se dá, além dos aspectos culturais, por suas propriedades inerentes, como a capacidade estimulante e a existência de compostos benéficos para a saúde humana, como compostos fenólicos e diterpenos. O Brasil se destaca mundialmente como o principal produtor e exportador de café, produzindo em 2020, cerca de 3,8 milhões de toneladas de café. No *ranking* mundial, é seguido por Vietnã e Colômbia (ABIC, 2019; BRASIL, 2019; OIC, 2021).

Pertencente à família das *Rubiaceas*, o café é o fruto do cafeeiro, caracterizado por sua polpa doce e formado por exocarpo (pele e casca), mesocarpo (polpa e mucilagem), endocarpo (película prateada ou *silverskin*) e endosperma (semente), ilustrados na Figura 1. No fruto maduro, o endocarpo pode abranger 5 a 7 camadas de células com função estrutural, composto majoritariamente por polissacarídeos insolúveis, como celulose e hemicelulose. O mesocarpo, conhecido como mucilagem, é responsável pela reserva energética do fruto, contendo açúcares simples e complexos, que dependendo do processamento do grão, podem migrar para a semente, conferindo notas doces para a bebida. À medida que o fruto amadurece, há ação de enzimas pectinolíticas que alteram a estrutura do mesocarpo, tornando o fruto macio (BORÉM *et al.*, 2008; DURÁN *et al.*, 2017).

Figura 1 Estruturas do fruto do café alguns subprodutos



Fonte: Campos-Vega *et al.* (2015).

Existem cerca de 500 espécies de café, sendo que as mais consumidas e comercializadas são o café Arábica (*Coffea arabica*) e o café Robusta (*Coffea canephora*). Sua composição pode variar de acordo com as condições ambientais de plantio e os tratamentos submetidos no pós-colheita. O café Arábica é o mais consumido e valorizado, uma vez que suas características sensoriais são mais suaves e agradáveis, provavelmente devido ao maior teor de carboidratos solúveis (como frutose, glicose, galactose, arabinose e sacarose) em comparação com outras espécies (SCHOLZ *et al.*, 2011; TEIXEIRA; PASSOS; MENDES, 2016).

Para a obtenção da bebida do café, os grãos verdes são submetidos ao processo de torrefação, que promove mudanças sensoriais no aroma, textura, cor e sabor, decorrentes de uma série de transformações químicas e bioquímicas no grão. A combinação da elevada temperatura do processo com os carboidratos presentes nos grãos acarreta a formação de melanoidinas, que são responsáveis pela coloração marrom característica, como consequência da reação de *Maillard*. Ainda, a alta temperatura também permite a formação de centenas de compostos voláteis, que contribuem para o aroma característico. Assim, o teor de carboidratos totais diminui no café torrado, podendo variar de 38 a 42% (base seca), enquanto que a concentração de ácidos clorogênicos (CGAs) aumenta para cerca de 3 % (PAN *et al.*, 2016).

Dentre as substâncias já existentes no grão verde e as formadas durante o processamento, encontram-se os compostos biologicamente ativos, responsáveis pela proteção

da planta contra predadores e inativação de corpos reativos pró-oxidantes ou radicais livres, causados pelo estresse oxidativo das células vegetais. Os compostos bioativos mais encontrados no café são os polifenóis (ácido clorogênico e seus derivados), metilxantinas (cafeína, teobromina e trioofilina), diterpenos (cafestol e kahweol) e trigonelina. Estes, além de serem responsáveis por características sensoriais na bebida de café, podem estar relacionados a propriedades funcionais na saúde humana (CIARAMELLI; PALMIOLI; AIROLDI, 2019; MESSINA *et al.*, 2015).

Os compostos fenólicos mais encontrados no café são o ácido cafeico e seus derivados, principalmente os ácidos clorogênicos (CGAs), formados a partir da esterificação de ácidos trans-cinâmicos, como o ácido quínico, podendo apresentar-se de diferentes formas isoméricas, de acordo com a posição da ligação éster; sendo os mais comumente encontrados o ácido 3-O-cafeoilquínico (3-CQA), 4-O-ácido cafeoilquínico (4-CQA) e ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA). Além destes isômeros, outros ácidos orgânicos são encontrados no café, e estão relacionados com a adstringência, amargor e acidez da bebida, além de atuarem como antioxidantes e apresentarem atividades hepatoprotetora, hipoglicêmica e antiviral (FARAH, 2012; IWAI *et al.*, 2004).

### 3.2 PROCESSAMENTO DO CAFÉ

O cuidado com o tratamento do café no pós-colheita é um dos importantes fatores que influenciam na boa qualidade da bebida, uma vez que durante o processamento mais de 800 compostos voláteis são formados, conferindo propriedades sensoriais características (BORÉM *et al.*, 2008). Para que sejam formadas e mantidas as características sensoriais desejadas, é necessário um pré-processamento ideal, sendo o método de secagem, o que exerce maior influência nestas características (LACERDA-FILHO *et al.*, 2006).

O processamento pós-colheita pode se dar por três principais métodos: via seca, úmida e semi-úmida. O tratamento por via seca consiste na exposição do grão inteiro após a lavagem em um terreiro sem a retirada do exocarpo. Este procedimento é considerado uma pré-secagem e visa a redução da umidade e a diminuição do tempo necessário em secadores mecânicos. Por via úmida, podem ser produzidos grãos descascados (a mucilagem não é removida do grão), despulpados (são descascados mecanicamente e a mucilagem é removida por fermentação biológica) e desmucilados (a mucilagem é removida mecanicamente). Já pela via semi-úmida, a remoção da mucilagem ocorre antes da secagem (BORÉM *et al.*, 2008, DURÁN *et al.*, 2017).

Nas diferentes etapas do processamento, desde o pré até o pós-colheita do café, a presença natural de microrganismos e o processo fermentativo pode estar associado também com a qualidade do produto final, uma vez que, na polpa do café há grande incidência de açúcares fermentáveis. Por diferentes vias de secagem, o café é fermentado para auxiliar na remoção da mucilagem, podendo interferir diretamente nas características sensoriais desejáveis do grão. No café existem dois tipos de fermentação, a fermentação aeróbica (ou fermentação seca) e a fermentação anaeróbica (sob a água). Nestes dois casos, as fermentações devem ocorrer de forma controlada se o objetivo for aumentar a qualidade da bebida, pois existe o risco de fermentações indesejáveis (como fermentação butírica e propiônica), podendo causar modificações sensoriais irreversíveis e não desejadas (GUMMADI; PANDA, 2003; PEREIRA, 2015; SARRAZIN *et al.*, 2000). Lee *et al.* (2016) analisaram a fermentação do café com um fungo específico (*Rhizopus oligosporus*) objetivando a modulação do aroma e, observaram que no perfil volátil do café após a fermentação houve um aumento de fenóis voláteis totais decorrentes à degradação dos ácidos cafeico e ferúlico, gerando um aumento de 36% do total de voláteis presentes no grão; além de, através da proteólise, aumenta os aminoácidos disponíveis no meio, contribuindo para o aroma desejável do café.

Após a etapa de secagem e despulpamento dos frutos é realizada a torrefação dos grãos, que consiste no aumento progressivo da temperatura. Esta técnica está relacionada com a formação de novas substâncias que fornecem características singulares para a bebida, através da degradação de carboidratos e ácidos orgânicos presentes, conferindo cor, aroma e sabor característicos, sendo que diferentes níveis de torrefação geram diferentes tipos de bebidas (ANDRADE *et al.*, 2012). Após o processo de torrefação, o grão é moído e posteriormente pode ser destinado a dois principais setores: instantaneização e solubilização do café ou embalado para ser consumido em pó para filtro ou máquinas tipo espresso (VEGRO; CARVALHO, 1994).

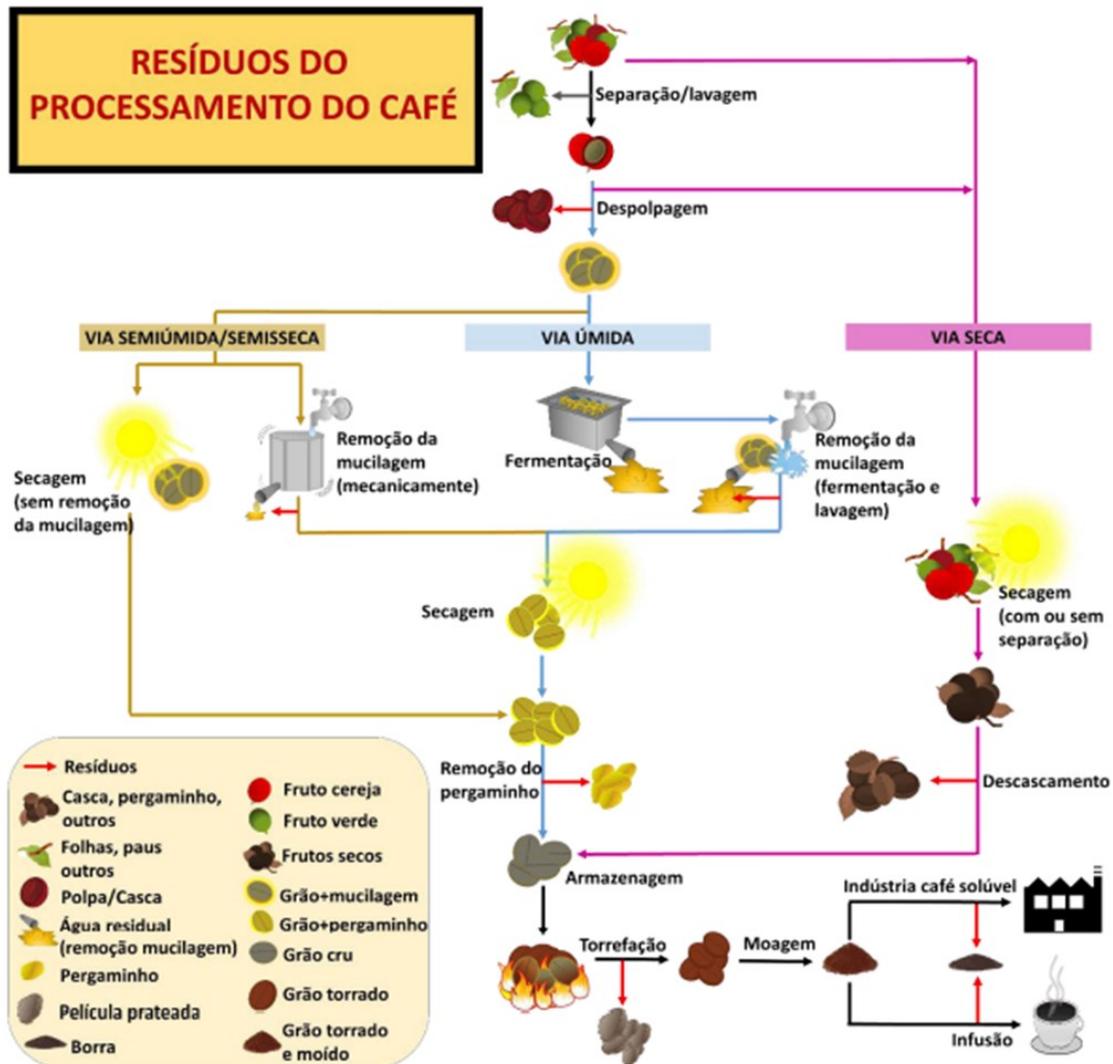
### 3.3 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ

A geração de resíduos e/ou subprodutos é inerente aos mais diferentes setores produtivos. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), cerca de 1/3 do alimento que é produzido anualmente no mundo é desperdiçado ou perdido, o que configura cerca de 1,3 bilhão de toneladas de alimentos. A cadeia de produção agrícola é uma das principais responsáveis por essa perda. Seus resíduos são classificados em: da colheita ou do beneficiamento (talos, folhas e raízes, por exemplo), agroindustriais ou do

processamento (cascas, pó e bagaço) e produzidos após o consumo/utilização de alimentos processados (FAO, 2013; SANTANA-MÉRIDAS *et al.*, 2012). O gerenciamento dos resíduos agroindustriais pode ser realizado de diversas maneiras, sendo culturalmente dispostos em aterros, podendo causar disfunções ambientais, como lixiviação e emissão de gases poluentes decorrentes da fermentação por microrganismos. Ademais, a eliminação dos resíduos pode ocorrer através de incineração, resultando em poluição atmosférica e ambiental, além de ser pouco eficiente devido ao alto teor de água contido neste material (VAN DYK *et al.*, 2013). Além disso, o descarte destes materiais pode acarretar na perda de biomassa e de valiosos compostos que apresentam alto potencial de utilidade em importantes setores econômicos, nos quais configurariam matéria-prima de baixo custo (CAPSON-TOJO *et al.*, 2016; COSTA-FILHO *et al.*, 2017; SANTANA-MÉRIDAS *et al.*, 2012; RAVIDRAN; JAISWAL, 2016).

A produção de café é um dos principais setores produtivos no Brasil. Entretanto, grande quantidade de subprodutos/resíduos são gerados em seu processamento (Figura 2). Mais da metade do fruto do café não é utilizado, podendo ser convertido em fonte de contaminação ambiental, se não tratado corretamente (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

Figura 2 Etapas do processamento do café e produção de resíduos



Fonte: Durán *et al.* (2017)

Entre os resíduos gerados destacam-se a borra de café e a película prateada (*Silverskin*). Por serem gerados em grande quantidade e possuírem componentes ativos e com valor biológico considerável, são viáveis para reutilização. Essas características, junto ao baixo custo e alto valor agregado, possibilitam que estes resíduos sejam empregados de diferentes formas, como ingredientes para formulação de alimentos, fármacos e cosméticos, na produção de enzimas, na alimentação animal ou para produção de biocombustíveis (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

### 3.3.1 Borra de café

Diferentes tipos de extração são utilizados para a obtenção da bebida do café a partir do grão torrado e moído. Estes processos objetivam a transferência dos compostos solúveis e voláteis para a água e, dentre alguns exemplos de processos, temos o café *espresso*, coado, ou utilizando “prensa francesa”. Além da obtenção da bebida final propriamente dita, outra vertente muito explorada na indústria de café é a produção de café solúvel, onde o grão torrado e moído passa pelo processo de extração com água pressurizada (175 °C), seguido de concentração e secagem, até que se obtenha o café solúvel. Em todos os tipos de extração mencionados, a quantidade de resíduo gerado é extremamente alta, sendo produzida cerca de 480 kg de borra para cada tonelada de café cru, já considerando as perdas durante a torrefação (MUSSATTO *et al.*, 2011, PUJOL *et al.*, 2013).

Tendo em vista esta alta geração deste resíduo, estudos contemplam sua caracterização para posterior reaproveitamento em diversas áreas. Como já mencionado, a composição do café pode variar por diferentes fatores, como espécie e variedade, condição de cultivo e até por fermentação. Contudo, ainda que a borra seja derivada do grão e possa apresentar essas variações, por passar por diferentes processos de extração, a composição da borra não apresenta variações significativas (BALLESTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO, 2014).

Assim como na película prateada, os polissacarídeos compõem a maior parte da borra, onde os açúcares presentes são polimerizados em estruturas celulósicas e hemicelulósicas. A diferença é que na borra a hemicelulose é formada principalmente por manoses, e na película prateada, por xiloses. Ainda, outros açúcares como galactose, glucose e arabinose são encontrados em sua composição, além de outros componentes, como apresentado na Tabela 1 (BALLESTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO, 2014).

Tabela 1 Composição química média da borra de café

<b>Componentes químicos</b>	<b>Composição (g.100g<sup>-1</sup> – base seca)</b>
Celulose (Glucose)	12,40 ± 0,79
Hemicelulose	39,10 ± 1,94
Arabinose	3,60 ± 0,52
Manose	19,07 ± 0,85
Galactose	16,43 ± 1,66
Lignina	23,90 ± 1,70
Insolúvel	17,59 ± 1,56
Solúvel	6,31 ± 0,37
Lipídios	2,29 ± 0,30
Cinzas	1,30 ± 0,10
Proteína	17,44 ± 0,10
Nitrogênio	2,79 ± 0,10
Carbono/Nitrogênio	16,91 ± 0,10
Fibra Alimentar Total	60,46 ± 2,19
Insolúvel	50,78 ± 1,58
Solúvel	9,68 ± 2,70

Fonte: Adaptado de Ballesteros, Teixeira e Mussatto (2014)

A presença de substâncias bioativas atribui características funcionais para a borra de café. O ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico, cafeína, trigonelina, taninos e flavonoides presentes neste resíduo, por não serem extraídos completamente na obtenção da bebida, estão diretamente relacionados à alta atividade antioxidante, antibacteriana, antiviral e anti-inflamatória deste subproduto (KOVALCIK *et al.*, 2018). Na Tabela 2, estão apresentados os principais compostos fenólicos presentes na borra de café.

Tabela 2 Compostos fenólicos presentes na borra de café

Compostos fenólicos	(mg.g <sup>-1</sup> )
Ácido Clorogênico	1,8-5,6
Catequina, Epicatequina	0,3-0,6
Ácido Cafeico	0,03-0,07
Ácido Elágico	0,06-0,1
Ácido Ferrúlico	0,004-0,01
Ácido Gálico	1,3-2,5
Ácido Protocatecuico	Nd
Rutina	0,06
Quercitina	0,96-1,0
Ácido Tanico	nd

Fonte: Adaptado de Lopez-Barrera *et al.* (2016)

Estudos para o reaproveitamento destes componentes, nos mais diferentes ramos, estão sendo realizados nos últimos anos. A aplicação da borra de café, de acordo com sua composição, foi avaliada na transesterificação da fração lipídica para produção de biodiesel (LIU *et al.*, 2017) e em biorefinarias para produção de biocombustíveis (MATA *et al.*, 2018); na utilização como ingrediente em produtos de panificação (MARTINEZ-SAEZ *et al.*, 2017, ALI *et al.*, 2018), na extração de substâncias de interesse como carotenoides e alcaloides (OBRUCA *et al.*, 2015) e na formulação de bioherbicidas, por possuir atividade alelopática (HARDGROVE; LIVESLEY, 2016; SANT'ANNA *et al.*, 2017).

### 3.3.2 Película prateada

Dentre os principais resíduos gerados no processamento do café, a película prateada (ou *Silverskin*) é obtida durante o processo de torrefação e surge como potencial objeto de estudo, uma vez que possui componentes de interesse para a indústria, como carboidratos, peptídeos e compostos que possuem bioatividades, podendo ser utilizado na indústria alimentícia (IRIONDO-DEHOND *et al.*, 2019; MESÍAS; DELGADO-ANDRADE, 2017) e indústria química (CARNIER *et al.*, 2019; CONDE; MUSSATTO, 2016). Morfologicamente, a película prateada encontra-se em contato direto com o grão do café, apresentando composição semelhante. Além disso, por ser resíduo de um processo que envolve temperatura elevada, é

considerada estável devido à baixa umidade (GALANAKIS, 2017). Esta película corresponde a cerca de 4,2 % do peso total da semente, ou seja, a cada 120 toneladas de café torrado, é gerada 1 tonelada de película prateada (ALVES *et al.*, 2017).

A maioria dos subprodutos/resíduos sólidos do processamento do café é formada por polissacarídeos como celulose e hemicelulose, sendo a fração celulósica a mais abundante na película prateada. Além destes polissacarídeos, também são encontrados galactose, arabinose e manose, bem como lignina solúvel e insolúvel, lipídeos, cinzas, proteínas, nitrogênio, fração carbono/nitrogênio e fibra alimentar solúvel e insolúvel (Tabela 3) (BALLESTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO, 2014).

Tabela 3 Composição química média da película prateada

<b>Componentes químicos</b>	<b>Composição (g.100 g<sup>-1</sup> – base seca)</b>
Celulose (Glucose)	23,77 ± 0,09
Hemicelulose	16,68 ± 1,30
Arabinose	3,54 ± 0,29
Manose	1,77 ± 0,06
Galactose	3,76 ± 1,27
Xilose	7,61 ± 0,02
Lignina	28,58 ± 0,46
Insolúvel	20,97 ± 0,43
Solúvel	7,61 ± 0,16
Lipídios	3,78 ± 0,40
Cinzas	5,36 ± 0,20
Proteína	18,69 ± 0,10
Nitrogênio	2,99 ± 0,10
Carbono/Nitrogênio	14,41 ± 0,10
Fibra Alimentar Total	54,11 ± 2,19
Insolúvel	45,98 ± 0,18
Solúvel	8,16 ± 0,90

Fonte: Adaptado de Ballesteros, Teixeira e Mussatto (2014)

Além da presença dos macronutrientes, são encontrados metabólitos secundários como alcaloides e compostos fenólicos, principalmente as metilxantinas e ácidos clorogênicos e seus

isômeros, sendo os mesmos encontrados no grão. Estes componentes conferem ao resíduo alta capacidade antioxidante, demonstrando-o como potencial fonte de compostos bioativos (CONDE; MUSSATTO, 2016).

Estudos vêm sendo realizados a fim de estabelecer as aplicações deste subproduto e suas propriedades, principalmente a partir da determinação da atividade antioxidante de extratos, como aplicação em cosméticos (RODRIGUES *et al.*, 2015), substrato para biodiesel (PROCENTESE *et al.*, 2019), como ingrediente funcional para alimentos (MESÍAS; DELGADO-ANDRADE, 2017, IRIONDO-DEHOND *et al.*, 2019) e como fertilizantes (CARNIER *et al.*, 2019).

### 3.4 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DO RESÍDUO DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ

Existem inúmeras metodologias de extração para compostos fenólicos, uma vez que sua solubilidade pode variar de acordo com o solvente utilizado. Nesse sentido, não existe uma metodologia universal ou que abranja a extração de todos os compostos fenólicos de interesse, onde a otimização da extração pode se dar pela interpolação de solventes ou métodos de extração (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Em amostras de borra de café, a maioria dos estudos envolvem solventes polares para a extração de compostos fenólicos. Panusa *et al.* (2013) ao determinarem o teor de compostos fenólicos, utilizando como solvente etanol e água, encontraram uma faixa de 11,83 a 28,26 mg GAE.g<sup>-1</sup> de amostra. Os mesmos autores extraíram os compostos fenólicos utilizando apenas água como solvente extrator, sem assistentes de extração, apenas banho a 60 °C durante 30 minutos, e obtiveram valores inferiores, entre 6,33 e 19,62 mg GAE.g<sup>-1</sup>.

A película prateada também foi alvo de estudos com diferentes solventes de extração. Costa *et al.* (2014) utilizaram uma mistura hidroalcoólica (1:1 etanol e água) para extração de compostos fenólicos, obtendo um extrato com 15,13 mg GAE.g<sup>-1</sup>. Já Ballesteros, Teixeira e Mussatto (2014) demonstraram que dentre alguns solventes orgânicos e inorgânicos como acetona, etanol, metanol e água, a extração mais eficiente para compostos fenólicos foi realizada com etanol e água, com rendimento de 12,81 mg GAE.g<sup>-1</sup> de amostra.

Apesar da maioria dos estudos de extração de compostos fenólicos demonstrar que os solventes orgânicos são mais eficientes, a utilização destes solventes apresenta uma série de desvantagens, como toxicidade ao ambiente e aos manipuladores, baixa seletividade de

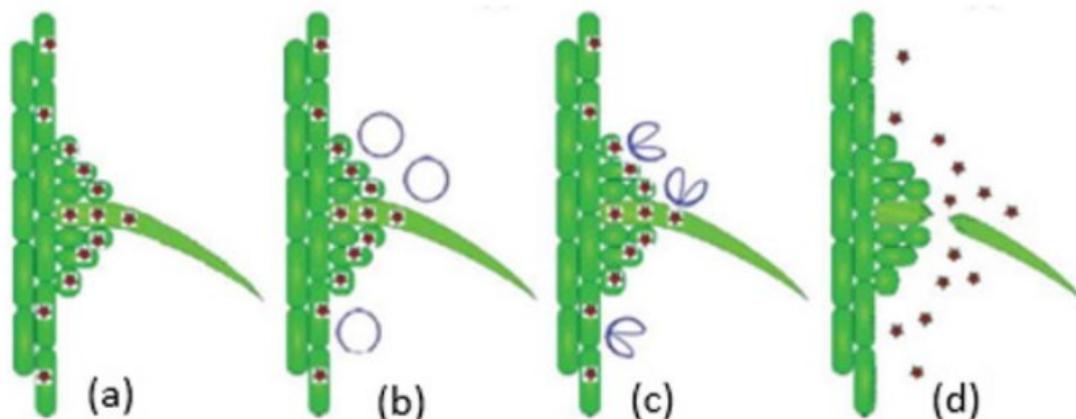
extração e decomposição de compostos termolábeis (GLIGOR *et al.*, 2019). Para tanto, pesquisas estão sendo realizadas com métodos inovadores e ambientalmente seguros, com a redução de solventes, energia e geração de resíduos, denominados de “extrações verdes”, tais como extrações assistidas por ultrassom (MELÉNDEZ, 2012; WEN *et al.*, 2018), micro-ondas (PETTINATO; CASAZZA; PEREGO, 2019) e por enzimas (SCULLY; JAISWAL; ABU-GHANNAM, 2016).

#### 3.4.1 Extração assistida por ultrassom

A utilização de ultrassom pode auxiliar na extração de compostos fenólicos e está sendo utilizada como uma tecnologia emergente, em diversas matrizes vegetais (VUONG *et al.*, 2015), promovendo a diminuição dos solventes orgânicos utilizados, melhorando tempo e consumo de energia, além da otimização na recuperação dos compostos de interesse. Ultrassons são ondas mecânicas sonoras que se diferenciam do som audível por possuírem frequências maiores que 20 kHz. Estas ondas se propagam em meios sólidos, líquidos ou gasosos, estimulando um deslocamento longitudinal das partículas presentes, promovendo compressão e expansão da matéria. Este deslocamento forma pequenos vácuos no meio de propagação, chamados de microbolhas de cavitação, que a partir da compressão e expansão gerados pelo método, ocorre a implosão das bolhas, liberando elevada quantidade de calor e pressão no meio (O'DONNELL *et al.*, 2010; ESCLAPEZ *et al.*, 2011).

Em matrizes sólidas, a utilização do ultrassom, que permite a geração das microbolhas, age na colisão das esferas geradas contra as superfícies alvo, ocasionando certa turbulência e posterior circulação do líquido de extração. Estas colisões fazem, que por cisalhamento, as células das paredes celulares sejam quebradas, facilitando o acesso do solvente extrator aos compostos de interesse ali complexados e, aumentando a área de contato da extração (CASTRO, CAPOTE, 2007; WEN *et al.*, 2018). Além disso, o aumento da temperatura e pressão gerados no meio auxilia no aumento da solubilidade dos analitos, favorecendo a extração (VEILLET *et al.*, 2010). O mecanismo de ação das ondas ultrassônicas é demonstrado na Figura 3.

Figura 3 Mecanismo de ação das bolhas de cavitação em folhas de boldo

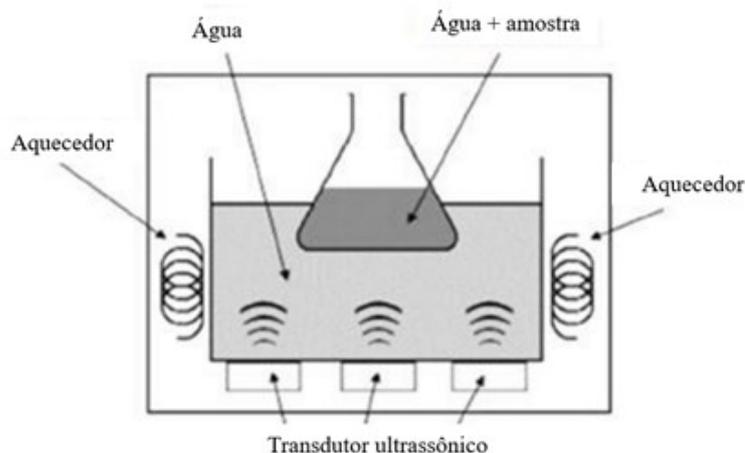


\* (a) Perfil da planta com um tricoma na superfície da folha, (b) Geração de uma bolha de cavitação, (c) Colapso da bolha de cavitação que gera um micro-jato direcionado para a superfície e (d) Abrasão da superfície, quebra do tricoma e liberação de material solúvel no meio circundante

Fonte: Adaptado de Chemat *et al.* (2017).

Todo o processo pode ser efetuado em diferentes equipamentos de ultrassom, sendo o mais utilizado o banho ultrassônico (Figura 3), que é um equipamento simples e de fácil manipulação. Entretanto, para que não haja perdas dos analitos de interesse, é importante o conhecimento prévio da amostra e cuidado durante o processo, pois o excesso de tempo na utilização do ultrassom pode gerar um aumento exacerbado da temperatura, podendo resultar na degradação dos compostos termolábeis (SHIRSATH *et al.*, 2012). Além da temperatura, outros parâmetros devem ser avaliados na escolha do ultrassom como assistente de extração. A frequência, outro parâmetro crucial para a ação do método, geralmente é utilizada entre 20 e 40 kHz, e determina o tamanho das bolhas de cavitação geradas sendo inversamente proporcional à intensidade (ESCALAPEZ *et al.*, 2011). Segundo Mulet *et al.* (2003), ultrassom de alta intensidade e baixa frequência (20 a 300 kHz) geram mais potência, produzindo cavitações mais violentas e subsequente maior ação de ruptura. Além disso, a cavitação também pode ser influenciada por condições como presença de gases no meio, tamanho das partículas sólidas, pressão aplicada, viscosidade, tensão superficial, entre outros (CASTRO, CAPOTE, 2007; CÁRCEL *et al.*, 2012; SHARAYEI *et al.*, 2019).

Figura 4 Esquema de um sistema ultrassônico



Fonte: Adaptado de Chemat; Zille-Huma; Khan (2011).

Para compostos bioativos, o ultrassom é reportado como eficiente como assistente de extração na literatura (SALEH *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2017; OKUR *et al.*, 2021). Wen *et al.* (2019) analisaram o efeito da extração assistida por ultrassom utilizando água e metanol-água como solventes em amostras de película prateada e observaram que a utilização do ultrassom contribuiu expressivamente para o aumento do conteúdo fenólico e da atividade antioxidante dos extratos quando comparado com o controle (extração apenas com banho-maria). Ainda, para amostras de borra de café, Caballero-Galván *et al.* (2018) observaram que a extração assistida por ultrassom gerou melhores resultados em relação a concentração de ácido clorogênico frente à extração por Soxhlet, além de apresentar vantagem no menor tempo de extração.

### 3.4.2 Extração assistida por enzimas

A utilização de enzimas como auxiliares de extração de compostos bioativos, principalmente os compostos fenólicos, é vantajosa não somente por substituir o uso de solventes orgânicos ou diminuir a geração de resíduos tóxicos, mas também por oferecer especificidade da extração frente à matriz e aumentar a recuperação dos compostos que não seriam acessados com outros métodos, por estarem complexados com componentes ou tecidos específicos da planta (PINELO; ARNOUS; MEYER, 2006). As paredes celulares de plantas são formadas por polissacarídeos complexos e interligados, como celulose, hemicelulose e lignina, que conferem estabilidade e proteção à exposição dos componentes intracelulares, e

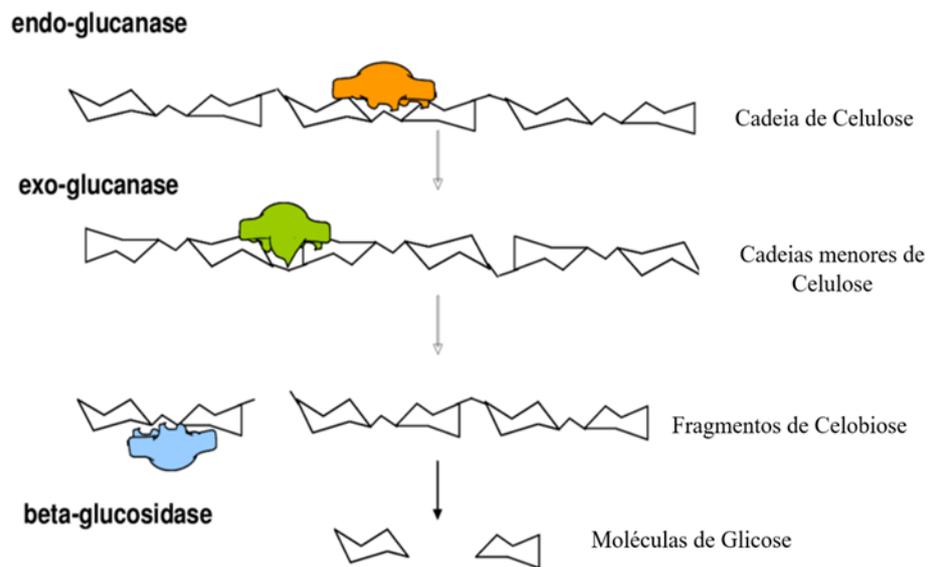
agem como barreira física, limitando a eficiência de métodos convencionais de extração para os compostos de interesse (GLIGOR *et al.*, 2019).

Tendo em vista que a celulose e polímeros semelhantes são abundantes na natureza, a degradação das estruturas polissacarídicas é fundamental para o acesso dos compostos fenólicos em matrizes vegetais. Deste modo, a combinação de diferentes enzimas é aplicada a fim de acessar diferentes estruturas em um único processo de extração. A combinação de enzimas carboidrases foi reportada por aumentar o conteúdo fenólico total e atividade antioxidante de extratos de algas marinhas, tendo o ácido gálico e ácidos clorogênicos como os principais fenólicos recuperados nos extratos (HABEEBULLAH *et al.*, 2021). Também, a combinação de enzimas como celulase e  $\alpha$ -amilase foi utilizada para a extração de compostos fenólicos de cevada (YU; VASANTHAN; TEMELLI, 2001). Apesar de estudos envolvendo a extração de compostos fenólicos nos subprodutos do processamento do café serem ainda escassos na literatura, foi mencionado que a utilização de enzimas celulasas como assistente de extração em café foi eficaz para a recuperação de ácido clorogênico e seus derivados (PINELO *et al.*, 2007).

As enzimas são catalisadores biológicos que exercem a função de acelerar – ou mesmo possibilitar – reações entre componentes químicos. Possuem características específicas, capazes de transformar o substrato em um produto específico, dependendo diretamente de propriedades como pH, temperatura e presença de cofatores ou inibidores no meio reacional. Por serem classificadas como proteínas, sua atividade pode ser irreversivelmente modificada por estas propriedades, quando desnaturadas. Na desnaturação, a estrutura proteica sofre um desarranjo de sua estrutura, ocorrendo a perda da atividade biológica (CARVALHO, 2020).

As enzimas são divididas em diferentes classes como oxirredutase, transferase, hidrolase, liase, isomerase e ligase, onde cada classe possui um mecanismo de ação. Por sua vez, as carboidrases pertencem ao grupo das hidrolases, que são formadas por endo e exoglucanases e utilizam a molécula de água do meio reacional como receptora dos grupos funcionais. Especificadamente, a enzima celulase age hidrolisando as ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas da celulose, desmembrando a parede celular de plantas através da hidrólise entre os monossacarídeos, que formam os polissacarídeos, liberando componentes ali complexados. Ainda, as hemicelulasas são enzimas, também pertencentes às carboidrases, que são formadas por xilanases, arabanases e  $\beta$ -glucanases que são capazes de hidrolisar polissacarídeos estruturais mais específicos (PAPILLO *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2021). O mecanismo de ação das enzimas endo, exo e  $\beta$ -glucanases nas cadeias de celulose é demonstrado na Figura 5.

Figura 5 Mecanismo de ação das endo, exo e  $\beta$ -glucanases na hidrólise da celulose



Fonte: Adaptado de Diaz *et al.* (2009)

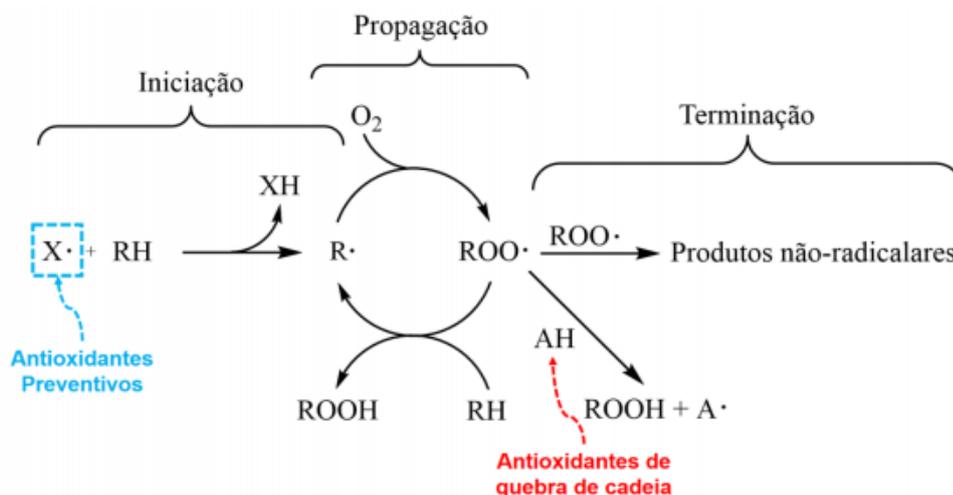
A fim de otimizar o processo de extração, complexos de carboidrases são utilizados para hidrolisar não apenas a celulose, mas também estruturas como hemicelulose e lignina, permitindo o aumento da extração e subsequente rendimento, visando os compostos de interesse como antioxidantes, sacarídeos lipídios, pigmentos e compostos voláteis (DE MOURA *et al.*, 2008; PURI; SHARMA; BARROW, 2012). A enzima *Viscozyme L*<sup>®</sup> é um complexo enzimático específico, composto por diversas carboidrases como arabinases, celulasas,  $\beta$ -glucanase, hemicelulase e xilanas, indicada para hidrolisar polissacarídeos complexos e auxiliar na liberação de compostos fenólicos presentes em matrizes celulares (PAPILLO *et al.*, 2014).

### 3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os principais compostos bioativos presentes nos subprodutos do café são os metabólitos secundários já presentes inicialmente no grão do café, como alcaloides e compostos fenólicos, principalmente as metilxantinas, ácidos clorogênicos e seus isômeros. Estes componentes atribuem ao resíduo alta capacidade antioxidante, tornando-o como potencial fonte de compostos bioativos (CONDE; MUSSATTO, 2016).

Compostos antioxidantes são substâncias que, mesmo em pequenas quantidades, são capazes de retardar ou impedir a reação de oxidação em substratos como lipídeos, proteínas e carboidratos, processo este ilustrado na Figura 6.

Figura 6 Reação de auto-oxidação



Fonte: Adaptado de Amorati e Valgimigli (2015)

Os produtos da reação de oxidação são denominados “espécies reativas de oxigênio” e são sempre iniciados por uma espécie radicalar  $X^\bullet$ , podendo reagir com um substrato  $RH$ , formando o radical alquil  $R^\bullet$ . Posteriormente, esta espécie radicalar irá reagir com o oxigênio, formando o radical peróxido  $ROO^\bullet$ , que poderá atacar outro substrato, originando o hidroperóxido orgânico  $ROOH$  e um radical alquil. A formação de espécies reativas de oxigênio é natural do metabolismo celular de animais e plantas onde, quando corre um desequilíbrio na sua produção, desencadeia o “estresse oxidativo”, o qual é responsável pelo surgimento de doenças crônicas como câncer, diabetes, aterosclerose, neurológicas, entre outras (AMORATI; VALGIMIGLI, 2015).

Neste contexto, os compostos fenólicos são importantes e eficazes antioxidantes naturais, capazes de sequestrar radicais peróxido, podendo atuar em diferentes mecanismos (AMORATI; VALGIMIGLI, 2015). Dentre os principais compostos fenólicos encontrados na película prateada e no próprio grão de café, destacam-se os ácidos clorogênicos como 5-CQA ( $1,99 \pm 0,06 \text{ mg.g}^{-1}$ ), 3-CQA ( $1,478 \pm 1,59 \text{ mg.g}^{-1}$ ) e 4-CQA ( $0,849 \pm 0,076 \text{ mg.g}^{-1}$ ), além de derivados do ácido ferúlico e seus isômeros ( $1,216 \pm 0,063 \text{ mg.g}^{-1}$ ), totalizando em  $5,89 \pm 7,5 \text{ mg}$  de compostos fenólicos por grama de película prateada (BRESCIANI *et al.*, 2014). Além destes, outro importante composto bioativo presente é a cafeína, pertencente ao grupo das metilxantinas, que contribuem significativamente para com a atividade antioxidante (HERMAN; HERMAN, 2013). Ademais, muitos estudos associam que os compostos que possuem atividade antioxidante podem apresentar atividade antibacteriana frente à certos

microrganismos, reportado também por alguns autores esta atividade nos subprodutos do café (BOUHLAL *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2015; NZEKOUE *et al.*, 2020)

### 3.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Atividade antibacteriana é, por definição, a capacidade de inibir o crescimento de bactérias, em virtude da composição do extrato a ser testado. Sua importância se dá pelo alto índice de doenças infecciosas e subsequentes mortes (ALAVIJEH; SHARMA, 2012; DAR *et al.*, 2016; GÓRNIAK *et al.*, 2019). Neste sentido, antibióticos são drogas, sintéticas ou naturais, capazes de causar a morte ou inibir o crescimento de um microrganismo específico. Apesar da indescritível importância da descoberta, utilização e eficácia dos antibióticos em doenças infecciosas (causadas por bactérias ou fungos) nos últimos 60 anos; seu uso incorreto, tanto na forma medicamentosa quanto na agricultura, vem promovendo - além da exacerbada poluição ambiental - a resistência e a seletividade de microrganismos mais fortes, principalmente bactérias (PISTELI; GIORGI, 2012). Diz-se que bactérias resistentes são aquelas capazes de crescer e multiplicar-se, *in vitro*, com um mínimo de concentração do medicamento. O mecanismo de resistência é dado pela modulação ou mutação de fatores genéticos do microrganismo, ou até mesmo a aquisição de um DNA exógeno, onde enzimas são codificadas e posteriormente a ação do medicamento é inativada por mudanças estruturais na própria bactéria, impedindo o mecanismo de ação do antibiótico (TAVARES, 2006; REGEA, 2018).

Os extratos vegetais possuem a propriedade antimicrobiana pela presença de alguns grupos de compostos, geralmente metabólitos secundários, como terpenoides, taninos, alcaloides e compostos fenólicos, incluindo suas subclasses, com diferentes mecanismos de ação. Por exemplo: alcaloides com o princípio ativo a 13 $\alpha$ -hidroxilupanina, Lupanina e 13 $\alpha$ -Tigloyloxylupanina, demonstraram alta atividade antibacteriana em *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando como mecanismo atingir e intercalar o DNA da bactéria. Já os terpenos, como  $\delta$ -3-careno,  $\alpha$ -terpinoleno e  $\alpha$ -copaeno, demonstraram atividade em amplo espectro, em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus flavus*, causando desintegração e lise das membranas, através de compostos lipofílicos (ERDEMOGLU *et al.*, 2007; PRASHANT-TIWARI *et al.*, 2011).

A atividade antibacteriana foi observada em extratos de café torrado, com ação contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus fecalis*, *Listeria monocytogenes*,

*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesiu*, aumentando sua eficácia com o aumento proporcional do extrato aplicado. Foi constatado também, que além da ação dos ácidos orgânicos e compostos fenólicos, as melanoidinas presentes decorrente da reação de *Maillard*, formadas no processo de torrefação, demonstraram ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, sendo estas as mais sensíveis – possivelmente pela ausência de uma segunda camada de peptidoglicanos (RUFÍAN-HENARES; DE-LA-CUEVA, 2009; CHAVES-ULATE; ESQUIVEL-RODRÍGUEZ, 2019).

Assim como no café torrado, compostos bioativos como cafeína, trigonelina, ácidos orgânicos como ácido clorogênico e ácido ferúlico e melanoidinas também são encontrados na borra de café. Estes compostos são amplamente conhecidos por inibirem o crescimento de microrganismos, por diversos meios, como por exemplo: os compostos fenólicos, alcaloides e melanoidinas inibem o crescimento celular; o hidroximetilfurfural (produto da reação de *Maillard*) age na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, diminuindo a taxa de crescimento de bactérias. Diversos autores avaliaram a capacidade antimicrobiana do extrato de borra de café em alimentos e concluem que o prazo de validade dos alimentos aumentou significativamente, com alta atividade contra bactérias Gram-positivas e leveduras (KIM *et al.*, 2016; CAMPOS-VEGA *et al.*, 2015; MONENTE *et al.*, 2015).

Deste modo, conclui-se que os compostos biologicamente ativos encontrados no café, como compostos fenólicos, xantinas e metil-xantinas, taninos e melanoidinas, que são amplamente conhecidos e estudados por conferirem atividades benéficas ao consumo do café (atividades antitumorais, antioxidativas e por auxiliarem na manutenção do sistema cardiovascular), também estão presentes nos subprodutos da obtenção da bebida do café – produzido em elevada quantidade. Este subproduto pode então ser reutilizado, com o manejo adequado e, todos os compostos de interesse podem ser aproveitados, principalmente quando se busca compostos de elevada atividade antioxidante e atividade antimicrobiana.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ (*Coffea arábica* L.)

Os resíduos do processamento do café foram obtidos da rede de cafeterias Café Cultura, localizada na região de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, no mês de julho de 2019. Os resíduos são provenientes do processamento dos grãos de café da espécie arábica, de *blend* das variedades Bourbon Amarelo, Catuaí Vermelho e Icatu Amarelo; com a torrefação realizada pela própria empresa. O café é oriundo do estado de Minas Gerais, região Mogiana, plantio com altitude de 1.220 metros, colhido na safra 2018/2019.

Dois tipos de resíduos foram coletados: um obtido durante a torrefação (chamado de película prateada ou *silverskin* - CS) e outro, gerado durante a extração da bebida “café *espresso*”, denominado borra de café (CG), provenientes do mesmo café e processamento. Estas amostras foram secas, separadamente, em estufa com circulação forçada de ar (Fabbe, modelo 335), a  $60 \pm 2$  °C, *overnight*, até massa constante. Em seguida foram acondicionadas em embalagens de polietileno, ao abrigo da luz, identificadas e armazenadas a  $-80 \pm 2$  °C em *ultra-freezer* até posterior utilização.

### 4.2 PREPARO E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

A obtenção dos extratos se baseou nas metodologias utilizadas por Larrauri *et al.* (1997) e Meléndez (2012), com algumas adaptações. Para a extração, foram utilizados 15 g de borra de café (CG) e 15 g de película prateada (CS), separadamente, para os três diferentes métodos, sendo:

- Extração assistida por ultrassom (AU): foram adicionados 100 mL de água destilada às amostras de borra de café (CG) e película prateada (CS). As misturas foram submetidas à banho de ultrassom (Unique, 1650A, Brasil), onde utilizou-se a potência de 70 W, por 4 horas e em seguida as amostras foram centrifugadas (Hermle, z200A) a 4500 rpm. O sobrenadante foi filtrado em filtro Whatman nº 40 e armazenado em balão volumétrico de 100 mL, envolto por papel alumínio. As amostras foram armazenadas a  $-80$  °C em *ultrafreezer* até o momento das análises.

- Extração assistida por enzimas (AE): foram adicionados 100 mL de água destilada à amostra de borra de café (CG) e película prateada (CS), separadamente. Foram adicionados nas amostras 20 µL de complexo enzimático de celulasas (Viscozyme® L, V2010), sendo as

soluções colocadas, posteriormente, em banho com agitação (100 rpm), à temperatura de 45 °C por 1 hora. As especificações da enzima utilizada, de acordo com o fabricante, estão descritas na Tabela 4. A mistura foi submetida a centrifugação a 4500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado com papel filtro Whatman nº 40 e armazenado em balão volumétrico de 100 mL, envolto por papel alumínio. As amostras foram armazenadas a -80 °C em *ultrafreezer* até o momento das análises.

- Extração assistida por ultrassom e enzima (AUE): foram adicionados 100 mL de água destilada às amostras de borra de café (CG) e película prateada (CS), separadamente. As misturas foram submetidas à banho ultrassom (Unique, 1650A, Brasil), em potência de 70 W, durante 4 horas. Após este período, foi adicionado 20 uL do complexo enzimático (Viscozyme® L, V2010) e as soluções foram colocadas em banho com agitação (100 rpm) à temperatura de 45 °C por 1 hora. A mistura foi submetida a centrifugação a 4500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado com papel filtro Whatman nº 40 e armazenado em balão volumétrico de 100 mL envolto por papel alumínio. As amostras foram armazenadas a -80 °C em *ultrafreezer* até o momento das análises.

Tabela 4 Principais características da enzima *Viscozyme L*®

Estado físico	Composição	Atividade	T (°C)	pH	Grupo alvo
Líquido	arabanase β-glucanase Xylanase Celulase Hemicellulase	100 UFBG*/g	40 – 55	4,0 – 6,0	β-1-3 e 1-4 endoglucanases

\* UFBG: Unidades Fúngicas de Beta-Glucanases.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

#### 4.3.1 Determinação dos teores de Compostos Fenólicos Totais

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos foi avaliado através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, de acordo com a metodologia descrita por Singleton *et al.* (1999), com algumas modificações. Em resumo, foram utilizados 200 µL dos extratos, diluídos

em 5,0 mL de água deionizada, adicionado de 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Após 5 minutos de reação, a mistura foi neutralizada com 1,5 mL de carbonato de sódio 7,5% (p/v), sendo agitada em vórtex por 1 minuto. A solução foi incubada por 30 minutos, com ausência de luz e à temperatura ambiente e posteriormente a sua absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-VIS (U-2900, Hitachi, Japão), em comprimento de onda de 765 nm. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 gramas de amostra (peso seco).

#### **4.3.2 Potencial antioxidante pelo método ABTS**

O potencial antioxidante dos extratos foi determinado utilizando o radical ABTS [2,2'-azino-bis-3-etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfônico], conforme metodologia descrita por Re *et al.* (1999). Para a análise, foi preparada a solução radical ABTS a partir da mistura da solução estoque ABTS  $7 \text{ m mol L}^{-1}$  e da solução de persulfato de potássio  $2,45 \text{ m mol L}^{-1}$ , sendo mantida ao abrigo da luz por 16 horas antes das análises. Para a realização do ensaio, uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de extrato foi misturada com 980  $\mu\text{L}$  da solução radical ABTS. Após 6 minutos de incubação sob o abrigo de luz, a absorbância foi medida em espectrofotômetro UV-VIS (modelo U-1800, Hitachi, Japão) a um comprimento de onda de 734 nm. A quantificação foi realizada com base em uma curva padrão de Trolox e os resultados expressos em  $\mu\text{M Trolox g}^{-1}$  de amostra.

#### **4.3.3 Potencial antioxidante pelo método DPPH**

A atividade antioxidante dos extratos foi analisada utilizando o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil DPPH, segundo método descrito por Brand-Williams *et al.* (1995), com algumas modificações. Em tubos de ensaio foram adicionados 0,3 mL de cada extrato com 2,7 mL da solução diluída de radical DPPH ( $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Após 1 hora sobre abrigo de luz, foi realizada a leitura da absorbância, em espectrofotômetro, em triplicata, a 515 nm. Os resultados foram expressos com base no cálculo de IC50, calculados em  $\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$  de amostra.

#### **4.3.4 Potencial antioxidante por absorção do radical oxigênio (ORAC)**

O ensaio para a avaliação da capacidade antioxidante dos extratos pelo método ORAC foi baseado na metodologia de Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001). Foram preparadas diferentes concentrações das amostras e do padrão (Trolox) em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4. Para a realização da análise, foram pipetados, em poços de uma microplaca da cor preta, 25  $\mu$ L de amostra ou padrão Trolox, ambos já diluídos, e 150  $\mu$ L de solução de fluoresceína (81 nM). As placas foram incubadas por 10 minutos a 37 °C, sendo os últimos 3 minutos sob agitação constante. Após isto, foram adicionados 25  $\mu$ L de solução de AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato] a 152 Nm, dando início à reação. A intensidade de fluorescência foi verificada por 2 horas ou até atingir menos de 0,5 % do valor inicial, de minuto a minuto, a 37 °C. O resultado foi expresso em  $\mu$ M Trolox  $g^{-1}$  de amostra.

#### 4.4 COMPOSIÇÃO FENÓLICA INDIVIDUAL

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Seraglio *et al.* (2016). As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem por ionização por eletropulverização (LC-ESI-MS / MS). Foi utilizado um cromatógrafo líquido da série Agilent 1290 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo com armadilha de íons linear quadrupolo QTRAP® 5500 (Sciex, Foster City, CA, EUA) equipado com uma fonte de ionização por eletropulverização (ESI). A identificação e quantificação dos compostos foram medidas de acordo com o tempo de retenção, íon precursor, fragmento principal (íon de quantificação) e fragmento secundário (íon de confirmação) por comparação com os padrões analíticos. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (3,0 x 100 mm, 3,5  $\mu$ m) da Agilent. A fase móvel foi composta por água (A) e metanol (B), ambas com 0,1% de ácido fórmico. O seguinte modo gradiente foi usado: 0-3 min, 2% B; 3-10 min, 20% de B; 10-11 min 90% de B; 11-13 min, 2% B. O fluxo utilizado foi de 0,3 mL  $min^{-1}$ . Foi utilizado um tempo de equilíbrio de 2 min entre as corridas. A injeção de volume foi de 5  $\mu$ L. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados no software Analyst e MultiQuant, respectivamente (Sciex).

#### 4.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antimicrobiana dos diferentes extratos foi analisada pela determinação da concentração mínima inibitória (CIM), de acordo com Oliveira *et al.* (2016) e com a Norma de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana (NCCLS, 2003). Os ensaios foram realizados para as bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis* ATCC 9933, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Listeria monocytogenes* ATCC7644 CCT7408 (produtora de biofilme), *Listeria ivanovii* ATCC BAA 139, *Listeria innocua* ATCC 3399, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* Fri, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e para as Gram-Negativas (estoque laboratorial): *Salmonella Typhimurium* ATCC14028, *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella abaeetuba* ATCC 35640, *Salmonella heidelberg* ATCC 8326, *Escherichia coli* O157:H7 e *Escherichia coli* ATCC25922. As culturas dos microrganismos patogênicos foram recuperadas em BHI e incubadas a 36 ° C durante a noite. As culturas foram padronizadas na concentração de 0,5 da escala de McFarland (proporcionalmente a 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias por mililitro - UFC.mL<sup>-1</sup>) e diluídas em água peptonada de caseína até a concentração de 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.5.1 Concentração mínima inibitória (CIM)**

Os extratos aquosos dos subprodutos borra de café e película prateada foram submetidos à determinação da MIC, em placa estéril de 96 poços. Diluições seriadas (50 a 2000 µg.mL<sup>-1</sup>) das amostras dos extratos foram realizadas em BHI. Foram adicionados 100 µL de uma suspensão bacteriana em BHI em cada poço. Poços de controle negativo (contendo o BHI e 200 µL de extrato sem a suspensão bacteriana) e poços de controle positivo (contendo o BHI e a suspensão bacteriana) também foram preparados. As placas foram incubadas a 37 ° C por 18 horas sem agitação. Após, 10 µL de resazurina a 3% foram adicionados e deixados por mais 2 horas na incubadora a 37 ° C. Com o uso do corante, a presença de cor azul representa a ausência de crescimento bacteriano e a cor rosa a presença de crescimento. A concentração mínima inibitória (MIC) foi definida como a menor concentração de extrato que inibiu o crescimento visível das bactérias.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

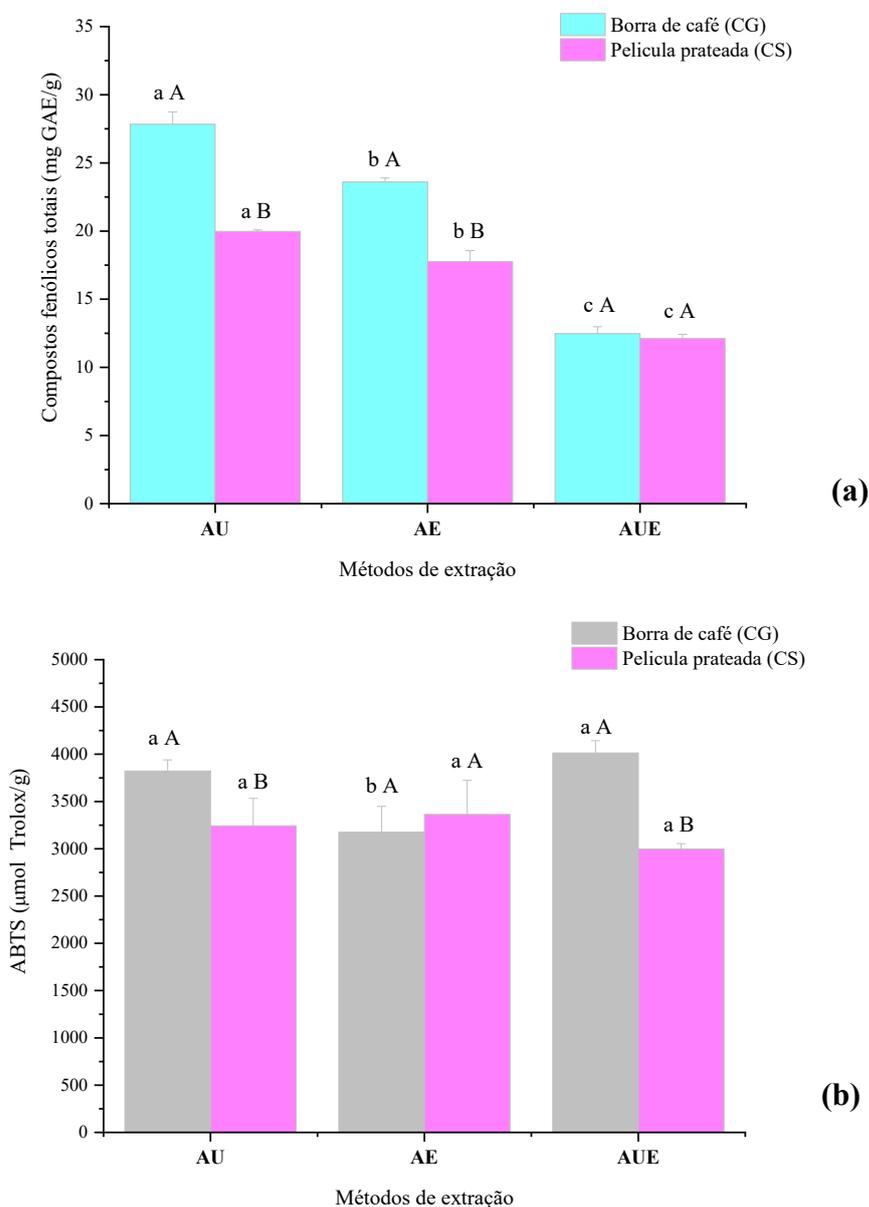
A análise estatística dos resultados experimentais foi realizada utilizando o Software SASM-Agri versão 8.2. Foi realizado a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com 95 % de confiabilidade. A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para elucidar o agrupamento das amostras e desvendar as principais características químicas associadas ao resíduo de café submetido a diferentes métodos de extração.

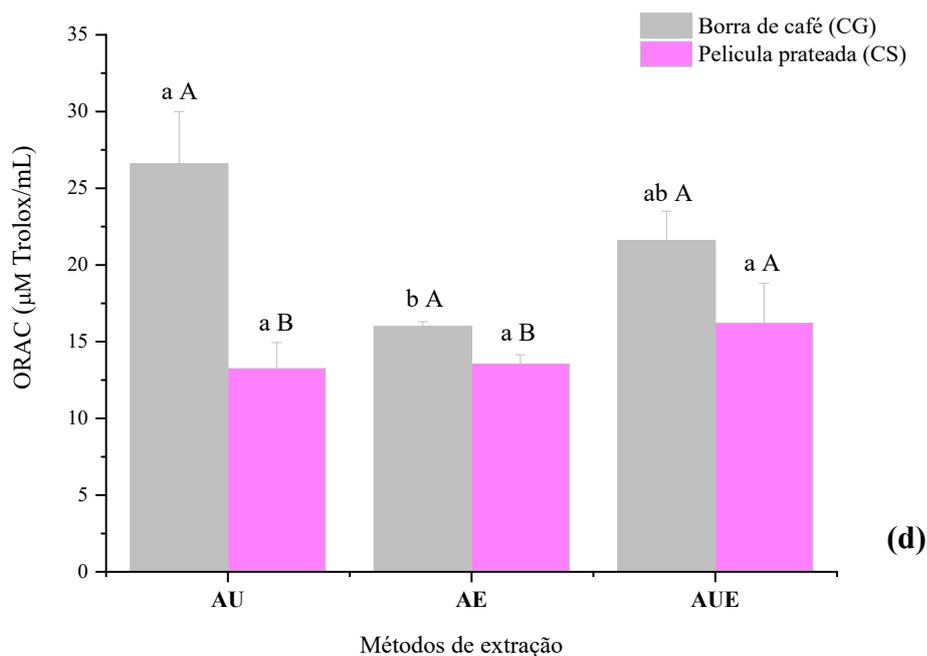
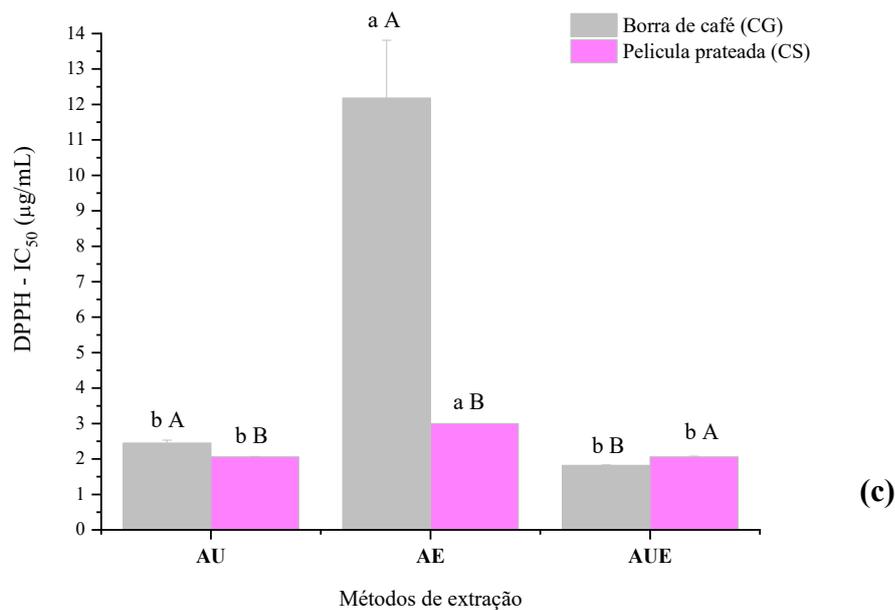
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Os valores de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante *in vitro* dos extratos aquosos de borra de café e película prateada obtidos por diferentes métodos de extração estão apresentados na Figura 7.

Figura 7 Teor de compostos fenólicos totais (a) e atividade antioxidante (b, c, d) dos extratos aquosos de borra de café (CG) e película prateada (CS) obtidos utilizando-se os métodos de extração por ultrassom, assistido por enzimas e pela combinação ultrassom e enzimas.





Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). As letras maiúsculas diferem estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) entre as amostras para cada método de extração, enquanto que, letras minúsculas diferem estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) entre as extrações para cada amostra. AU: extração assistida por ultrassom. AE: extração assistida por enzima. AUE: extração assistida por ultrassom e enzima.

Os teores de compostos fenólicos totais foram elevados para ambas as matrizes (borra de café e película prateada), e estão de acordo com os encontrados por outros pesquisadores (MUSSATO *et al.* 2011; OKUR *et al.* 2021; WEN *et al.* 2019). Além disso, os maiores valores foram encontrados para os extratos obtidos pelo método assistido por ultrassom (AU), com 27,84 mg GAE.g<sup>-1</sup> para borra de café (CG) e 19,98 mg GAE.g<sup>-1</sup> para película prateada (CS),

seguido pelo método assistido por enzima (AE) (Figura 1a). Estes resultados são similares aos encontrados por Ramón-Gonçalves *et al.* (2019), de 9,0 a 29,0 mg GAE.g<sup>-1</sup>, em extratos aquosos-etanólicos pelo método assistido por ultrassom das borras provenientes de diferentes variedades de café. Já os resultados encontrados para película prateada (CS) foram superiores ao encontrado por Wen *et al.* (2019) (entre 5,8 e 8,94 mg GAE.g<sup>-1</sup>), que também utilizaram o ultrassom como assistente de extração.

A extração assistida com ultrassom (AU) foi a mais eficiente para a liberação de compostos fenólicos da parede celular, uma vez que as ondas geradas no meio aquoso formam a compressão e expansão das partículas presentes, promovendo a quebra da estrutura por cisalhamento, promovendo o aumento da solubilidade dos compostos complexados no meio aquoso. Como esperado, o extrato da borra de café apresentou maior teor de compostos fenólicos totais do que o extrato da película prateada, já que a semente apresenta naturalmente a maior quantidade de compostos fenólicos no fruto do café (*Coffea arabica* L) e, mesmo após seu processamento para obtenção da bebida, estes compostos foram mantidos em elevada concentração no subproduto (FARAH; DONANGELO, 2006, PIMPLEY; MURTHY, 2021).

Por se tratar de resíduos gerados no processamento do grão de café e que são influenciados por inúmeros fatores desde a colheita até a produção, os dados dos teores de compostos fenólicos de borra de café e de película prateada podem apresentar variações. Ainda, a espécie utilizada para o preparo da bebida (e subsequente produção dos resíduos) também podem influenciar nos teores de compostos fenólicos encontrados na literatura. Apesar de já ser conhecido que extrações com solventes orgânicos promovem maior extração para compostos fenólicos, os resultados demonstrados para CFT mostram que os auxiliares de extração, como ultrassom e enzima, são alternativas viáveis para extração verde e eficiente de polifenóis.

Para a capacidade antioxidante pelo método ABTS dos extratos de borra de café (CG) e película prateada (CS), foi observado maiores resultados para as extrações AUE e AE, respectivamente (Figura 1b). Quando avaliado cada extrato, a amostra CG apresentou o menor resultado para a atividade antioxidante na extração AE ( $p < 0,05$ ), sugerindo que os compostos fenólicos presentes nesta matéria-prima não estavam tão complexados com estruturas celulósicas e, com o auxílio da cavitação gerada pelo ultrassom, foram liberados ao meio mais facilmente, facilitando a quantificação da sua atividade antioxidante quando comparado à ação enzimática. Os dados observados estão em concordância com os encontrados para os CFT (Figura 1a). Já a amostra película prateada (CS) apresentou maior atividade antioxidante frente ao radical ABTS na extração enzimática (AE), o que pode ser explicado pela sua composição

celulósica mais expressiva frente à borra de café (BALLESTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO, 2014) e especificidade das enzimas carboidrases utilizadas na extração que, para a película prateada, conseguiu melhor descomplexar os compostos fenólicos presentes e assim eliminar o radical ABTS.

Para a análise antioxidante por eliminação do radical DPPH, foi observado que ambos os extratos (CG e CS), nas duas extrações que envolveram a utilização de ultrassom, apresentaram menor resultado de IC50 e, conseqüentemente, maior capacidade antioxidante ( $p < 0,05$ ) (Figura 1c). Este método se baseia no consumo do radical DPPH pela reação com os extratos, em que a menor quantidade de redução do DPPH em 50% apresenta a maior capacidade antioxidante do composto (BRAND WILLIAMS *et al.*, 1995; DAWIDOWICZ *et al.*, 2012). Verificou-se uma máxima extração dos compostos fenólicos a partir do processo de cavitação e posterior aumento da solubilidade dos compostos com atividade antioxidante no meio, facilitando a eliminação de espécies reativas de oxigênio; uma vez que os extratos de borra de café (CG) e película prateada (CS) apenas com auxílio de enzima, apresentam os menores valores para este método.

A extração aquosa de subprodutos do processamento do café é pouco relatada na literatura quando comparada à extração com solventes orgânicos. Entretanto, Bravo *et al.* (2013) compararam a atividade antioxidante DPPH em diversos tipos de extração de borra de café: apenas com água, água e etanol, etanol, metanol, água e metanol; e observaram que o resultado da extração contendo apenas água foi mais expressiva para DPPH, seguido de água + etanol. Isso porque as melanoidinas presentes, formadas no processo de torrefação do grão, bem como os ácidos clorogênicos já presentes, são hidrossolúveis. No presente estudo, quando avaliado cada amostra, a CG apresentou a maior capacidade antioxidante, comparada a CS para os três métodos, estando em concordância com os resultados encontrados para CFT. Isso pode ser explicado pela localização de cada matriz morfológicamente no grão de café, onde a borra de café (CG) é oriunda da semente, torrada e moída, após a extração da bebida. O fruto do café é rico em todas as suas estruturas de compostos fenólicos, mas a semente é o órgão com mais incidência destes compostos (ALVES *et al.*, 2017; JANISSEN; HUYNH, 2018; MIRÓN-MERIDA *et al.*, 2019)

A atividade antioxidante pelo método ORAC versa sobre a capacidade do analito em extinguir radicais pela transferência de átomos de hidrogênio (OU *et al.*, 2002; SCHAICH; TIAN; XIE, 2015), e os resultados para este método estão apresentados na Figura 1d. O extrato CG para a extração assistida por ultrassom (AU) apresentou a maior atividade antioxidante

(26,6  $\mu\text{M Trolox mL}^{-1}$ ), entretanto, quando comparado ao resultado da CG para extração assistida por ultrassom e enzima (AUE), não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Para CS, não houve diferença significativa entre os três métodos de extração ( $p > 0,05$ ). Contudo, para CG e CS, na extração assistida por ultrassom e enzima (AUE), observou-se que a ruptura da parede celular causada pela cavitação, gerada pelo ultrassom, complementado com a hidrólise enzimática dos carboidratos estruturais, auxiliou no aumento da concentração de átomos de hidrogênio no meio aquoso, contribuindo para o aumento da atividade antioxidante dos extratos. Este resultado também pode estar ligado ao teor de celuloses, hemiceluloses e ligninas, reportado por Ballesteros, Teixeira e Mussato (2014) e explicado por Ruegger e Tauk-Tornisielo (2004), onde as estruturas complexas da lignina são previamente desestruturadas pelo ultrassom, permitindo o melhor acesso das carbohidrases às estruturas celulósicas ainda não corrompidas, conseguindo liberar ainda mais os compostos bioativos ali complexados.

Os resultados para atividade antioxidante dos extratos aquosos dos subprodutos do café indicam, que apesar de terem passado por diversos processos para a obtenção da bebida, ainda apresentam compostos fenólicos com notável atividade antioxidante. Por outro lado, na literatura há poucos trabalhos comparativos de atividade antioxidante para extrações aquosas dos subprodutos do café. Entretanto, observa-se uma nova vertente na literatura que mostra a tendência à escolha de extrações ambientalmente seguras utilizando auxiliares de extração, com baixo ou nenhum consumo de solvente orgânico, alta seletividade dos compostos extraídos e bons rendimentos, principalmente de compostos com atividade antioxidante (PAGANO *et al.*, 2021).

De forma geral, os três métodos de extração foram eficientes para a extração de compostos fenólicos. Para os extratos de CS, os métodos que utilizaram a extração enzimática foram mais eficazes, principalmente quando houve o pré-tratamento com o ultrassom, podendo ser explicado pela liberação dos compostos em estruturas mais complexas seguido pela hidrólise enzimática específica nas estruturas ainda não lisadas (RUEGGER; TAUK-TORNISIELO, 2004; REZENDE *et al.*, 2021), dada a composição dos carboidratos estruturais na matriz da película prateada. Para CG, os tratamentos que envolveram o ultrassom obtiveram resultados mais satisfatórios, podendo ser explicado por possuir menos carboidratos estruturais e maior incidência de outras macromoléculas como lipídios e proteínas frente à CS, ser melhor acessado pela cavitação, ficando como sugestão para trabalhos futuros a utilização de, além de carbohidrases, lipases e proteinases, com pré-tratamento de ultrassom, para analisar a descomplexação de mais compostos com atividade antioxidante.

## 5.2 COMPOSIÇÃO FENÓLICA INDIVIDUAL

Um total de 29 compostos fenólicos foram identificados na borra de café e na película prateada por LC-ESI-MS/MS, como ilustrado na Tabela 5.

Tabela 5 Perfil fenólico das amostras de borra de café e película prateada obtidos pelos diferentes métodos de extração.

Compostos fenólicos ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Borra de café (CG)			Película prateada (CS)		
	AU	AE	AUE	AU	AE	AUE
Ácido benzoico	1,22	3,21	5,09	12,56	14,21	17,90
<i>p</i> -Aminobenzoico	< LOQ	< LOQ	5,21	< LOQ	< LOQ	4,72
Cumarina	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Siringaldeído	< LOQ	< LOQ	n.d	< LOQ	9,20	22,64
Ácido ferúlico	9,69	2,28	28,98	10,81	10,20	23,33
Ácido Siríngico	< LOQ	< LOQ	3,20	< LOQ	< LOQ	3,98
Pinocembrim	2,77	7,73	n.d	1,96	< LOQ	n.d
Galangina	< LOQ	< LOQ	n.d	< LOQ	< LOQ	n.d
Apigenina	< LOQ	< LOQ	n.d	< LOQ	< LOQ	n.d
Kaempferol	< LOQ	< LOQ	n.d	< LOQ	< LOQ	2,76
Epicatequina	< LOQ	< LOQ	n.d	n.d	< LOQ	n.d
Catequina	< LOQ	< LOQ	n.d	< LOQ	< LOQ	n.d
Ácido clorogênico	1268,29	1285,96	623,24	13,60	13,45	748,25
Hesperidina	< LOQ	< LOQ	n.d	0,33	0,42	n.d
2,5-DHBA (2,5-ácido dihidroxibenzoico)	97,86	132,50	101,52	451,04	525,59	558,52

2,4-DHBA (2,4-ácido dihidroxibenzoico)	228,07	268,74	124,77	391,49	457,15	66,71
Luteolina	n.d	14,05	n.d	n.d	29,22	n.d
Ácido Salicílico	5,45	11,37	3,77	38,80	49,49	25,34
3,4-DHB (3,4-ácido dihidroxibenzoico)	36,90	50,43	74,20	5,64	11,24	315,94
<i>p</i> -Cumárico	17,69	223,53	81,23	5,16	8,00	4,01
Ácido vanílico	< LOQ	n.d	n.d	<0	n.d	n.d
Ácido gálico	4,40	6,08	n.d	26,00	28,76	n.d
4-Metilumberliferona	n.d	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	n.d
Coniferaldeído	1,35	4,69	< LOQ	29,50	29,48	24,89
Ácido caféico	135,01	648,33	984,72	27,96	27,40	249,40
Sinapaldeído	2,74	4,27	5,94	29,52	31,15	23,46
3,5-DNB (3,5-ácido dinitrobenzoico)	< LOQ	< LOQ	n.d	< LOQ	< LOQ	n.d
Ácido Sináptico	1,85	2,45	n.d	2,95	3,03	7,52
Crisina	< LOQ	< LOQ	n.d	< LOQ	< LOQ	n.d
Naringenina	< LOQ	< LOQ	n.d	< LOQ	< LOQ	n.d
Pinobanksin	< LOQ	n.d				
Quercetina	< LOQ	< LOQ	2,62	< LOQ	< LOQ	2,94
Isorahmenetina	< LOQ					
Isoquercetrina	2,52	2,55	4,22	3,19	3,42	4,68
Naringina	3,63	3,62	n.d	3,65	< LOQ	4,55
Rutina	4,65	4,61	n.d	6,11	5,85	n.d

<LOQ: inferior ao limite de quantificação (50 µg.L<sup>-1</sup>). n.d: não detectado. AU: extração assistida por ultrassom; AE: extração assistida por enzima; AUE: extração assistida por ultrassom e enzima.

Os compostos identificados pertencem às classes dos ácidos fenólicos e derivados, flavonoides e derivados, e fenóis de forma geral. Os compostos majoritários encontrados para os extratos da borra de café (CG) foram ácido clorogênico, ácido caféico, ácido 2,4-dihidroxibenzoico e ácido 2,5-dihidroxibenzoico; enquanto para os extratos da película prateada (CS) foram ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ácido clorogênico e ácido 3,4-dihidroxibenzoico. Apesar dos compostos majoritários serem os mesmos em ambas as matrizes para todas as diferentes extrações, a quantidade de cada composto variou de acordo com o tipo de extração aplicado.

A aplicação de enzimas como assistente de extração (AE) foi o método mais eficiente na extração de compostos fenólicos em CG, tendo o ácido clorogênico ( $1285,96 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), ácido caféico ( $648,33 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), 2,4 DHBA ( $268,74 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e ácido *p*-Cumárico ( $223,53 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) como compostos fenólicos majoritários. Já quando avaliado a amostra CS, a extração que apresentou maior extração de compostos fenólicos foi a extração AUE, sendo eles o ácido clorogênico ( $748,25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), 2,5 DHBA ( $558,52 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), 3,4 DHB ( $315,94 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e ácido cafeico ( $249,40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

O ácido clorogênico (CGA) foi o maior composto encontrado na borra de café (CG) quando aplicado enzima como assistente de extração (AE), seguido da extração com ultrassom (AU) e da combinação dos métodos (AUE); e o terceiro maior composto na película prateada (CS) em AUE, seguido das extrações AU e AE. Ramón-Gonçalves e seus colaboradores (2019) também encontraram ácido clorogênico em borra de café da espécie arábica, na concentração de  $0,8 \text{ mg/g}$ , um pouco abaixo do encontrado no presente trabalho, utilizando água e etanol como solventes, porém sem assistente de extração. Já Wen *et al.* (2019) observaram que a utilização do ultrassom como assistente de extração aumentou significativamente a recuperação de polifenóis na película prateada, especialmente do ácido clorogênico e seus derivados. Apesar de estudos envolvendo auxiliares de extração serem ainda escassos em matrizes como borra de café e película prateada na literatura, Hai *et al.* (2016) demonstraram um aumento de 7,73% no rendimento da extração de polifenóis de folhas de chá verde em extração assistida por enzimas celulasas, corroborando com os resultados encontrados. O ácido clorogênico possui diversos isômeros, sendo o mais conhecido como 5-CQA, um dos ácidos fenólicos mais disponíveis em alimentos, principalmente em café e chás. O conjunto dos isômeros é denominado como ésteres hidroxil-cinâmicos, e são consolidados na literatura por possuírem expressivas atividades antioxidante, antiinflamatória, anti-hipertensiva, antimicrobiana, com ação contra bactérias, fungos e vírus (NAVEED *et al.*, 2018). Diversos vegetais produzem CGA

como metabólito secundário, como cacau, maçã, peras e diversos chás, mas o café é o fruto com maior concentração de CGA (CLIFFORD, 2000).

O ácido cafeico (ácido 3,4-di-hidroxicinâmico) foi o composto majoritário em CG quando aplicada a junção dos assistentes de extração ultrassom e enzima (AUE), seguido por AE e AU; e o quarto maior composto extraído para CS em AUE, seguido de AE e AU. O ácido cafeico é conhecido por possuir elevada capacidade antioxidante, além de ser reportado por Touaibia, Jean-François e Doiron (2011) com propriedades anticâncer, antiinflamatória e anti-HIV. Barbero-López *et al.* (2020) visando analisar a atividade antifúngica de extratos aquosos de película prateada em madeira, encontraram 0,09 mg g<sup>-1</sup> de ácido cafeico, abaixo do encontrado neste trabalho em CS com AUE (0,249 mg g<sup>-1</sup>), demonstrando a eficiência de extração do ácido cafeico na junção dos auxiliares de extração ultrassom e enzima.

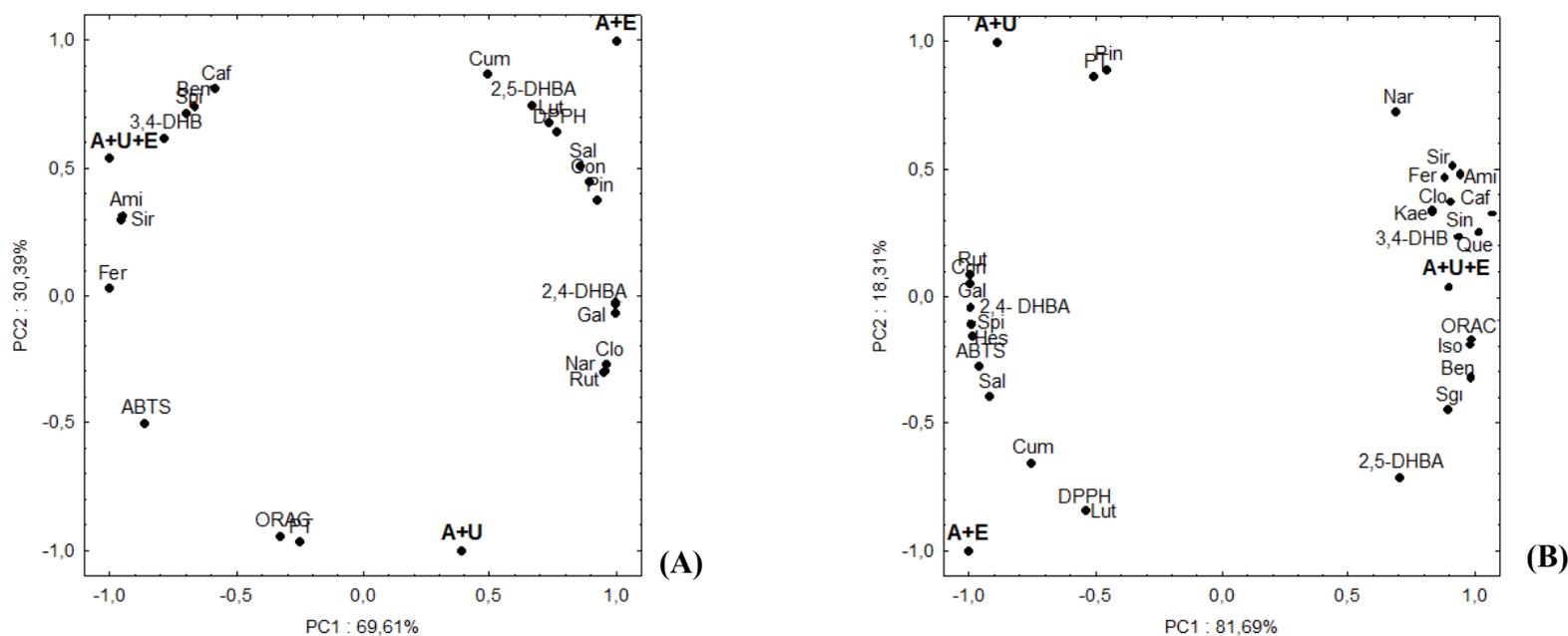
Os ácidos fenólicos 2,5-dehidroxibenzoico, 2,4-dehidroxibenzoico e 3,4-dehidroxibenzoico foram identificados em quantidades significantes tanto em CG quanto em CS. Dentre eles, o ácido 2,5-DHBA foi o maior composto encontrado em CS em AUE e AE; e, para CG, a maior extração do mesmo composto foi por AE. O 2,4-DHBA também foi extraído em maior quantidade em CS e CG em AE. Estes compostos são isômeros do ácido dihidroxibenzoico, que em geral possuem um radical hidroxil ligado ao anel benzeno e podem estar relacionados às melanoidinas do café (NUNES; COIMBRA, 2010). Eles são amplamente conhecidos por suas atividades antioxidantes e antimicrobianas (MADUREIRA; PEREIRA; PINTADO, 2016), com capacidade reguladora em diferentes estágios do metabolismo celular das plantas (RICE, 1984). Mucciarelli *et al.* (2006) testaram diferentes concentrações de 3,4-dihidroxibenzoico no tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) e observaram que a maior concentração testada inibiu o crescimento dos tecidos foliares, impedindo o crescimento da planta e afirmando a atividade alelopática do composto.

Observando todos os compostos recuperados nos três diferentes métodos de extração, verificou-se um aumento dos compostos quando AUE foi aplicado, seguido de AE e AU. Entretanto, é possível verificar que esta tendência varia entre os compostos extraídos, podendo indicar que os fenólicos estão em diferentes estruturas dentro das matrizes, sendo diferentemente eficientes de acordo com o método de extração a ser utilizado.

## 5.2.1 Análise de componentes principais (PCA)

A análise dos componentes principais da composição fenólica individual, polifenóis totais e capacidade antioxidante da borra de café (A) e película prateada (B) está apresentada na Figura 8.

Figura 8 Análise de componentes principais da composição fenólica individual, polifenóis totais e capacidade antioxidante da borra de café (A) e película prateada (B).



Nota de rodapé: Ben- Ácido benzoico; Ami- *p*-Aminobenzoico; Sgi- Siringaldeído; Fer-Ácido ferulico; Sir- Ácido síringico; Pin- Pinocebrim; Kae-Kaempferol; Clo- Ácido clorogênico; Hes- Hesperidina; 2,5-DHBA- 2,5-ácido dihidroxibenzoico; 2,4-DHBA- 2,4-ácido dihidroxibenzoico); Lut- Luteolina; Sal- Ácido salicílico; 3,4-DHB- 3,4-ácido dihidroxibenzoico; Cum- *p*-Cumárico; Gal- Ácido gálico; Con- Coniferaldeído; Caf- Ácido caféico; Spi-Sinapaldeído, Sin- Ácido sináptico; Que- Quercetina; Iso- Isoquercetrina, Nar- Naringina; Rut- Rutina; PT- Polifenóis totais, ORAC- Atividade antioxidante; ABTS- Atividade antioxidante, DPPH- Atividade antioxidante

Para compreender o conjunto de dados, a inter-relação e as diferenças na composição química dos resíduos de café submetidos a diferentes métodos de extração, a análise de componentes principais (PCA) foi aplicada aos dados obtidos com base na composição fenólica e capacidade antioxidante *in vitro*. O conjunto de dados das amostras revelou que 100% da variabilidade total foi representada em dois componentes principais (PC1 × PC2) (Figura 8 A e B). Na Figura 8 A, o PC1 explicou 69,61% da variabilidade dos dados, enquanto o PC2 explicou 30,39%. A análise multivariada revelou que a maioria dos compostos fenólicos individuais (luteolina, *p*-cumárico, 2,5-ácido dihidroxibenzoico, ácido salicílico, coniferaldeído, pinocembrim, 2,4-ácido dihidroxibenzoico, ácido gálico, ácido clorogênico, naringina e rutina) separaram as amostras AE (CG) e AU (CG) em PC1. Em contraste, a extração AUE (CG) foi separada em PC2 e mostrou uma forte associação com os polifenóis totais, atividade antioxidante (método ORAC e ABTS), e alguns polifenóis individuais, como o ácido caféico, ácido benzóico, sinapaldeído, 3,4-ácido dihidroxibenzoico, *p*-aminobenzoico, ácido siríngico e ácido ferúlico.

Na Figura 8 B, o PC1 explicou 81,69% da variabilidade dos dados, enquanto 18,31% dos dados foram explicados por PC2. A análise multivariada revelou uma forte associação da amostra AUE (CS) com a maioria dos compostos fenólicos individuais (naringina, ácido siríngico, ácido ferúlico, *p*-Aminobenzoico, ácido clorogênico, ácido caféico, kaempferol, ácido sináptico, 3,4-ácido dihidroxibenzoico, isoquercetrina, quercetina ácido benzoico, ácido dihidroxibenzoico e siringaldeído) em PC1. No entanto, as amostras AU (CS) e AE (CS) apresentam forte associação com os polifenóis totais, atividade antioxidante (métodos DPPH e ABTS), rutina, pinocembrim, coniferaldeído, ácido gálico, 2,4-ácido dihidroxibenzoico, sinapaldeído, hesperidina, ácido salicílico, *p*-cumárico e luteolina em PC2.

Com base nos resultados obtidos na PCA, a abordagem multivariada revelou que o método de extração aplicado nas amostras influenciou na extração dos compostos fenólicos, e conseqüentemente no agrupamento das amostras. Até onde sabemos, este estudo fornece as primeiras informações sobre o potencial bioativo dos resíduos obtidos do processamento do café aplicando diferentes métodos de extração.

### 5.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os resultados obtidos através da concentração inibitória mínima (MIC) dos diferentes extratos aquosos de borra de café (CG) e película prateada (CS) são demonstrados na Tabela 6, para onze bactérias Gram-negativas e seis bactérias Gram-positivas.

Tabela 6 Concentração mínima inibitória (MIC) de amostras de borra de café e película prateada obtidos por diferentes métodos de extração frente dezessete bactérias patogênicas

	Cepas	Borra de café (CG)			Película prateada (CS)		
		AU	AE	AUE	AU	AE	AUE
Bactérias Gram-positivas	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9933	27,84	23,6	6,24	19,98	17,77	6,6
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	27,84	23,6	6,24	19,98	17,77	6,6
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC7644 CCT7408 (produtora de biofilme)	27,84	23,6	12,48	19,98	17,77	12,12
	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC BAA 139	27,84	23,6	12,48	19,98	17,77	12,12
	<i>Listeria innocua</i> ATCC 3399	27,84	23,6	12,48	19,98	17,77	12,12
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	27,84	23,6	12,48	19,98	17,77	12,12
	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	27,84	23,6	6,24	19,98	17,77	6,6
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	-	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> Fri	-	-	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	-	-	-
Bactérias Gram-negativas	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-	-	-	-
	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	-	-	-	-	-	-
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	27,84	23,6	6,24	19,98	17,77	6,6
	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	27,84	23,6	12,48	19,98	17,77	12,12
	<i>Salmonella abaeetuba</i> ATCC 35640	27,84	23,6	12,48	19,98	17,77	12,12
	<i>Salmonella Heiderberg</i> ATCC 8326	27,84	23,6	12,48	19,98	17,77	12,12

Os dados são expressos em µg/mL; (-): sem inibição. AU: extração assistida por ultrassom; AE: extração assistida por enzima; AUE: extração assistida por ultrassom e enzima.

De forma geral, os extratos estudados demonstraram atividade antibacteriana em ambas as classes de bactérias testadas, tendo a atividade mais expressiva frente bactérias Gram-positivas. Esta tendência é comumente observada, tendo em vista que o acúmulo dos ácidos fenólicos na parede celular dessa classe de bactérias é facilitado pela presença de membranas menos complexas e de mais fácil acesso quando comparada à Gram-negativa. Assim, ocorre a interação dos radicais hidroxila dos ácidos fenólicos com a membrana celular, gerando sua despolarização e gradiente de pH. Este mecanismo sugere a perda de conteúdo celular e diminuição de ATP, levando a morte celular (HELANDER *et al.*, 1998; LA STORIA *et al.*, 2011; BOUARAB-CHIBANE *et al.*, 2019). Apesar de elucidado na literatura, alguns autores discutem a generalização dos compostos fenólicos possuírem maior atividade antibacteriana na coloração Gram-positiva, uma vez que cada classe e composto fenólico age em diferentes mecanismos. Neste ponto, é de notório conhecimento que as bactérias Gram-negativas são mais resistentes aos metabólitos secundários das plantas por possuírem uma parede celular ligada à membrana externa, dificultando o acesso e diminuindo a atividade; no entanto, alguns estudos vêm demonstrando que a estrutura externa destas bactérias pode ser alterada por alguns polifenóis (BOUARAB-CHIBANE *et al.*, 2019; ZAMUZ *et al.*, 2021).

Muitos dos compostos fenólicos encontrados nos extratos de borra de café (CG) e película prateada (CS) são conhecidos na literatura pela sua atividade antibacteriana. Dentre os mais estudados, o ácido clorogênico foi testado para diversas bactérias em diferentes trabalhos (SUN *et al.*, 2020; LOU *et al.*, 2011; KARUNANIDHI *et al.*, 2013; CAI *et al.*, 2019). Lou *et al.* (2011) apresentaram resultados de concentração inibitória mínima (MIC) do ácido clorogênico isolado em *Bacillus subtilis* ( $40 \text{ ug.mL}^{-1}$ ), *Escherichia coli* ( $80 \text{ ug.mL}^{-1}$ ) e *Salmonella thiphimurium* ( $40 \text{ ug.mL}^{-1}$ ) e elucidaram que o mecanismo de ação da atividade antibacteriana do ácido clorogênico não foi exclusivamente por ruptura de membrana celular, mas pelo aumento irreversível da permeabilidade da membrana, permitindo a evasão de compostos importantes para o metabolismo da bactéria, levando à morte. Ainda, os resultados encontrados no presente estudo foram maiores que os resultados encontrados por Lou *et al.* (2011), denotando não só a importância do ácido clorogênico para esta atividade, mas também a sinergia com outros compostos fenólicos presentes. Também, em considerável concentração nos extratos, tanto de CG quanto CS, o ácido cafeico é comumente conhecido na literatura por sua expressiva atividade antibacteriana (KEPA *et al.*, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2019; PARK; KANG, 2021). Kepa *et al.* (2018) sugeriram que o mecanismo de ação deste ácido fenólico é dado pela ruptura da membrana celular das bactérias e interferência do metabolismo aeróbico. Já Tyagi *et al.* (2015) demonstraram a atividade do ácido cafeico isolado frente à *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Isto pode indicar que, a presença expressiva desses ácidos nos extratos de CG e CS conferem, em sinergia

aos demais compostos identificados, e juntamente com os demais compostos comumente conhecidos como antibacterianos nestas matrizes (como taninos e melanoidinas), foram os responsáveis pela alta capacidade antibacteriana encontrada frente à maioria das cepas testadas.

Nenhum dos extratos testados neste trabalho apresentou atividade frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, ainda que diversos autores tenham elucidado a atividade antibacteriana de ácidos fenólicos, como ácido clorogênico e ácido cafeico, frente a estes microrganismos patogênicos (KEPA *et al.*, 2018; LEE; LEE, 2018; KOSTIC *et al.*, 2020). Liu *et al.* (2014) esclarecem que estes microrganismos são altamente sensíveis e dependentes do ferro, e possuem um mecanismo para extrair o ferro do hospedeiro, excretando os chamados sideróforos. O ácido 2,5-dihidroxibenzoico e 2,3-dihidroxibenzoico se assemelham estruturalmente ao sideróforo bacteriano, auxiliando a captura de ferro para a bactéria no meio, aumentando o crescimento destes organismos (LIU *et al.*, 2014). Deste modo, o crescimento das cepas das bactérias de gênero *Staphylococcus* e *Escherichia* não foi inibido por nenhum dos extratos testados, pois há uma alta concentração dos compostos 2,5-DHBA, 2,4-DHBA e 3,4-DHBA tanto para borra de café quanto para película prateada, que são estruturalmente muito parecidos, podendo contribuir na absorção de ferro por estes organismos, auxiliando sua resistência.

Dentre os diferentes extratos de borra de café e película prateada, as extrações AUE inibiram de forma mais expressiva o crescimento das bactérias testadas, seguido dos extratos AE e AU. Conforme visto nos ensaios anteriores, os compostos fenólicos estão complexados nas macromoléculas estruturais, principalmente em carboidratos como celulose, hemicelulose e lignina. A utilização de ultrassom como assistente de extração, através das ondas eletromagnéticas que geram a cavitação no meio, e ocasionam o cisalhamento das estruturas mais complexas, gerou um resultado satisfatório na inibição do crescimento da maioria dos microrganismos testados. Com resultados mais relevantes, a extração enzimática conseguiu melhor liberar os compostos bioativos comparado à extração AU, onde a enzima, através da lise de ligações de hidrofóbicas e ligações de hidrogênio que naturalmente os compostos fenólicos estão ligados; e pela especificidade da enzima nas estruturas presentes nas matrizes, contribuiu para a disponibilidade dos compostos com atividade antibacteriana nos extratos.

Diante do exposto, a técnica mais eficiente em relação as propriedades antibacterianas apresentadas pelo seu extrato foi a junção do tratamento de ultrassom com posterior extração enzimática; uma vez que o ultrassom atua como “pré-tratamento”, agindo na ruptura das estruturas mais complexas e de difícil lise, como lignina e celulose para que, posteriormente, o tratamento enzimático tenha mais fácil acesso a estruturas específicas que ainda não tenham sido desintegradas,

liberando de forma mais facilitada os demais compostos fenólicos (RUEGGER; TAUK, 2004; REZENDE *et al.*, 2021) e conseqüentemente contribua para esta atividade.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstraram que os subprodutos do processamento do café (*Coffea arabica* L.), borra de café e película prateada, são fontes de compostos fenólicos. As três metodologias de extração utilizadas foram efetivas na recuperação dos compostos fenólicos nas duas matrizes, obtendo extratos com elevadas atividades antioxidante e antibacteriana.

Foi observado, a partir da composição fenólica individual, que cada composto identificado deve possuir particularidades e diferentes localizações na morfologia inicial do café, por serem obtidos em diferentes rendimentos entre os métodos de extração aplicados. Dentre os compostos recuperados na borra de café (CG), destacaram-se o ácido clorogênico, o ácido cafêico, o ácido 2,4-dihidroxibenômico e o ácido 2,5-dihidroxibenômico; enquanto para os extratos da película prateada (CS) foram o ácido 2,5-dihidroxibenômico, o ácido 2,4-dihidroxibenômico, o ácido clorogênico e o ácido 3,4-dihidroxibenômico; sendo a melhor metodologia de extração, para a borra de café, a extração assistida por enzimas e, para película prateada, o método combinado. A análise de componentes principais mostrou que as amostras foram agrupadas de acordo com o método de extração empregado, considerando a composição bioativa. Todos os extratos mostraram eficiente capacidade de reduzir os radicais livres nos diferentes métodos testados, bem como de inibir o crescimento bacteriano para importantes microrganismos de colorações Gram-positivas e Gram-negativas. As atividades testadas, antioxidante e antimicrobiana, tiveram resultados satisfatórios para todos os extratos e foi seguida a mesma tendência da composição fenólica individual para a melhor extração. Os métodos de extração utilizados se mostraram excelentes alternativas para a extração de compostos fenólicos com alta eficiência, especificidade e sustentabilidade, estando de acordo com a tendência atual de diminuição de solventes ou técnicas que prejudicam o meio ambiente, bem como na vertente da economia circular. Além disso, os subprodutos da cadeia produtiva do café gerados em grande quantidade, se mostram, mais uma vez, fonte de compostos de alto valor agregado, podendo ser utilizados para inúmeras finalidades, como indústria alimentícia, química e farmacêutica.

Ainda, demais estudos são sugeridos a fim de elucidar e ampliar as possibilidades de extração, aumentar a recuperação de compostos para posterior reutilização destes subprodutos de forma sustentável e segura, tais como citotoxicidade, análise de outros compostos presentes por

cromatografia, ou metabolômica, e utilização de outros tipos de enzimas - como proteases e lipases - como auxiliares de extração.

## REFERÊNCIAS

ABIC. Associação Brasileira de Indústria de Café. Brasileiros conquistam título de maiores consumidores de café no mundo. **ABIC**. 2018. Disponível em: <<http://abic.com.br/brasileiros-conquistam-titulo-de-maiores-consumidores-de-cafe-no-mundo/>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

ABIC. Associação Brasileira de Indústria de Café. Café é a segunda bebida mais consumida entre os brasileiros, aponta pesquisa. **ABIC**, 2020. Disponível em: <<https://estatisticas.abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/indicadores-da-industria-de-cafe-2020/>>. Acesso em: 09 jul. 2020.

ABIC. Associação Brasileira de Indústria de Café. Tendências de consumo de café. **ABIC**, p. 108, 2010.

ALAVIJEH, P. K.; SHARMA, D. A study of antimicrobial activity of few medicinal herbs. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 2, n. 4, p. 496-502, 2012.

ALI, H. S.; MANSOUR, A. F.; KAMIL, M. M.; HUSSEIN, A. M. S. Formulation of nutraceutical biscuits based on dried spent coffee grounds. **International Journal Pharmacology**, v. 14, p. 584-594, 2018.

ALVES, R. C.; RODRIGUES, F.; NUNES, M. A.; VINHA, A. F.; OLIVEIRA, M. B. P. P. et al. State of the art in coffee processing by-products. In: **Handbook of coffee processing by-products**. Academic Press, p. 1-26. 2017.

AMORATI, R.; VALGIMIGLI, L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. **Free Radical Research**, v. 49, n. 5, p. 633-649, 2015.

ANDRADE, K. S.; GONÇALVEZ, R. T.; MARASCHIN, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, v. 88, p. 544-552, 2012.

ARAÚJO, M. O.; PESSOA, H. L. F.; LIRA, A. B.; CASTILLO, Y. P.; SOUSA, D. P. Synthesis, antibacterial evaluation, and QSAR of caffeic acid derivatives. **Journal of Chemistry**, v. 2019, 2019.

ARAUZO, P. J.; LUCIAN, M.; DU, L.; OLSZEWSKI, M. P.; FIORI, L.; KRUSE, A. Improving the recovery of phenolic compounds from spent coffee grounds by using hydrothermal delignification coupled with ultrasound assisted extraction. **Biomass and Bioenergy**, v. 139, p. 105616, 2020.

BALLESTEROS, L. F.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 12, p. 3493-3503, 2014.

BARBERO-LÓPEZ, A.; MONZÓ-BELTRÁN, J.; VIRJAMO, V.; AKKANEN, J.; HAAPALA, A. Revalorization of coffee silverskin as a potential feedstock for antifungal chemicals in wood preservation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 152, p. 105011, 2020.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de Café: estimativa de produtividade. **Monitoramento Agrícola**. v. 6, n. 1, p. 11-25, 2020.

BRAVO, J.; MONENTE, I. J.; PEÑA, M. P.; CID, C. Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 610-616, 2013.

BRESCIANI, L.; CALANI, L.; BRUNI, R.; BRIGHENTI, F.; DEL RIO, D. Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. **Food Research International**, 61, 196-201.

BOREÉM, F. M.; REINATO, C. H. R.; ANDRADE, E. T. Secagem do Café. Em: Flávio Meira Borém. (Org.). **Pós-Colheita do Café**. 1ª ed. Lavras: Editora UFLA, 2008, v. 1, p. 203-240. 2008.

BOUARAB-CHIBANE, L.; FORQUET, V.; LANTÉRI, P.; CLEMENT, Y.; LÉONARD-AKKARI, L.; OULAHAL, N.; DEGRAEVE, P.; BORDES, C. Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (Quantitative structure–activity relationship) models. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 829, 2019.

BOUHLAL, F.; AQIL, Y.; CHAMKHI, I.; BELMAGHRAOUI, W.; LABJAR, N.; HAJJAJI, S. E.; BENABDELLAAH, G. A.; AURAG, J.; LOFTI, E. M.; MAHI, M. E. GC-MS Analysis, Phenolic Compounds Quantification, Antioxidant, and Antibacterial Activities of the Hydroalcoholic Extract of Spent Coffee Grounds. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 10, n. 4, p. 325-337, 2020.

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

BUTT, M. S.; SULTAN, M. T. Coffee and its consumption: benefits and risks. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 363-373, 2011.

CABALLERO-GALVÁN, A. S.; RESTREPO-SERNA, D. L.; ORTIZ-SÁNCHEZ, M.; CARDONA-ALZATE, C. A. Analysis of Extration Kinetics of Bioactive Compounds from Spent Coffee Grounds (*Coffea arábica*). **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, p. 2381-2389, 2018.

CAI, R.; MIAO, M.; YUE, T.; ZHANG, Y.; CUI, L.; WANG, Z.; YUAN, Y. Antibacterial activity and mechanism of cinnamic acid and chlorogenic acid against *Alicyclobacillus acidoterrestris* vegetative cells in apple juice. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 5, p. 1697-1705, 2019.

CAMPOS-VEGA, R.; LOARCA-PIÑA, G.; VERGARA-CASTAÑEDA, H. A.; OOMAH, B. D. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 24-36, 2015.

CAPSON-TOJO, G.; ROUEZ, M.; CREST, M.; STEYER, J. P.; DELGENÈS, J. P.; ESCUDIÉ, R. Food waste valorization via anaerobic processes: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 15, n. 3, p. 499-547, 2016.

CÁRCEL, J. A.; GARCÍA-PÉREZ, J.; BENEDITO, J.; MULET, A. Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 200-207, 2012.

CARNIER, R.; BERTON, R. S.; COSCIONE, A. R.; PIRES, A. M. M.; CORBO, J. Z. F. Coffee silverskin and expired coffee powder used as organic fertilizers. **Coffee Science**, v. 14, n. 1, p. 24-32, 2019.

CARVALHO, Gabriel Ribeiro. **Extração aquosa enzimática de compostos bioativos do grão de café verde e torta residual por prensagem mecânica**. 2020. Tese (Doutorado) – Curso de Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.

CHAVES-ULATE, E.; ESQUIVEL-RODRÍGUEZ, P. Chlorogenic acids present in coffee: antioxidant and antimicrobial capacity. **Agronomía Mesoamericana**, v. 30, n. 1, p. 299-311, 2019.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A. S.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540-560, 2017.

CHEMAT, F.; ZILLI-E-HUMA; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

CIARAMELLI, C.; PALMIOLI, A.; AIROLDI, C. Coffee variety, origin and extraction procedure: Implications for coffee beneficial effects on human health. **Food Chemistry**, v. 278, p. 47-55, 2019.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1033-1043, 2000.

COSTA-FILHO, D. V.; SILVA, A. J.; SILVA, P. A. P.; SOUSA, F. C. Aproveitamento de resíduos agroindustriais na elaboração de subprodutos. In: **II Congresso Internacional das Ciências Agrárias–COINTER–PDVAgro**. 2017.

COSTA, A. S. G.; ALVES, R. C.; VINHA, A. F.; BARREIRA, S. V. P.; NUNES, M. A.; CUNHA, L. M.; OLIVEIRA, B. P. P. Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 350-357, 2014.

CONDE, T.; MUSSATTO, S. I. Isolation of polyphenols from spent coffee grounds and silverskin by mild hydrothermal pretreatment. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 406-409, 2016.

CRUZ-ORTEGA, R.; ANAYA, A. L.; HERNÁNDEZ-BAUTISTA, B. E.; LAGUNA-HERNÁNDEZ, G. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, n. 12, p. 2039-2057, 1998.

DAR, K.; BHAT, A.; AMIN, S.; ANEES, S.; MASOOD, A.; ZARGAR, M.; GANIE, S. Efficacy of aqueous and methanolic extracts of *Rheum spiciformis* against pathogenic bacterial and fungal strains. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 10, n. 9, p. BC18, 2016

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food chemistry**, v. 131, n. 3, p. 1037-1043, 2012.

DE CASTRO, M. D L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Ultrasound-assisted crystallization (sonocrystallization). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, n. 6, p. 717-724, 2007.

DE MOURA, J. M. L. N.; CAMPBELL, K.; MAHFUZ, A.; JUNG, S.; GLATZ, C. E.; JOHNSON, L. Enzyme-assisted aqueous extraction of oil and protein from soybeans and cream de-emulsification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 10, p. 985–995, 2008.

DE ALMEIDA, G. D.; ZUCOLOTO, M.; ZETUN, M. C.; COELHO, I.; SOBREIR, M. Oxidative stress in vegetable cells mediated by allelochemicals. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 61, n. 1, p. 4237–4247, 2008.

DIAZ, J. T. Green Liquor Pretreatment for Hardwood chips to Ethanol Conversion Strategies. 2009.

DURÁN, C. A. A.; TSUKUI, A.; SANTOS, F. K. F.; MARTINEZ, S. T.; BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da bebida. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 107-134, 2017.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 488-495, 2012.

ESCLAPEZ, M. D.; PÉREZ, J.V.G.; MULET, A.; CÁRCEL, J.A. Ultrasound-assisted extraction of natural products. **Food Engineering Reviews**, v. 3, p.108–120, 2011.

ERDEMOGLU, N.; OZKAN, S.; TOSUN, F. Alkaloid profile and antimicrobial activity of *Lupinus angustifolius* L. alkaloid extract. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, n. 1, p. 197-201, 2007.

FANG, X.; MOREAU, R. A. Extraction and demulsification of oil from wheat germ, barley germ, and rice bran using an aqueous enzymatic method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 7, p. 1261–1268, 2014.

FARAH, A. Coffee constituents. **Coffee: Emerging health effects and disease prevention**, v. 1, p. 22-58, 2012.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian journal of plant physiology**, v. 18, p. 23-36, 2006.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Dados de produção mundial**. 2013. Disponível em: < <http://www.fao.org/americas/noticias/ver/pt/c/239394/>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

GALANAKIS, Charis Michel (Ed.). **Handbook of Coffee Processing By-products: Sustainable Applications**. Academic Press, 2017.

GLIGOR, O.; MOCAN, A.; MOLDOVAN, C.; LOCATELLI, M.; CRISAN, G.; FERREIRA, I. C. F. R. Enzyme-assisted extractions of polyphenols—a comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, 2019.

GNIAZDOWSKA, A.; BOGATEK, R. Allelopathic interactions between plants. Multisite action of allelochemicals. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 27, n. 3, p. 395–407, 2005.

GOMES, R. N.; LIMA, P. S.; KURIYAMA, S. N.; FIDALGO-NETO, A. A. Desenvolvimento da química verde no cenário industrial brasileiro. **Fitos**, p. 80-89, 2018.

GÓRNIAK, I.; BARTOSZEWSKI, R.; KRÓLICZEWSKI, J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 1, p. 241-272, 2019

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. **Process Biochemistry**, v.38, n.7, p.987-996, 2003.

HABEEBULLAH, S. F. K.; ALAGARSAMY, S.; ARNOUS, A.; JACOBSEN, C. Enzymatic extraction of antioxidant ingredients from Danish seaweeds and characterization of active principles. **Algal Research**, v. 56, p. 102292, 2021.

HAI, T. C.; NAM, N. D.; HONG, L. T.; VU, T.; MAN, P. V. Enzyme assisted extraction of polyphenols from the old tea leaves. **Journal of Nutrition and Health Science**, v. 3, n. 4, p. 404-410, 2016.

HARDGROVE, S. J.; LIVESLEY, Stephen J. Applying spent coffee grounds directly to urban agriculture soils greatly reduces plant growth. **Urban Forestry & Urban Greening**, v. 18, p. 1-8, 2016.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M, WRIGHT, A. V. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

HERRMANN, K.; NAGEL, C. W. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 315-347, 1989.

HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 26, n. 1, p. 8-14, 2013.

INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M. On laboratory bioassays in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 61, n. 1, p. 28-44, 1995.

IRIONDO-DEHOND, A., GARCÍA, N. A., FERNANDEZ-GOMEZ, B., GUI SANTES-BATAN, E., ESCOBAR, F. V., BLANCH, G. P., ANDRES, M. I. S., SANCHEZ-FORTUN, S., CASTILLO, M. D. Validation of coffee by-products as novel food ingredients. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 51, p. 194-204, 2019.

IWAI, K.; KISHIMOTO, N.; KAKINO, Y.; MOCHIDA, K.; FUJITA, T. In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4893-4898, 2004.

JANISSEN, B.; HUYNH, T. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 128, p. 110-117, 2018.

KARUNANIDHI, A.; THOMAS, R.; BELKUM, A. V.; NEELA, V. In vitro antibacterial and antibiofilm activities of chlorogenic acid against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* including the trimethoprim/sulfamethoxazole resistant strain. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

KEPA, M.; MIKLASINSKA-MAJDANIK, M.; WOJTYCZKA, R. D.; IDZIK, D.; KORZENIOWSKI, K.; SMOLEN-DZIRBA, J.; WASIK, T. J. Antimicrobial potential of caffeic acid against *Staphylococcus aureus* clinical strains. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

KIM, D. H.; JEONG, D.; KIM, H.; KANG, I.; CHON, J. W.; SONG, K. Y.; SEO, K. H. Antimicrobial activity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 36, n. 6, p. 787, 2016.

KOSTIĆ, M.; IVANOV, M.; STOJKOVIC, D.; CIRIC, A.; SOKOVIC, M. Antibacterial and antibiofilm activity of selected polyphenolic compounds: An in vitro study on *Staphylococcus aureus*. **Lekovite Sirovine**, n. 40, p. 57-61, 2020.

KOVALCIK, A.; OBRUCA, S.; MAROVA, I. Valorization of spent coffee grounds: A review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 110, p. 104-119, 2018.

LACERDA-FILHO, A. F.; SILVA, J. S.; SEDIYAMA, G. C. Comparação entre materiais de pavimentação de terreiro para a secagem de café. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, Especial Café, n.9, p.83-93, 2006.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1390–1393, 1997.

LA STORIA, A.; ERCOLINI, D.; MARINELLO, F.; DI PASCOA, R.; VILLANI, F. MAURIELLO, G. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 164-172, 2011.

LEE, L. W.; CHEONG, M. W.; CURRAN, P.; YU, B.; LIU, S. Q. Coffee fermentation and flavor—An intricate and delicate relationship. **Food Chemistry**, v. 185, p. 182-191, 2015.

LEE, B.; LEE, D. G. Depletion of reactive oxygen species induced by chlorogenic acid triggers apoptosis-like death in *Escherichia coli*. **Free Radical Research**, v. 52, n. 5, p. 605-615, 2018.

LIU, Y.; TU, Q.; KNOTHE, G.; LU, M. Direct transesterification of spent coffee grounds for biodiesel production. **Fuel**, v. 199, p. 157-161, 2017.

LIU, Z.; REBA, S.; CHEN, W.D.; PORWAL, S, K.; BOOM, W. H.; PETERSEN, R. B. ROJAS, R.; VISWANATHAN, R.; DEVIREDDY, D. Regulation of mammalian siderophore 2, 5-DHBA in the innate immune response to infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 6, p. 1197-1213, 2014.

LOU, Z.; WANG, H.; ZHU, S.; MA, C.; WANG, Z. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. M398-M403, 2011.

LÓPEZ-BARRERA, D. M.; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, K.; LOARCA-PINA M. G. F. Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators in vitro. **Food Chemistry**, v. 212, p. 282-290, 2016.

MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, A.; PINTADO, M. Chitosan nanoparticles loaded with 2, 5-dihydroxybenzoic acid and protocatechuic acid: properties and digestion. **Journal of Food Engineering**, v. 174, p. 8-14, 2016.

MAIRESSE, L. A. S.; COSTA, E. C.; FARIAS, J. R.; FIORIN, R. A. Bioatividade de extratos vegetais sobre alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 14, n. 2, p. 1–12, 2007.

MALTA, M. R., CIRILLO, M. A., FASSIO, L. D. O., BARCELOS, A. F., LIMA, P. M. D., SILVA, M. D. M., CHAGAS, R. M. R. Otimização de componentes resultantes de subprodutos do processamento do café para a produção de silagem. **IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. 2015.

MARTINEZ-SAEZ, N.; GARCÍA, A. T.; PÉREZ, I. D.; REBOLLO-HERNANZ, M.; MESÍAS, M.; MORALES, F. J.; MARTÍN-CABREJAS, M. A.; CASTILLO, M. D. D. Use of spent coffee grounds as food ingredient in bakery products. **Food Chemistry**, v. 216, p. 114-122, 2017.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1077-1084, 2018.

MEDINA-TORRES, N.; AYORA-TALAVERA, T.; ESNPINOSA-ANDREWS, H.; SÁNCHEZ-CONTRERAS, A.; PACHECO, N. Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. **Agronomy**, v. 7, n. 3, p. 47, 2017.

MELÉNDEZ, V. J. H. **Efeito do ultrassom de alta intensidade na extração e difusão da cafeína nos grãos de café (*Coffea arabica*)**. Dissertação. Universidade Estadual Paulista. 2012.

MESÍAS, M.; DELGADO-ANDRADE, C. Melanoidins as a potential functional food ingredient. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 37-42, 2017.

MESSINA, G.; ZANNELLA, C.; MONDA, V.; DATO, A.; LICCARDO, D.; DE BLASIO, S.; VALENZANO, A.; MOSCATELLI, F.; MESSINA, A.; CIBELLI, G.; MONDA, M. The Beneficial Effects of Coffee in Human Nutrition. **Biology and Medicine**, v. 7, n. 4, p.1-5, 2015.

MILLER, D. A. Allelopathy in forage crop systems. **Agronomy Journal**, v. 88, n. 6, p. 854-859, 1996.

MIRÓN-MÉRIDA, V.; YÁÑES-FERNÁNDEZ, J., MONTAÑEZ-BARRAGÁN, B.; HUERTA, B. E. B. Valorization of coffee parchment waste (*Coffea arabica*) as a source of caffeine and phenolic compounds in antifungal gellan gum films. **LWT**, v. 101, p. 167-174, 2019.

MONENTE, C.; BRAVO, J.; VITAS, A. I.; ARBILLAGA, L.; PEÑA, M. P. P.; CID, C. Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 365-374, 2015.

MUCCIARELLI, M.; GALLINO, M.; MAFFEI, M.; SCANNERINI, S. Effects of 3, 4-dihydroxybenzoic acid on tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cultured in vitro. Growth regulation in callus and organ cultures. **Plant Biosystems**, v. 134, n. 2, p. 185-192, 2000.

MULET, A.; CÁRCEL, J. A.; SANJUÁN, N. New food drying technologies-Use of ultrasound. **Food Science and Technology International**, v. 9, n. 3, p. 215-221, 2003.

MUSSATTO, S.; MACHADO, E. M. S.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 5, p. 661, 2011.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

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. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67-74, 2018.

NCCLS. 2013. Norma de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana. M100-S15. Vol 25, n 1.

NG, K. R.; LYU, X.; MARK, R.; CHEN, W. N. Antimicrobial and antioxidant activities of phenolic metabolites from flavonoid-producing yeast: Potential as natural food preservatives. **Food Chemistry**, v. 270, p. 123-129, 2019.

NUNES, F. M.; COIMBRA, M. A. Role of hydroxycinnamates in coffee melanoidin formation. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 1, p. 171-185, 2010.

NZEKOUE, F. K.; ANGELONI, S.; NAVARINI, L.; ANGELONI, C.; FRESCHI, M.; HRELIA, S.; VITALI, L. A.; SAGRATINI, G.; VITTORI, S.; CAPRIOLI, G. Coffee silverskin extracts: Quantification of 30 bioactive compounds by a new HPLC-MS/MS method and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. **Food Research International**, v. 133, p. 109128, 2020.

O'DONNELL, C. P.; TIWARI, B. K.; BOURKE, P.; CULLEN, P. J. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. **Trends in food science & technology**, 21(7), 358-367.

OBRUCA, Stanislav et al. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 569-574, 2015.

OIC. Organização Internacional do Café. Relatório sobre o mercado de Café. 2019. Disponível em: <<http://www.ico.org/documents/cy2018-19/cmr-0319-p.pdf>>. Acesso em: set 2021.

OKUR, I. O.; SOYLER, B.; SEZER, P.; OZTOP, M. H.; ALPAS, H. Improving the Recovery of Phenolic Compounds from Spent Coffee Grounds (SCG) by Environmentally Friendly Extraction Techniques. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 613, 2021.

OLIVEIRA, B. D.; RODRIGUES, A. C.; CARDOSO, B. M. I.; RAMOS, A. L. C. C.; BERTOLDI, M. C.; TAYLOR, J. G.; CUNHA, L. R. da; PINTO, U. M. Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 59–66, 2016.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.; DEEMER, E. K.; PRIOR, R. L.; HUANG, D. Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 2772-2777, 2002.

PAGANO, I.; CAMPONE, L.; CELANO, R.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L. Green non-conventional techniques for the extraction of polyphenols from agricultural food by-products: A review. **Journal of Chromatography A**, p. 462295, 2021.

PAN, M.; TUNG, Y.; YANG, G.; LI, S.; HO, C. Molecular mechanisms of the anti-obesity effect of bioactive compounds in tea and coffee. **Food & Function**, v. 7, n. 11, p. 4481-4491, 2016.

PANUSA, A.; PETRUCCI, R.; LAVECCHIA, R.; ZUORRO, A. UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS metabolic profiling and antioxidant capacity of arabica and robusta coffee silverskin: Antioxidants vs phytotoxins. **Food Research International**, v. 99, p. 155-165, 2017.

PANUSA, A.; ZUORROS, A.; LAVECCHIA, R.; MARROSU, G.; PETRUCCI, R. Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 17, p. 4162-4168, 2013.

PAPILLO, V.A.; VITAGLIONE, P.; GRAZIANI, G.; GOKMEN, V.; FOGLIANO, V. Release of antioxidant capacity from five plant foods during a multistep enzymatic digestion protocol. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 62, n. 18, p. 4119-4126, 2014.

PARK, M.; KANG, D. Antibacterial Activity of Caffeic Acid Combined with Ultraviolet-A Light against *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. AEM. 00631-21, v. 87, 2021.

PEREIRA, G.V.D.M. **The potential use of yeast starter cultures to improve the fermentation and quality of coffee during wet processing: selection, implementation and sensorial effects.** 2015. Tese. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2015.

PETTINATO, M.; CASAZZA, A. A.; PEREGO, P. The role of heating step in microwave-assisted extraction of polyphenols from spent coffee grounds. **Food and Bioproducts Processing**, v. 114, p. 227-234, 2019.

PIMPLEY, V. A.; MURTHY, P. S. Influence of green extraction techniques on green coffee: Nutraceutical compositions, antioxidant potential and in vitro bio-accessibility of phenolics. **Food Bioscience**, p. 101284, 2021.

PEÑA-MARAVILLA, M., CALIXTO-ROMO, M. A., GUILLÉN-NAVARRO, K., SÁNCHEZ, J. E., AMAYA-DELGADO, L. Cellulases and xylanases production by *Penicillium citrinum* CGETCR using coffee pulp in solid state fermentation. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 16, n. 3, p. 757-769, 2017.

PINELO, M.; ARNOUS, A.; MEYER, A. S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 11, p. 579-590, 2006.

PISTELI, L.; GIORGI, I. Antimicrobial properties of flavonoids. In: **Dietary Phytochemicals and Microbes**. Springer, Dordrecht, 2012. p. 33-91.

PRASHANT TIWARI, B.; KUMAR, M. K.; GURPREET KAUR, H. K. Phytochemical screening and extraction - A review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, p. 98-106, 2011.

PROCENTESE, A.; RAGANATI, F.; OLIVIERI, G.; RUSSO, M. E.; FELD, M. D. L.; MARZOCHELLA, A. Agro food wastes and innovative pretreatments to meet biofuel demand in Europe. **Chemical Engineering & Technology**, v. 42, n. 5, p. 954-961, 2019.

PUJOL, D.; LIU, C.; GOMINHO, J.; OLIVELLA, M. À.; FIOL, N.; VILLAESCUSA, I.; PEREIRA, H. The chemical composition of exhausted coffee waste. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 423-429, 2013.

PURI, M.; SHARMA, D.; BARROW, C. J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 37-44, 2012.

RAMÓN-GONÇALVES, M.; GÓMEZ-MEJÍA, E.; ROSALES-CONRADO, N.; LEÓN-GONZALEZ, M. E.; MADRID, Y. Extraction, identification and quantification of polyphenols from spent coffee grounds by chromatographic methods and chemometric analyses. **Waste Management**, v. 96, p. 15-24, 2019

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Exploitation of food industry waste for high-value products. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 58-69, 2016.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C.; Antioxidant activity applying in improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**. V. 26, p. 1231-1237, 1999.

REGEA, G. Review on antibiotics resistance and its economic impacts. **Journal of Pharmacology and Clinical Research**, v. 5, p. 555675, 2018.

REZENDE, Y. R. R. S.; NOGUEIRA, J. P.; SILVA, T. O. M.; BARROS, R. G. C.; OLIVEIRA, C. S.; CUNHA, G. C.; GUALBERTO, N. C.; RAJAN, M.; NARAIN, N. Enzymatic and ultrasonic-assisted pretreatment in the extraction of bioactive compounds from Monguba (*Pachira aquatic Aubl*) leaf, bark and seed. **Food Research International**, v. 140, p. 109869, 2021.

RODRIGUES, F. et al. Are coffee silverskin extracts safe for topical use? An in vitro and in vivo approach. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 167-174, 2015.

ROVARIS, Â. A.; DIAS, C. O.; DA CUNHA, I. P.; SCAFF, R. M. C.; DE FRANCISCO, A.; PETKOWICZ, C. L. O.; AMANTE, E. R. Chemical composition of solid waste and effect of

enzymatic oil extraction on the microstructure of soybean (*Glycine max*). **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 405-414, 2012.

RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Cellulase activity of fungi isolated from soil of the Ecological Station of Juréia-Itatins, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.

RUFÍAN-HENARES, J. A.; DE-LA-CUEVA, S. P. Antimicrobial Activity of Coffee Melanoidins: A Study of Their Metal-Chelating Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 432-438, 2009.

SALEH, I. A.; VINATORU, M.; MASON, T. J.; ABDEL-AZIM, N. S.; ABOUTABL, E. A.; HAMMOUDA, F. M.. A possible general mechanism for ultrasound-assisted extraction (UAE) suggested from the results of UAE of chlorogenic acid from *Cynara scolymus* L.(artichoke) leaves. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 330-336, 2016.

SANT'ANNA, V.; BIONDO, E.; KOLCHINSKI, E. M.; SILVA, L. F. S.; CORRÊA, A. P. F.; BACH, E.; BRANDELLI, A. Total polyphenols, antioxidant, antimicrobial and allelopathic activities of spend coffee ground aqueous extract. **Waste and biomass valorization**, v. 8, n. 2, p. 439-442, 2017.

SANTANA-MÉRIDAS, O.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; SÁNCHEZ-VIOQUE, R. Agricultural residues as a source of bioactive natural products. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 447-466, 2012.

SARRAZIN, C.; QUÉRÉ, J. L. L.; GRETSCH, C.; LIARDON, R. Representativeness of coffee aroma extracts: a comparison of different extraction methods. **Food Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 99-106, 2000.

SERAGLIO, S. K. T.; VALESE, A. C.; DAGUER, H.; BERGAMO, G.; AZEVEDO, M. S.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. **Food Research International**, v. 87, p. 60-67, 2016.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 111-125, 2015.

SCHOLZ, M. B. S.; FIGUEIREDO, V. R. G.; SILVA, J. V. N.; KITZBERGER, C. S. G. Características físico químicas de grãos verdes e torrados de cultivares de café (*Coffea arabica* L.) do Iapar. **Coffee Science**, v.6, p.245-255, 2011.

SCULLY, D.; JAISWAL, A.; ABU-GHANNAM, N. An investigation into spent coffee waste as a renewable source of bioactive compounds and industrially important sugars. **Bioengineering**, v. 3, n. 4, p. 33, 2016.

SHARAYEI, P.; AZARPAZHOOH, E.; ZOMORODI, S.; RAMASWAMY, H. S. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. **Lwt**, 101, 342-350.

SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Three phase partitioning as a large-scale separation method for purification of wheat germ bifunctional protease/amilase inhibitor. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 193–196, 2001.

SHIMOJI, H.; YAMASAKI, H. Inhibitory effects of flavonoids on alternative respiration of plant mitochondria. **Biologia Plantarum**, v. 49, n. 1, p. 117–119, 2005.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, p. 10-23, 2012.

SILVA, C. S.; GABRIEL, C.; CERQUEIRA, F.; MANSO, M. C.; VINHA, A. F. Coffee industrial waste as a natural source of bioactive compounds with antibacterial and antifungal activities. **The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs**, p. 131-136, 2015

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, 152-178, 1999.

SUN, Z.; ZHANG, X.; WU, H.; WANG, H.; BIAN, H.; ZHU, Y.; XU, W.; LIU, F. Antibacterial activity and action mode of chlorogenic acid against *Salmonella enteritidis*, a foodborne pathogen in chilled fresh chicken. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 1-10, 2020.

TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. São Paulo: Atheneu, p. 915, 2006.

TEIXEIRA, O. R., PASSOS, F. R., MENDES, F. Q. Qualidade físico-química e microscópica de 14 marcas comerciais de café torrado e moído. **Coffee Science**, v. 11, n. 3, p. 396 – 403, 2016.

TOUAIBIA, M.; JEAN-FRANCOIS, J.; DOIRON, J. Caffeic Acid, a versatile pharmacophore: an overview. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 8, p. 695-713, 2011.

TYAGI, B.; DUBEY, A.; VERMA, A. K.; TIWARI, S. Antibacterial activity of phenolics compounds against pathogenic bacteria. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 35, n. 1, p. 16-18, 2015.

VAN DYK, J. S. et al. Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilisation of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 26, p. 521-531, 2013.

VEGRO, C. L. R.; CARVALHO, F. C., Disponibilidade e utilização de resíduos gerados no processamento agroindustrial do café. **Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural**, Ilhéus, Bahia, 1994.

VEILLET, S.; TOMAO, V.; CHEMAT, F. Ultrasound assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. **Food Chemistry**, v. 123, n. 3, p. 905-911, 2010.

VUONG, Q. V.; THANH, D. T.; BHUYAN, D. J.; GOLDSMITH, C. D.; SADEQZADEH, E.; SCARLETT, C. J.; BOWYER, M. C. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for euphol from the medicinal plant, *Euphorbia tirucalli*, using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, 63, 197-202.

WEN, L.; ZHANG, Z.; RAI, D.; SUN, D.; TIWARI, B. K. Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from coffee silverskin: Impact on phenolic content, antioxidant activity, and morphological characteristics. **Journal of Food Process Engineering**, v. 42, n. 6, p. e13191, 2019.

WEN, C.; ZHANG, J.; ZHANG, H.; DZAH, C. S.; ZANDILE, M.; DUAN, Y.; MA, H.; LUO, X. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops—A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 48, p. 538-549, 2018.

WERF, V. D. R.; MARCIC, C.; KHALIL, A.; SIGRIST, S.; MARCHIONI, E. ABTS radical scavenging capacity in green and roasted coffee extracts. **LWT-Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 77-85, 2014.

WHITTAKER, R. H.; FEENY, P. P. Allelochemicals: chemical interactions among plants. **Science**, v. 171, n. 3973, p. 757-770, 1971.

YU, J.; VASANTHAN, T.; TEMELLI, F. Analysis of phenolic acids in barley by highperformance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4352-4358, 2001.

ZAMUZ, S.; MUNEKATA, P. E. S.; DZUVOR, C. K. O.; ZHANG, W.; SANT'ANA, A. S.; LORENZO, J. M. The role of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* in food. A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 385-393, 2021.

ZENGIN, G.; SINAN, K. I.; MAHOMOODALLY, M. F.; ANGELONI, S.; MUSTAFA, A. M.; VITTORI, S.; MAGGI, F.; CAPRIOLI, G. Chemical composition, antioxidant and enzyme inhibitory properties of different extracts obtained from spent coffee ground and coffee silverskin. **Foods**, v. 9, n. 6, p. 713, 2020.

ZHU, Z.; GUAN, Q.; KOUBAA, M.; BARBA, F. J.; ROOHINEJAD, S.; CRAVOTTO, G.; YANG, X.; LI, S.; HE, J. HPLC-DAD-ESI-MS2 analytical profile of extracts obtained from purple sweet potato after green ultrasound-assisted extraction. **Food Chemistry**, v. 215, p. 391-400, 2017.