

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

MARIANA DE OLIVEIRA SILVA

ESTUDO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA CASCA DE
CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

JOÃO PESSOA – PB

2021

MARIANA DE OLIVEIRA SILVA

**ESTUDO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA CASCA DE
CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Centro de Tecnologia, da Universidade Federal da Paraíba em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Dr^a. Taliana Kênia Alencar Bezerra

Coorientadora: Dr^a. Marta Suely Madruga

JOÃO PESSOA- PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586e Silva, Mariana de Oliveira.

Estudo de diferentes métodos de extração de compostos bioativos e avaliação da atividade antioxidante da casca de café (Coffea arábica L.) / Mariana de Oliveira Silva. - João Pessoa, 2021.

61 f. : il.

Orientação: Taliana Kênia Alencar Bezerra.

Coorientação: Marta Suely Madruga.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Café (Coffea arábica L.). 2. Compostos fenólicos. 3. Casca de café. 4. Extração convencional. 5. Extração assistida por ultrassom. 6. Atividade antioxidante. I. Bezerra, Taliana Kênia Alencar. II. Madruga, Marta Suely, III. Título.

UFPB/BC

CDU 633.73(043)

MARIANA DE OLIVEIRA SILVA

**ESTUDO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA CASCA DE
CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação APROVADA em 08/02/2021

BANCA EXAMINADORA

Taliana Kênia Alencar Bezerra

Prof^a. Dr^a. Taliana Kênia Alencar Bezerra - PPGCTA/CT/UFPB
Orientadora

Marta Suely Madruga

Prof^a. Dra^a. Marta Suely Madruga - PPGCTA/CT/UFPB
Coorientadora

Mário Roberto Maróstica Jr.

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior – DEPAN/FEA/UNICAMP
Examinador externo

Graciele Borges

Prof^a. Dr^a. Graciele da Silva Campelo Borges – PPGCTA/CTDR/UFPB
Examinador interno

*A minha mãe, dona Mari, por todo apoio,
amor, compreensão e incentivo.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que é o grande responsável por todas as minhas conquistas e que cuidou perfeitamente de cada detalhe, me dando força, coragem e sabedoria pra enfrentar todos os momentos de certezas e incertezas. Me fez crescer profissionalmente e pessoalmente e me faz enxergar, cada dia mais, que eu sou capaz de tudo ao Seu lado.

Aos meus pais, Marilene Amorim e José Maria da Silva, por todo amor que sempre me deram, por acreditarem em mim, não medindo esforços para me ajudar no que fosse preciso. Por todas as palavras de apoio e motivação e por serem os maiores exemplos da minha vida. Obrigada por tanto, amo vocês infinito!

Ao meu irmão, Reidene Oliveira, por seu apoio incondicional em todas as fases da minha vida e por me incentivar na realização deste sonho. Ao meu outro irmão, Romeu Oliveira, por todo cuidado e atenção que sempre me deu. Eu sou completamente apaixonada por vocês.

Aos meus sobrinhos, Everton Yego e Pedro Lucas e a minha afilhada, Raíssa Lara, por me mostrarem que eu sou capaz de amar muito além do que eu imaginava, e por tornarem minha vida mais alegre e colorida. E a toda miha família, por todo apoio que sempre me deram.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Taliana Bezerra, a quem tanto admiro, pela oportunidade e apoio no desenvolvimento deste projeto, por todos os ensinamentos e incentivo. Por ser tão paciente e generosa, por acreditar e confiar em mim em todos os momentos e por me inspirar tanto profissionalmente e como ser humano.

A minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Marta Madruga, pela orientação, pela acolhida em seus laboratórios, pelas correções e principalmte, por todo suporte dado para realização deste trabalho.

A minha banca examinadora, que tanto admiro profissionalmente, Prof.^a Dr.^a Graciele Borges e Prof. Dr. Mário Maróstica pela disponibilidade e pelas contribuições dadas a este trabalho. Sou extremamente grata, feliz e honrada em tê-los comigo nesse momento.

A Universidade Federal da Paraíba, que foi minha segunda casa durante seis anos, por tudo o que me foi proporcionado dentro da instituição para minha formação profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) e a todos os coordenadores, secretários e docentes que o compõem.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida. A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (Fapesq PB) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A Fazenda Yaguara Ecológica pela parceria e disponibilidade da matéria-prima.

A toda equipe do LAQA e LAF, pelos momentos compartilhados, por todas as risadas na hora do almoço, por todos os cafés da tarde e por tornarem essa etapa mais leve e divertida! Agradeço também as melhores técnicas de laboratório do Brasil, Mércia e Leila, por toda ajuda, puxões de orelha e ensinamentos. E a John, PIBIC que me acompanhou durante esses dois anos, por todo auxílio e dedicação na execução das análises e por toda parceria nos demais trabalhos realizados.

A Simone Franca e Juliana Lopes, amigas que o mestrado me proporcionou. Obrigada pela troca de conhecimento, pelos estresses e preocupações compartilhadas, mas principalmente, obrigada pelo companheirismo e pela amizade!

A minha amiga Ana Rita pelas inúmeras conversas e desabafos compartilhados, pela sua alegria contagiante, que tornou o dia-a-dia no laboratório mais divertido, e pela amizade construída com tanta verdade. A Samara Macedo pela companhia nas idas a missa e grupo de oração e pela disponibilidade para me ajudar sempre que precisei.

Ao melhor grupo de “Café da Tarde”, Bianca, Janaína, Mayara, Ruthchelly, Simone e Érica, por todos os momentos de descontração, desabafos, fofocas e risadas.

As minhas amigas Érica Monção e Deyse Alves, pela amizade, puxões de orelha, confidências e por toda cumplicidade construída ao longo desse tempo. Obrigada por tudo!

As minhas amigas de hoje e sempre, Roberta Paixão e Lucielma Costa, pela amizade verdadeira e por estarem sempre comigo em todos os momentos.

Ao meu amigo Fernando Azevedo, por ter sido tão presente em minha vida durante esses dois anos, escutando meus desabafos e angústias, vibrando com as minhas conquistas e me apoiando sempre no que fosse preciso.

Aos meus amigos Lucas Chaves, Gledson Silva, Weysser Felipe, Raíza Dantas, Amanda Oliveira, João Felipe, Layane Rosa e Samarone Xavier, que mesmo distantes fisicamente, sempre se fizeram presente. Agradeço pelos momentos de conversas compartilhadas e por terem sido apoio e incentivo sempre que precisei, a amizade de vocês é muito importante em minha vida!

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e realização do meu sonho, muito obrigada!

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Fernando Pessoa

RESUMO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, apresentando forte impacto na economia do país. Diante disto, a cultura do café dá origem a elevados volumes de subprodutos, tendo destaque para a casca. As cascas do café são caracterizadas por conter metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, apresentando-se como matéria-prima para obtenção de compostos bioativos de interesse em alimentos. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar diferentes métodos de extração (convencional sólido-líquido com temperatura de 60 °C em banho-maria e não convencional assistido por ultrassom), formas de obtenção da matéria-prima (in natura e desidratada) e soluções extratoras (água 100% ou etanol 100% ou a mistura de ambos 1:1) de compostos bioativos a partir da casca de café (*Coffea arabica* L.). Os extratos foram avaliados através do potencial antioxidante utilizando os ensaios de atividade sequestradora do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH•), atividade sequestradora do radical 2,2- azino-bis (3-etilbezotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS•+) e redução ao ferro (FRAP) e posteriormente foi realizada a quantificação dos compostos fenólicos totais, flavonoides totais, taninos condensados e identificação dos compostos fenólicos majoritários por cromatografia líquida. Verificou-se que a mistura de água e etanol (1:1) apresentou melhor capacidade de extração dos compostos com atividade antioxidante e ambos os métodos, convencional e não convencional exibiram resultados satisfatórios. Somados a isso, verificou-se também que os melhores resultados foram apresentados pelos extratos que utilizaram a matéria-prima desidratada. O extrato EBDM apresentou elevada atividade antioxidante (84,95 %, e 92,81%) para os ensaios DPPH e ABTS. Avaliando o teor de compostos fenólicos totais (97,89 mg CAE/g) e taninos condensados (79,71 mg CE/g) dos extratos, corroborando com os resultados das atividades antioxidantes, de forma geral, a solução extratora de melhor atuação foi a mistura de água e etanol (1:1), utilizando a casca desidratada e extração convencional como melhor método, apresentando maiores teores dos compostos bioativos em questão. Para análise de flavonoides totais, além do extrato que usou a mistura dos solventes, o extrato obtido em água (15,69 mg CE/g) obteve destaque na extração pelo método convencional. No entanto, a partir da análise do perfil fenólico, os compostos majoritários encontrados em ambos os extratos foram o ácido gálico, cafeico e clorogênico, sendo este último o composto identificado em maior concentração (337,07 µg/g). Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a utilização da casca de café se mostrou eficiente como uma matéria-prima para obtenção de extratos ricos em compostos bioativos com elevado potencial antioxidante.

Palavras- chave: Atividade antioxidante, compotos fenólicos, café, casca de café, extração convencional, extração assistida por ultrassom.

ABSTRACT

Brazil is the world's largest coffee producer and exporter, with a strong impact on the country's economy. In view of this, the coffee culture gives rise to high volumes of waste, with emphasis on the husk. Coffee husks are characterized by exhibiting secondary metabolites, such as phenolic compounds, presenting themselves as raw material for obtaining bioactive compounds of interest in food. Therefore, the objective of the work was to evaluate different extraction methods (conventional solid-liquid with a temperature of 60 °C in a water bath and unconventional assisted by ultrasound), ways of obtaining the raw material (in natura and dehydrated) and solutions extractors (100% water or 100% ethanol or a mixture of both 1: 1) of bioactive compounds from the coffee husk (*Coffea arabica* L.). The extracts were evaluated for their antioxidant potential using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH •) scavenging activity assay, 2,2-azino-bis (3-ethylbezothiazoline) -6-acid scavenging activity sulfonic (ABTS • +) and reduction to iron (FRAP) and later the quantification of total phenolic compounds, total flavonoids, condensed tannins and identification of major phenolic compounds by liquid chromatography was performed. It was found that the mixture of water and ethanol (1: 1) showed better extraction capacity of compounds with antioxidant activity and both methods, conventional and unconventional, showed satisfactory results. Added to this, it was also found that the best results were presented by the extracts that used the dehydrated raw material. The EBDM extract showed high antioxidant activity (84.95%, and 92.81%) for the DPPH and ABTS assays. Evaluating the content of total phenolic compounds (97.89 mg CAE / g) and condensed tannins (79.71 mg CE / g) in the extracts, corroborating with the results of antioxidant activities, in general, the best extraction solution was the mixture of water and ethanol (1: 1), using the dehydrated peel and conventional extraction as the best method, presenting higher levels of the bioactive compounds in question. For analysis of total flavonoids, in addition to the extract that used the solvent mixture, the extract obtained in water (15.69 mg CE / g) was highlighted in the extraction by the conventional method. However, from the analysis of the phenolic profile, the major compounds found in both extracts were gallic, caffeic and chlorogenic acid, the latter being the compound identified in the highest concentration (337.07 µg / g). Thus, the results obtained in this work demonstrate that the use of coffee husks proved to be efficient as a raw material for obtaining extracts rich in bioactive compounds with high antioxidant potential.

Keywords: Antioxidant activity, phenolic compounds, coffee, coffee husk, conventional extraction, ultrasound assisted extraction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fruto do café.....	14
Figura 2	Etapas do processamento do café, por via úmida e seca.....	16
Figura 3	Principais classes de compostos fenólicos.....	20
Figura 4	Estrutura química dos principais compostos bioativos encontrados na casca de café.....	21
Figura 5	Casca de café in natura e desidratada.....	31
Figura 6	Delineamento experimental da obtenção e caracterização de extratos da casca de café.....	32

ARTIGO

Figure 1	(a) Effects of extraction variables for DPPH; (b) Effects of interaction between extraction variables for DPPH; (c) Effects of extraction variables for ABTS; (d) Effects of interaction between extraction variables for ABTS; (e) Effects of extraction variables for FRAP; (f) Effects of interaction between extraction variables for FRAP.....	48
Figure 2	(a) Effects of extraction variables for total phenolic; (b) Effects of interaction between extraction variables for total phenolic; (c) Effects of extraction variables for flavonoids; (d) Effects of interaction between extraction variables for flavonoids; (e) Effects of extraction variables condensed tannins; (f) Effects of interaction between extraction variables for condensed tannins.....	51
Figure 3	Principal componente analysis (PCA).....	53
Figure 4	Representative scheme of extraction procedure.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Atividades bioativas da casca de café.....	18
Tabela 2	Métodos e seus princípios de ação utilizados na determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> de alimentos.....	24
Tabela 3	Soluções extratoras utilizadas na recuperação de compostos bioativos dos subprodutos do café.....	29

ARTIGO

Table 1	Results of antixodant activity of coffee husk extracts.....	48
Table 2	Total phenolic contente, total flavonoids and condensed tannins from coffee husk extracts.....	50
Table 3	Profile of major phenolic compounds from coffe husk extracts.....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 CAFÉ: PRODUÇÃO, CONSUMO E EXPORTAÇÃO.....	12
2.2 SUBPRODUTOS DO CAFÉ.....	15
2.2.1 Casca de café.....	16
2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NA CASCA DE CAFÉ.....	19
2.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	21
2.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	25
2.5.1 Extração convencional sólido-líquido utilizando temperatura.....	25
2.5.2 Extração assistida por ultrassom	26
2.6 SOLUÇÕES EXTRATORAS DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.....	31
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	32
3.3.1 Extração convencional sólido-líquido com temperatura de 60°C em banho- maria.....	32
3.3.2 Extração assistida por ultrassom.....	32
3.4 DETERMINAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	33
3.4.1 Compostos fenólicos totais.....	33
3.4.2 Determinação de flavonoides totais.....	33
3.4.3 Determinação de taninos condensados.....	34
3.4.4 Perfil de compostos fenólicos.....	34
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO.....	34
3.5.1 Atividade sequestradora do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH•).....	34

3.5.2 Atividade Sequestradora do Radical 2,2- azino-bis (3-etilbezotiazolina)- 6-ácido sulfônico (ABTS●+)	35
3.5.3 Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)	36
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
REFERÊNCIAS	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 ARTIGO	46
5 CONCLUSÃO	59

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil se encontra como o maior produtor e exportador mundial de café apresentando forte impacto na economia, sendo o país responsável por 30% do mercado internacional, produzindo um total de aproximadamente 20 milhões de sacas, onde 46,25% são destinadas ao consumo interno. Sua produção mundial atingiu cerca de 168,72 milhões de sacas entre 2018-2019 (USDA, 2019; ABIC, 2019).

Entretanto, devido à elevada produção de café, após o processamento, acarreta na geração de uma grande quantidade de subprodutos, dentre os principais, a casca, a polpa, a mucilagem e pergaminho (GEMECHU, 2020).

Segundo Murthy e Naidu (2012), os subprodutos do café são ricos em nutrientes como proteínas, carboidratos, fibras alimentares além de serem fonte de compostos bioativos como a cafeína e o ácido clorogênico. Nos últimos anos estudos vem avaliando a composição química de matrizes vegetais e seus subprodutos, na busca por uma fonte natural desses compostos bioativos. Esses compostos apresentam alta capacidade antioxidante, principalmente por apresentarem elevado teor de compostos fenólicos e por isto o uso de subprodutos tem recebido uma grande atenção (HU; WANG; ZHANG; QIU, 2019; CASTALDO et al., 2020).

Diante disto, os subprodutos do café, com destaque para a casca foi objeto de estudo de pesquisadores, que estão atualmente em busca de compostos bioativos com potencial antioxidante (ANDRADE et al., 2012; MATOS, 2014; BAGUETA et al., 2017; SOUSA, 2018; IRIONDO-DEHOND et al., 2019a).

No entanto, uma grande desvantagem em relação a esses compostos é a dificuldade de extraí-los. Ainda assim, estudos sobre métodos de extração de compostos bioativos vêm sendo desenvolvidos, e em paralelo, métodos de quantificação e identificação dos compostos (QUATRIN et al., 2019; BARROS et al., 2019).

Segundo Wijngaard et al. (2012), diferentes técnicas são utilizadas para a extração, podendo ser classificadas em métodos convencionais e não convencionais. Dentre as técnicas convencionais pode-se destacar a extração sólico-líquido com aquecimento utilizando banho-maria. Nesse método de extração, a aplicação do calor aumenta a solubilidade dos compostos e faz com que o solvente aumente sua capacidade de penetração na matriz para extrair os compostos de interesse (ERDOGAN et al. 2011; MARAN et al. 2013).

Dentre os métodos não convencionais a extração assistida por ultrassom tem ganhado destaque, o método consiste na aplicação de ondas mecânicas que atuam rompendo a parede celular da matriz vegetal facilitando o contato sólido-solvente e assim liberando os compostos bioativos (ARRUDA et al. 2019).

Existem vários solventes que são utilizados no processo de extração de compostos bioativos. Etanol, metanol, acetona e misturas aquosas são frequentemente usados e tem demonstrado eficiência na recuperação desses compostos. Entretanto, não existe um único solvente que seja capaz de extrair ao mesmo tempo todas as classes de compostos bioativos e sendo assim, é de extrema importância estudos para se determinar a melhor solução extratora dos compostos de interesse (NGO et al., 2017; MAGRO; CASTRO, 2020).

A extração dos compostos fenólicos a partir da casca do café foi reportada anteriormente (ANDRADE et al., 2012; MATOS, 2014; BAGUETA et al., 2017; SOUSA, 2018), nestas pesquisas, as extrações foram realizadas pelas técnicas de ultrassom, soxhlet, extração supercrítica, maceração e shaker, e os solventes orgânicos mais eficientes foram metanol, etanol, acetato de etila, éter de petróleo e água.

Diante do supracitado, o presente trabalho teve como objetivo estudar diferentes métodos de extração (convencional e assistida por ultrassom) e soluções extratoras (etanol, água e a mistura de ambos) de compostos fenólicos a partir da casca de café (*Coffea arabica* L.), in natura e após desidratação, bem como quantificar e identificar os compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos. E dessa forma, obter compostos fenólicos antioxidantes através de uma matriz vegetal que apresenta baixo custo, utilizando métodos de extração simples e eficientes bem como, obter informações importantes acerca de possíveis propriedades funcionais da casca de café, fornecendo suporte científico para o desenvolvimento de produtos alimentícios ricos em antioxidantes naturais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CAFÉ: PRODUÇÃO, CONSUMO E EXPORTAÇÃO

A história do café teve origem na Etiópia há cerca de mil anos atrás, onde foram observados seus efeitos quando seus grãos eram consumidos. O país responsável pela difusão dessa cultura foi a Arábia, onde o mesmo se tornou conhecida como “vinho da Arábia”, ao ser inserido na Europa no século XIV (ABIC, 2019).

De acordo com Hejna (2021), o café é a *commodity* alimentar mais importante do mundo, onde cerca de 60 países tropicais e subtropicais produzem café extensivamente e, para alguns desses países, essa matéria-prima é o principal produto agrícola de exportação.

A bebida café é amplamente consumida na maior parte do mundo em virtude aos seus atributos de sabor agradável, além do seu efeito estimulante. Os maiores mercados de consumo da bebida café são os países Estados Unidos, Brasil e Alemanha, sendo o Brasil o segundo maior consumidor do produto (AYSELLI et al., 2021).

Sua produção mundial nos anos de 2018-2019 atingiu cerca de 168,72 milhões de sacas, sendo o Brasil responsável por 1/3 da produção mundial de café (ABIC, 2019). Para 2019-2020 a produção mundial do café foi estimada em 169,34 milhões de sacas, sendo o consumo global esperado de 168,39 milhões de sacas. O Brasil é o maior produtor de café, onde sua produção se concentra nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e São Paulo (ICO, 2020).

Segundo o Conselho dos Exportadores de Café do Brasil (CECAFÉ), no período de Janeiro a Setembro de 2020, o total de café exportado foi de 30,5 milhões de sacas, com uma receita equivalente a R\$ 19,6 bilhões. Entre as variedades embarcadas, o café arábica teve participação de 77,9% nas exportações, já o café robusta também se destacou, pelo aumento de 22,3% nas exportações.

Os principais destinos do café brasileiro foram Estados Unidos com 5,6 milhões de sacas de café, Alemanha, com 5,1 milhões de sacas, Bélgica, com 2,4 milhões de sacas, Itália, com 2,3 milhões de sacas, Japão com 1,5 milhão de sacas, Turquia com 960,8 mil sacas, Federação Russa, com 940,5 mil sacas, México, com 782,2 mil sacas, Espanha com 700 mil sacas e Canadá, com 624,2 mil sacas (CECAFÉ, 2020).

Os grãos do café podem ser produzidos e processados tanto por unidades de cooperativas agrícolas como por grandes indústrias (DEBASTIANI et al. 2021). Segundo Consonni; Polla; Gagliani (2018), o cultivo convencional do café ainda é o mais utilizado nas lavouras brasileiras, nesse sistema de cultivo faz-se o uso de produtos químicos, como fertilizantes, tanto para adubação como para o manejo de pragas, na busca de se obter uma maior produtividade.

No entanto, existe uma tendência de substituição dessa forma de cultivo por novas técnicas, como por exemplo, a utilização do sistema orgânico. Atualmente, a agricultura orgânica tem se destacado pelos benefícios que oferece para a segurança alimentar e sustentabilidade, pela ausência do uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos (BEDOYA et al. 2017).

Existem mais de 100 espécies de café dispersas pelo mundo, no entanto, apenas duas apresentam importância econômica, *Coffea arabica* (Arábica) e *Coffea canephora* (Robusta), sendo responsáveis por 70% e 30% da produção global, respectivamente, sendo conhecidos comercialmente como café arábica e café robusta (ESQUIVEL; JIMENEZ, 2012; NEVES et al., 2019). A composição do grão de café pode variar de acordo com a espécie utilizada, sendo o café arábica o mais apreciado pelos consumidores (BAGUETA et al., 2017).

O fruto do café é desenvolvido em uma cereja de 10-15 mm de comprimento, contendo duas sementes, ou seja, dois grãos de café. Os grãos são cobertos em camadas de pericarpo, que é formado por camadas externas de exocarpo, mesocarpo e endocarpo do fruto (Figura 1). Essas camadas são a casca de café (exocarpo), polpa de café (mesocarpo), pergaminho de café (endocarpo) e prata de café (FERREIRA et al., 2019; GEMECHU, 2020).



Figura 1- Fruto do café
Fonte: Ferreira et al., 2019

O fruto do café apresenta metabólitos primários e secundários que se acumulam de forma desigual em todas as partes do fruto (GEMECHU, 2020). Da mesma forma que outras matrizes vegetais, os grãos de café são compostos de polissacarídeos, como celulose e hemicelulose, contendo também, quantidades significativas de carboidratos solúveis, proteínas, aminoácidos livres e minerais (ESQUIVEL; JIMENEZ, 2012).

Em soma, os metabólitos secundários que são encontrados em maior proporção no fruto do café são a cafeína (abundante na bebida café e que está associado aos efeitos estimulantes) e os compostos fenólicos, mais especificamente, os ácidos clorogênicos, que são amplamente difundidos como promotores de saúde (CLIFFORD; JAGANATH; LUDWIG; CROZIER, 2017; HU; WANG; ZHANG; QIU, 2019). Devido à composição química e amplo consumo, o café e os seus subprodutos vem sendo objeto de estudo de interesse de pesquisadores.

2.2 SUBPRODUTOS DO CAFÉ

A grande produção e consumo do café acarretam em uma elevada quantidade de subprodutos gerados (ANDRADE et al., 2012). De acordo com Janissen e Huynh (2018), o processamento do café produz cerca de 0,5 e 0,8 toneladas dos subprodutos polpa e casca de café, respectivamente, ao mesmo tempo que gera cerca de seis toneladas de borra de café por ano. O tipo do subproduto gerado é consequente do método utilizado para o processamento do café, pois existem dois métodos (Figura 2), via seca e úmida, a diferença dos métodos se dá pela complexidade e tipo de café que é produzido (GEMECHU, 2020).

No processamento por via seca após a colheita as cerejas de café são secas até um teor de umidade de 10-11%. Durante este processo os grãos do café são separados e o material que os cobre, casca, polpa e pergaminho são retirados em máquina de descasque, sendo os principais subprodutos gerados. O principal produto desse processo é denominado café não lavado. No processamento úmido as polpas dos frutos são retiradas antes da etapa de secagem. Esse processo é baseado na despolpação dos frutos, gerando o subproduto polpa de café. Em seguida os grãos podem ser fermentados, onde o produto final é chamado de café despolpado, ou podem ser diretamente secos e o produto final é chamado de café descascado. Em ambos os casos, após secagem a aproximadamente 12% de umidade, os grãos são descascados novamente para remover o pergaminho (OLIVEIRA; FRANCA, 2015; ALVES et al., 2017; GEMECHU, 2020).

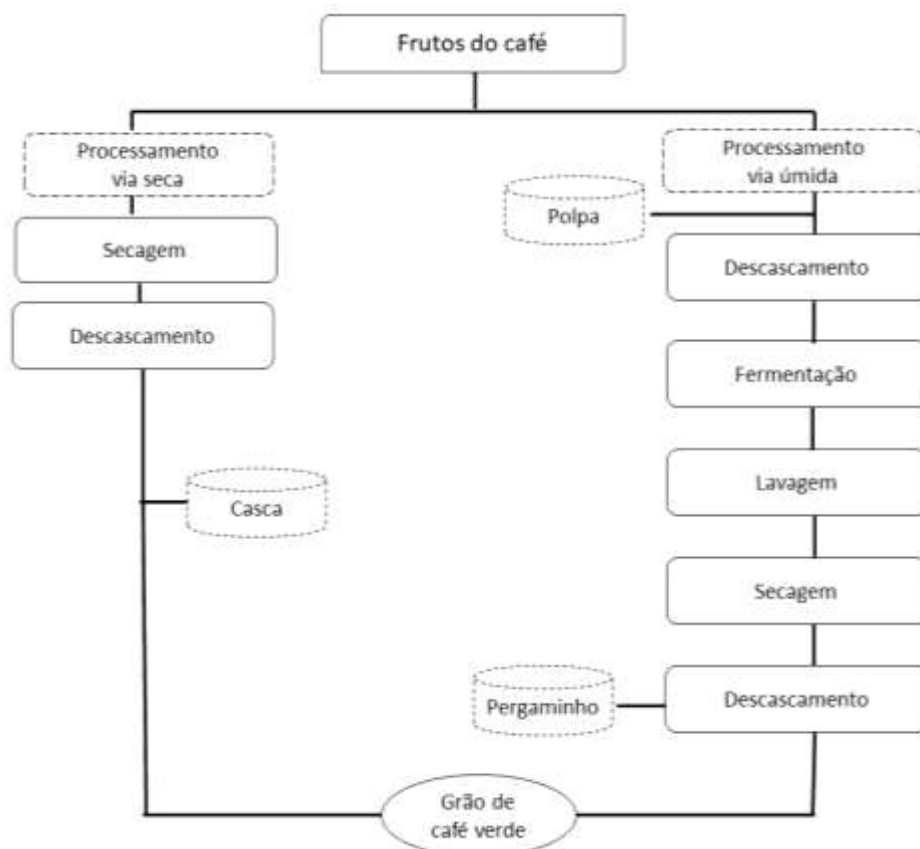


Figura 2- Etapas do processamento de café, por via seca e úmida
 Fonte: Oliveira e Franca, 2015

Os subprodutos oriundos do café se apresentam como potenciais recursos agroindustriais ricos em compostos fenólicos que podem ser utilizados pela indústria de alimentos como ingredientes na formulação de novos produtos, para uso como aditivos naturais (IRIONDO-DEHOND et al. 2019b). Podendo se apresentar também, como uma fonte sustentável, já que a preocupação com problemas ambientais tem aumentado o interesse sobre o destino desses subprodutos (GEMECHU, 2020). E dessa forma, de acordo com Setter et al. (2020) é de grande importância a busca de alternativas e tecnologias que permitam o uso desses subprodutos de maneira sustentável.

2.2.1 Casca de café

Apesar da quantidade de subprodutos agroindustriais que são gerados no mundo, apenas uma pequena parcela é aproveitada. Da geração dos subprodutos agrícolas no Brasil, a casca de arroz, o bagaço de cana e a casca de café são os predominantes (CAMPOS-VIEGA et al., 2015).

A composição química da casca do café pode variar de acordo com sua variedade, condições de cultivo e seu processamento (BAGUETA et al., 2017). De acordo com Janissen e Huynh (2018) a composição química da casca de café em base seca, apresenta carboidratos (57,8%), fibras solúveis (31,9%), cinzas (6%), lipídeos (2%), proteínas (9,2%), podendo ser uma fonte de compostos bioativos, como a cafeína (1,3%), taninos (4,5%) e cianidinas (20%), para a indústria alimentícia.

Os compostos fenólicos presentes na casca do café apresentam interesse de estudo por pesquisadores devido aos seus potenciais efeitos positivos na saúde humana. Até o momento, esse subproduto tem sido usado como fonte de fibra alimentar e também como fonte de antocianinas (GEMECHU, 2020). Dessa forma, considerando sua composição química, a casca do café apresenta grande potencial como ingrediente alimentar e como fonte natural de nutrientes e compostos bioativos (IRIONDO-DEHOND et al., 2019a).

Estudos relacionados com o aproveitamento das cascas do café são de grande interesse e importância e resultados de algumas pesquisas comprovam o potencial de sua utilização (GEMECHU, 2020). Na Tabela 1 encontram-se descritas pesquisas que utilizaram a casca de café e suas bioatividades.

Tabela 1. Atividades bioativas da casca de café.

Bioatividade	Método utilizado	Resultados encontrados	Referência
Antioxidante	O estudo avaliou a atividade antioxidante in vitro da casca de café pelos ensaios DPPH e ABTS. A extração dos compostos foi realizada pelos métodos de ultrassom, soxhlet e supercrítica, com etanol, hexano, acetato de etila e diclorometano como solução extratora. A identificação dos compostos foi realizada utilizando HPLC.	Os compostos fenólicos encontrados em maior concentração nos extratos da casca de café foram os ácidos clorogênico, gálico, tânico, além da cafeína e teobromina. Os extratos apresentaram porcentagem de inibição frente ao radical DPPH que variaram de 16,5 a 90,3% e para o radical ABTS de 4,3 a 29,3 %.	Andrade et al. (2012)
Antimicrobiano	O estudo avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos da casca de café através da Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima (MIC-MFC). Os compostos foram obtidos através de banho ultrassônico e identificados através de Cromatografia líquida de alta pressão (UHPLC).	Os resultados indicaram que os extratos metanólicos da casca de café apresentaram atividade antimicrobiana de <i>P. camemberti</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>A. flavus</i> e <i>A. niger</i> . Os valores da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) para as cepas de <i>Penicillium</i> variaram de 6,3 a 50 g / L e nas cepas de <i>Aspergillus</i> os dados detectados variaram de 25 a 50 g / L.	Castaldo et al. (2018)
Anti-inflamatório	O trabalho avaliou o potencial inibitório de extratos aquosos da casca de café e seus compostos na adipogênese, inflamação relacionada à obesidade, disfunção mitocondrial e resistência à insulina, in vitro.	Os resultados da pesquisa mostra que os extratos da casca de café reduziu o acúmulo de lipídios e aumentou a atividade mitocondrial em adipócitos 3T3-L1. Os compostos fenólicos encontrados inibiram a adipogênese e provocaram o escurecimento dos adipócitos. A supressão da interação macrófagos-adipócitos aliviou a disfunção mitocondrial desencadeada por inflamação e a resistência à insulina	Rebollo-Hernanz et al. (2018)
Efeito prebiótico	O trabalho produziu a xilooligossacarídeo (XOS) por hidrólise enzimática, utilizando a casca de café como fonte de xilana. Foi realizados testes de digestibilidade da XOS e avaliação do potencial antioxidante.	Os resultados demonstram que as culturas probióticas testadas <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i> foram capazes de utilizar a XOS produzida através da casca de café, apresentando crescimentos nos meios que continham a XOS, consumindo as frações X2 e X3 como única fonte de carbono. O XOS produzido também exibiu uma considerável resistência à hidrólise de enzimas digestivas, bem como uma atividade antioxidante.	Avilla et al. (2020)

2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES NA CASCA DE CAFÉ

Os compostos bioativos exercem efeitos positivos na saúde humana devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que podem estar associadas à prevenção de doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, entre outros benefícios (MURADOR et al., 2019).

Nos últimos anos, diversos compostos bioativos vêm sendo obtidos de fontes naturais, classificados em diferentes categorias, como os compostos fenólicos, vitaminas, carotenóides, alcalóides e compostos organossulfurados. Muitos desses compostos bioativos são isolados de frutas, vegetais, óleos e grãos integrais (CHEMAT et al., 2015; ARAÚJO et al., 2019; ARRUDA et al., 2019; MEREGALLI et al., 2020; MUNEKATA et al., 2020; KALSCHNE et al., 2020). No entanto, de acordo com Recharla et al. (2017) a incorporação desses compostos em produtos alimentares comerciais é uma tarefa desafiadora em função da sua baixa estabilidade e alta solubilidade.

Os compostos bioativos que vem sendo mais estudados e encontrados em fontes vegetais são os compostos fenólicos, que além de apresentarem diversos benefícios à saúde, também podem apresentar inúmeras aplicações na ciência e indústria de alimentos (RASHMI; NEGI, 2020).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários distribuídos no reino vegetal, são caracterizados por possuir anéis aromáticos que contêm um ou mais grupos fenóis e apesar da grande variedade desses compostos que ocorrem na natureza, os principais são os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (Figura 3) (HAMINIUK et al., 2012). De acordo com Nayak; Liu; Tang (2015), esses compostos fenólicos despertam grande interesse em função da sua capacidade antioxidante, observada em estudos *in vivo* e *in vitro* (SHAHIDI; YEO, 2016).

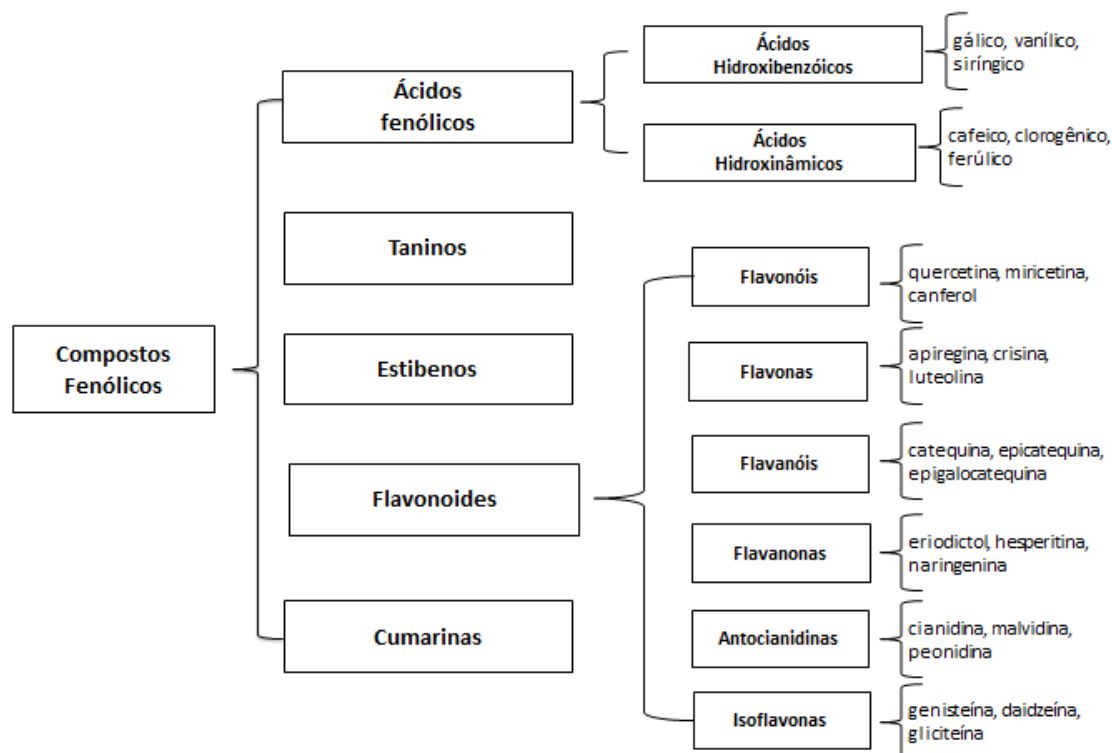


Figura 3- Principais classes de compostos fenólicos
 Fonte: Ferreira e Abreu, 2007

Nos vegetais, os subprodutos também se apresentam como fonte de compostos fenólicos. E desta forma, os mesmos exibem potencial de utilização e posterior aplicação. Dentre os subprodutos vegetais destacam-se as cascas (GEMECHU, 2020).

As propriedades antioxidantes presentes na casca do café são provenientes, principalmente, da presença da cafeína e do ácido clorogênico e seus metabólitos (ANDRADE et al., 2012). Os ácidos clorogênicos são os principais compostos fenólicos encontrados no café e seus subprodutos, pertencem à família de ésteres formados por ácidos hidroxinâmicos como os ácidos ferúlico, cafeico e fumárico com o ácido quínico. As principais classes de ácidos clorogênicos no café e seus subprodutos são os ácidos cafeoilquínico (CQA), os ácidos dicafeoilquínico (CQA) e os ácidos feruloilquínico (FQA) (MONTEIRO; FARAH, 2012; CLIFFORD; JAGANATH; LUDWING; CROZIER, 2017).

A cafeína (1,3,7 trimetilxantina) é uma metilxantina encontrada em maior quantidade na natureza, seguida pela teobromina e teofilina. As metilxantinas são pseudoalcaloides originadas de bases purínicas, de caráter anfótero e esses compostos são encontrados em várias bebidas de importância econômica e cultural como o café, chá e refrigerantes (HU; WANG; ZHANG; QIU, 2019; KALSCHNE et al., 2019).

Zapata et al. (2020), avaliou o efeito anti-obesidade da cafeína do chá-mate no acúmulo de lipídios in vitro e obesidade induzida por dieta in vivo em ratos, e observou que houve redução do acúmulo de gordura corporal em animais alimentados com uma dieta rica em gordura e sacarose. Os resultados desmosntram que o chá-mate e a cafeína podem ser considerados como agentes anti-obesidade.

De acordo com Castaldo et al. (2018) o composto fenólico encontrado em maior quantidade em casca de café é o ácido 5-O cafeoilquínico, além de apresentar quantidades significativas de trigonelina (1,83 mg / g), cafeína (1,33 mg / g), teofilina (15,04 mg / kg) e teobromina (3,33 mg / kg).

Exemplos de compostos bioativos comumente encontrados na casca de café estão apresentados na (Figura 4).

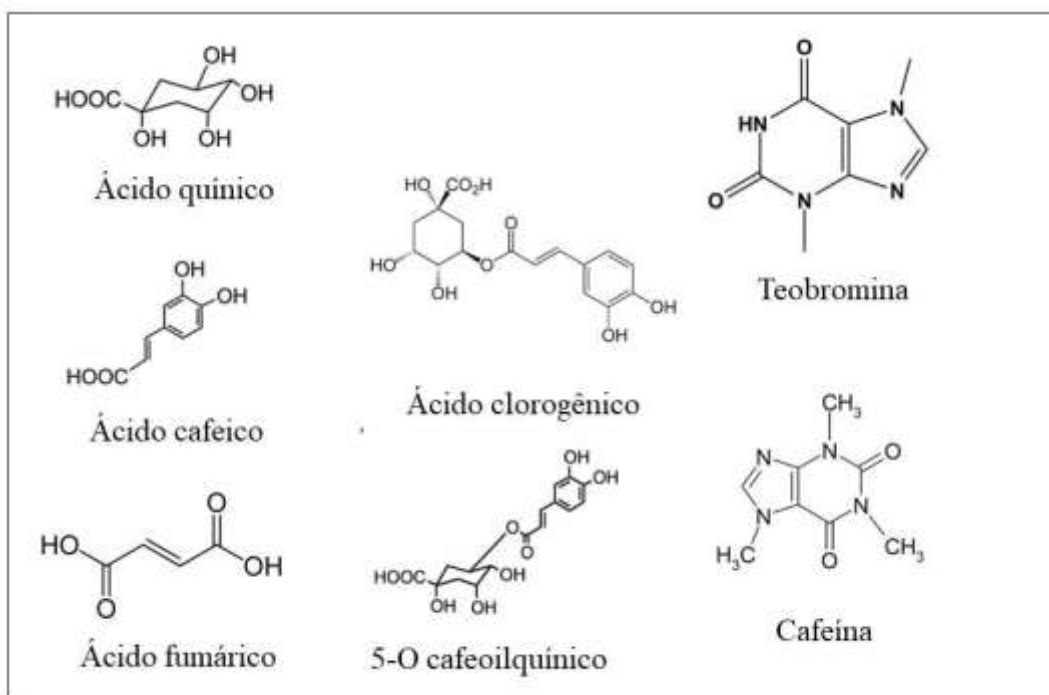


Figura 4- Estrutura química dos principais compostos bioativos encontrados na casca de café
Fonte: Adaptado de Gemechu (2020)

2.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Reações de oxidação ocorrem naturalmente nos tecidos vivos durante o metabolismo para que se tenha um bom funcionamento do organismo. O processo de oxidação ocorre pela transferência de elétrons de uma molécula que se oxida e outra que se reduz. Durante a

oxidação, o agente oxidante abstrai um átomo de hidrogênio de uma molécula susceptível formando radical livre, pela ação das espécies reativas de oxigênio (ROS) ou nitrogênio (RNS) (BEKHIT et al., 2013; LEÃO et al., 2017).

Os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio são íons instáveis e reativos, em função da presença de elétrons desemparelhados, que favorecem a reação de oxidação de outras moléculas, como proteínas, lipídeos e DNA (SHARIDI; ZHONG, 2015; GRANATO et al., 2018).

Segundo Amarowicz et al. (2004), espécies reativas de oxigênio (ERO) que se encontram na forma de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, são produtos naturais do metabolismo humano, no entanto, quando em excesso no organismo podem atacar as moléculas biológicas levando a lesão de células ou dos tecidos associados a doenças degenerativas. Apesar de o organismo humano apresentar mecanismos de defesa para combater o dano oxidativo, existem evidências epidemiológicas que apontam que o consumo de alimentos ricos em antioxidantes pode auxiliar o organismo no combate a redução dos danos oxidativos (ROJAS; BUITRAGO, 2020).

Halliwell (1996) define antioxidante como uma molécula capaz de retardar ou reduzir a oxidação de outras moléculas. Os antioxidantes são divididos em categorias de acordo com sua função que pode ser eliminadores de radicais livres, eliminadores de agentes oxidantes, compostos que inibem a geração de oxidantes, agentes quelantes de metais de transição, podem ser solúvel em água e lipossolúvel, de fonte exógena e endógena (GRANATO et al., 2018).

Os antioxidantes podem neutralizar a ação das espécies reativas de membranas celulares por três mecanismos, transferência de átomo de hidrogênio (HAT), transferência de elétron (SET) e por capacidade de quelar metais de transição (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Os métodos baseados na transferência de átomos de hidrogênio medem a capacidade que um antioxidante tem de sequestrar radicais livres pela doação de um átomo de hidrogênio, como mostra a equação 1:



Entretanto, os métodos baseados na transferência de elétrons medem a capacidade de um antioxidante de transferir um elétron para reduzir os radicais livres, metais pró-oxidante e carbonilos, como mostra a equação 2 (APAK et al., 2007, 2013; GRANATO et al., 2018):



As atividades antioxidantes são avaliadas por diferentes métodos e são classificados de acordo com seu mecanismo de ação (Tabela 2). Os ensaios de transferência de átomos de hidrogênio (HAT) incluem a capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC). Os métodos de transferência de elétrons (SET) incluem a capacidade redutora do ferro (FRAP), efeitos de eliminação do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e do radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) (APAK et al., 2007; SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Entretanto, não existe um procedimento padrão para se avaliar a capacidade antioxidante de compostos, porém os métodos de DPPH, ABTS, ORAC e FRAP estão entre as técnicas mais utilizadas para avaliar a capacidade antioxidante in vitro de alimentos e extratos de plantas (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Tabela 2. Métodos e seus princípios de ação utilizados na determinação da atividade antioxidante *in vitro* de alimentos

Método	Princípio	Referências
Atividade Sequestradora do Radical 2,2-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS•)	O composto ABTS é oxidado a sua forma radical cátion (ABTS• ⁺) a partir da reação com persulfato de potássio (K ₂ S ₂ O ₈), que absorve em comprimento de onda de 734 nm, na coloração verde-azulado, por meio da perda de um elétron. Na presença de um antioxidante ocorre a descoloração da solução com o decréscimo da absorbância.	Apak et al. (2007); Shahidi; Zhong (2015); Vuolo; Lima; Maróstica Júnior (2020)
Atividade Sequestradora do Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•)	O método avalia a atividade sequestradora do radical DPPH• em solução alcoólica, que absorve em comprimento de onda de 515 nm, na coloração púrpura. Pela ação de um antioxidante o radical é reduzido formando difenil—picrilhidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, sendo acompanhada pelo decréscimo da absorbância que é proporcional à concentração de sequestradores de radicais adicionados à solução reagente de DPPH.	Haminiuk et al. (2012); Shahidi; Zhong (2015); Vuolo; Lima; Maróstica Júnior (2020)
Capacidade Redutora do Ferro (FRAP)	Baseia na capacidade do antioxidante de reduzir o Fe ³⁺ a Fe ²⁺ , na presença de 2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), em baixo pH (3,6). O TPTZ de cor amarela é reduzido a forma ferrosa Fe ²⁺ , pela ação do antioxidante formando um complexo corado de cor azul violeta com absorção a 593 nm.	Benzie; Strain, (1999); Sucupira et al. (2012); Vuolo; Lima; Maróstica Júnior (2020)
Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC)	Mede a capacidade de um antioxidante contra o radical peroxila que é gerado através da decomposição de compostos nitrogenados tais como AAPH (2,2'-azobis-(2-metilpropionamida)-dihidroclorado) a 37 °C, onde o antioxidante e um marcador fluorescente disputam por radicais peroxilas que são gerados pela decomposição de compostos nitrogenados. A atividade antioxidante é determinada calculando a curva de decaimento da fluorescência de um indicador na presença e ausência do antioxidante.	Apak et al. (2007); Shahidi; Zhong (2015)

2.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A extração é a primeira etapa de qualquer estudo relacionado à obtenção de compostos bioativos a partir de vegetais (AZMIR et al. 2013). Esse procedimento é utilizado para quantificar e caracterizar compostos presentes em uma determinada matriz ou recuperar determinado composto alvo para aplicação na ciência (AMEER; SHAHBAZ; KWON, 2017).

Segundo Meregalli et al. (2020), a extração é uma operação unitária que envolve a transferência de massa, separando os compostos de interesse de uma matriz através de processos que podem ser físicos, químicos e mecânicos, sendo realizada em meio sólido-líquido, líquido-líquido ou gás-líquido.

Diversas técnicas estão sendo desenvolvidas e aprimoradas na busca de facilitar a extração dos compostos bioativos de matriz alimentar. As diferentes técnicas podem ser classificadas em métodos convencionais e não convencionais (WIJNGAARD et al., 2012).

As técnicas convencionais, através da extração sólido-líquido utilizando banho-maria, soxhlet, hidrodestilação e maceração, são as técnicas mais aplicadas pela indústria para extração desses compostos. No entanto, apresentam limitações tais como o uso de uma grande quantidade de solventes, tempo de extração longo e perda de compostos termolábeis. Sendo assim, os métodos não convencionais como ultrassom, micro-ondas e extração supercrítica, estão sendo estudadas nos últimos tempos com o intuito de se obter procedimentos mais seguros e eficazes (AZMIR et al., 2013).

A eficiência do método de extração pode ser afetada por inúmeros fatores, como temperatura, tipo de solvente, tempo de contato e relação sólido-solvente. Portanto, a escolha da técnica utilizada e os parâmetros empregados devem ser levados em consideração e avaliados intensamente (HERNANDEZ; LOBO; GONZÁLEZ, 2009; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

2.5.1 Extração convencional sólido-líquido utilizando temperatura

Os processos de extração convencionais se baseiam na utilização de um solvente que irá extrair os compostos de interesse de um soluto, podendo ou não estar associado ao uso do calor. A aplicação do calor para extração de compostos bioativos é um fator que afeta, positivamente, a eficiência do processo. Temperaturas elevadas aumentam a solubilidade e as taxas de difusão dos compostos, diminuindo a tensão superficial e viscosidade do solvente,

acelerando a extração (ERDOGAN et al., 2011). Além disso, Maran et al. (2013) relata que os solventes apresentam maior capacidade de penetração na matriz em temperaturas elevadas.

Durante o processo de extração a temperatura influencia na estabilidade dos compostos por meio de degradações químicas e enzimáticas e pela volatilização dos compostos, que podem ter seu conteúdo diminuído por atuação do aumento da temperatura (DORTA; LOBO; GONZALEZ, 2012). No entanto, em estudo realizado por Cruz (2013), os autores observaram que embora a maior parte desses compostos bioativos sejam termolábeis, não houve perda de compostos em temperaturas entre 50-60°C.

Diversos estudos mostram que a aplicação do calor na extração de compostos bioativos melhorou a eficiência da extração e aumentou assim, o potencial antioxidante dos extratos fenólicos. Guglielmetti et al. (2019) estudou a extração de compostos bioativos nos subprodutos prata e casca de café, a extração ocorreu em meio aquoso com temperatura de 100°C por 10 minutos. Os autores encontraram nos extratos valores de fenólicos totais de 81,03 mg CAE/g (na prata) e 19,67 mg CAE/g (na casca).

Castaldo et al. (2020) estudou a extração de compostos bioativos no subproduto prata de café e encontrou valores de cafeína de 31,2 mg/g em extrato obtido em meio aquoso a uma temperatura de 80°C por 30 minutos. Valores de fenólicos totais (17,44 mg GAE/g) também foram encontrados em borra de café, obtido em extrato aquosos com temperatura de 80°C por 10 minutos (BRAVO et al., 2013).

2.5.2 Extração assistida por ultrassom

A extração de compostos bioativos utilizando ultrassom se baseia na aplicação de ondas mecânicas, que possuem uma frequência maior do que 20 KHz, superior a frequência da capacidade auditiva humana. As ondas ultrassônicas atuam rompendo a parede celular da matriz vegetal facilitando assim, a penetração da solução extratora e consequentemente, o contato do soluto-solvente liberando os compostos de interesse (ARRUDA et al., 2019).

Conforme Chemat et al. (2017), a extração assistida por ultrassom pode ser realizada por principalmente dois equipamentos, a sonda e o banho ultrassônico. O banho ultrassônico é um método indireto, uma vez que as ondas irão ser propagadas através do recipiente da amostra, enquanto que a sonda age diretamente em contato com a amostra.

Esse método de extração oferece vantagens como maior penetração do solvente no material celular, baixo consumo de solvente, menor tempo de extração e alta reprodutibilidade

dos ensaios, além de ser considerada uma tecnologia verde (AZMIR et al., 2013; MEREGALLI et al., 2020).

Estudos demonstraram a eficiência do uso do ultrassom na extração de diversas moléculas como os antioxidantes, pigmentos, lipídios, fitoquímicos e aromas, destinados a aplicações diretas ou indiretas nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (ANDRADE et al., 2012; AL-DHABI; PONMURUGAN; MARAN, 2017; BARROS et al., 2019; NZEKOUE et al., 2020).

Al-Dhabi et al. (2017) estudaram a obtenção de compostos fenólicos totais no subproduto borra de café utilizando extração assistida por ultrassom, durante 34 minutos em temperatura de 40°C, operando com potência de 244 W e encontraram valores de 33,84 mg GAE/g.

Da mesma forma, em estudo realizado por Andrade et al. (2012) para obtenção de compostos bioativos e avaliação da atividade antioxidante de extratos da casca de café utilizando extração assistida por ultrassom, com frequência de 55 kHz e potência 220 V, por 120 min em temperatura ambiente, operando, foi encontrado valores de fenólicos totais de 133,4 mg CAE/g e um percentual de inibição frente ao radical DPPH de 91,5 %.

Nzekoue et al. (2020) também estudando um subproduto do café, a prata, encontrou valores de fenólicos totais de 73,4 mg GAE/g em extratos obtidos por ultrassom, operando com frequência de 40 kHz , em temperatura de 20°C por 120 minutos. Barros et al. (2019) encontrou valores de fenólicos totais que variaram entre 16-39 mg GAE/g em casca de jabuticaba obtidos utilizando extração assistida por ultrassom a 30°C por 60 minutos, operando com frequência de 40 kHz e 150 W.

2.6 SOLUÇÕES EXTRATORAS DE COMPOSTOS BIOATIVOS

As extrações por solventes são os procedimentos mais utilizados para recuperação de compostos bioativos de matrizes vegetais para o preparo de extratos devido à sua facilidade de uso, eficiência e por apresentar uma ampla aplicabilidade. Diversos solventes são utilizados nesse processo e são escolhidos com base na polaridade do soluto e dos compostos que se deseja extrair, pois diferentes compostos fenólicos, por exemplo, apresentam polaridades diferentes podendo ou não ser solúveis em um determinado solvente (DAI; MUMPER, 2010; ALTEMIMI et al., 2017).

Os solventes polares são os mais utilizados para extração de compostos fenólicos, sendo amplamente aplicadas misturas aquosas, quentes ou frias, contendo etanol, metanol,

acetona ou acetato de etila e tem demonstrado altos rendimentos de extração (SULTANA; ANWAR; ASHRAF, 2009; ANOKWURU et al., 2011). A polaridade, do menos polar para o mais polar, de alguns solventes é: Hexano<Clorofórmio<Acetona<Metanol<Etanol<Água. Dentre esses solventes a água é o que apresenta baixo custo e não apresenta toxicidade (ALTEMIMI et al. 2017; MAGRO;CASTRO, 2020).

De acordo com Thouri et al. (2017) misturas hidroalcoólicas, como por exemplo, etanol e água são mais eficientes no processo de recuperação dos compostos fenólicos, pois apresentam uma melhor eficiência no processo de solvatação, como resultado da interação (pontes de hidrogênio) entre os sítios polares dos compostos antioxidantes e o solvente.

Entretanto, não existe um único solvente que seja capaz de extrair todas as classes de compostos fenólicos de uma matriz simultaneamente, devido a diversos fatores, que envolve a natureza do composto e se o mesmo é um ácido fenólico, flavonoides ou taninos. Outro fator seria a interação do composto antioxidante com as moléculas de carboidratos e proteínas presentes. Sendo assim, existem solventes que extraem melhor um tipo específico de composto do que outro (BIESAGA, 2011; MOKRANI; MADANI, 2016).

Vale salientar que o uso de solventes orgânicos para produção de alimentos é regulamentado. O metanol, por exemplo, não é considerado seguro para aplicação em alimentos, apesar de ser um dos mais utilizados para obter extratos fenólicos. O etanol é classificado pela American Food and Drug Administration (FDA), como solvente seguro para aplicação em alimentos (GONZÁLEZ-MONTELONGO; LOBO; GONZÁLEZ, 2010; CHEMAT; VIAN; CRAVOTO, 2012).

Na literatura há uma grande quantidade de estudos que utilizaram diversas soluções para extração de compostos fenólicos do café (Tabela 3).

Nezekoue et al.(2020), em estudo sobre quantificação de compostos bioativos em extratos do subproduto prata de café obtidos com diferentes solventes de extração (metanol, água, metanol: água 50:50 e etanol: água 70:30) observou que o extrato obtido com a mistura dos solventes etanol: água 70:30 apresentou o melhor resultados em relação ao teor de compostos fenólicos totais. Entretanto, para o teor de flavonoides totais, a água foi o solvente que apresentou melhor resultado. Castaldo et al. (2018), em seu trabalho com casca de café, obteve um extrato utilizando metanol: água (80:20 v/v) que se mostrou eficiente na extração de compostos antioxidantes.

Tabela 3 – Soluções extratoras utilizadas na recuperação de compostos bioativos dos subprodutos do café

Matéria-prima	Solução extratora	Parâmetros de extração	Composto bioativo extraído	Referência
Prata de café	Etanol: água (70:30, v/v)	Método: Ultrassom (40 kHz) Temperatura: 20 °C Tempo: 2 horas	Cafeína (35879.16 $\mu\text{g g}^{-1}$) Ácido cafeico (212,38 $\mu\text{g g}^{-1}$) Ácido ferúlico (226,23 $\mu\text{g g}^{-1}$) Ácido gálico (15,76 $\mu\text{g g}^{-1}$)	Nzekoue et al. (2020)
	Metanol: água (50:50, v/v)		Cafeína (25176,74 $\mu\text{g g}^{-1}$) Ácido cafeico (112,65 $\mu\text{g g}^{-1}$) Ácido ferúlico (104,64 $\mu\text{g g}^{-1}$) Ácido gálico (31,07 $\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Água		Cafeína (19599.04 $\mu\text{g g}^{-1}$) Ácido cafeico (79,00 $\mu\text{g g}^{-1}$) Ácido ferúlico (66,52 $\mu\text{g g}^{-1}$) Ácido gálico (24, 36 $\mu\text{g g}^{-1}$)	
Polpa de café	Acetona: água (80:20, v/v)	Método: Shaker Temperatura: 40°C Tempo: 30 min	Ácido clorogênico (516,83 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	García e Bianchi (2015)
	Isopropanol: água (60:40, v/v)	Método: Sólido-líquido utilizando Soxhlet Temperatura: 121°C Tempo: 20 min	Ácido clorogênico (10.7 %)	Murthy e Naidu, 2012

Casca de café	Metanol: água (80:20, v/v)	Método: Vórtex seguido de banho ultrassônico e agitador Tempo: 2 min/10 min/20 min	Cafeína: (1327.39 mg/kg) Ácido cafeico (6.12 mg/kg) Ácido ferúlico (10.24 mg/kg) Ácido gálico (3.22 mg/kg) Catequina (1,55 mg/kg)	Castaldo et al. (2018)
	Água	Método: Agitação a 250 rpm Temperatura: 100 °C Tempo: 10 min	Cafeína: 13,9 (mg/g)	I Iriondo-DeHond et al. (2019a)
	Isopropanol: água (60:40, v/v)	Método: Sólido-líquido utilizando Soxhlet Temperatura: 121°C Tempo: 20 min	Ácido clorogênico (12.59 %)	Murthy e Naidu, 2012
	Etanol	Método: Ultrassom (55 kHz-220 V) Temperatura: Ambiente Tempo: 2 horas	Ácido vanílico (75.7 µg/g)	Andrade et al. (2012)
		Método: Soxhlet Tempo: 6 horas	Ácido tânico (80,3 µg/g)	
		Método: Supercrítico (300 bar/333,15k) Tempo: 4 horas e 30 min	Ácido clorogênico (942,8 µg/g)	

Sendo assim, de acordo com Magro; Castro (2020), uma comparação entre solventes é de extrema importância para se determinar a melhor solução extratora de compostos antioxidantes em estudo. Entretanto, deve-se levar em consideração a aplicação posterior do extrato.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

As cascas de café utilizadas neste trabalho foram fornecidas pela Fazenda Yaguara Ecológica que possui produção de café orgânico 100% arábica e typica, localizada na cidade de Taquaritinga do Norte, PE, Brasil (Latitude: -7.88809, 36° 5' 33" Oeste). A matéria-prima foi utilizada tanto na forma in natura como também foi utilizada após passar por um processo de secagem em estufa com circulação de ar forçada a 40 °C por 48 horas e em seguida moída em moinho de bolas (Solab, V 3E, São Paulo, Brasil) (Figura 5).



Figura 5- Casca de café in natura e desidratada

Fonte: Próprio autor

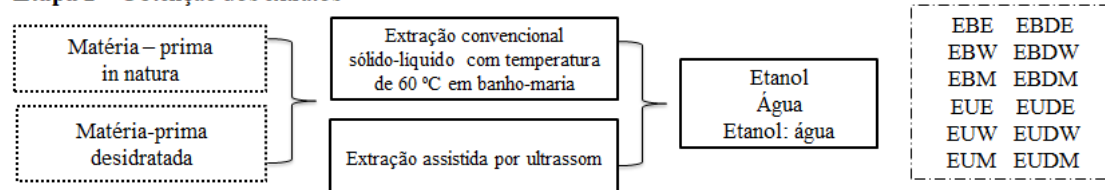
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A pesquisa foi realizada em duas etapas (Figura 6). Na primeira etapa, o estudo de extração dos compostos foi realizado utilizando o método de extração convencional sólido-líquido com temperatura de 60 °C em banho-maria e não convencional, utilizando ultrassom, com três sistemas de solventes (água, etanol e a mistura 1:1), tanto na casca in natura, quanto

na casca desidratada. Na segunda etapa, foi realizada a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e a determinação dos compostos fenólicos dos extratos da casca de café.

Os extratos foram codificados da seguinte forma: EBE- método convencional, casca in natura, etanol; EBW-método convencional, casca in natura, água; EBM-método convencional, casca in natura, etanol:água; EBDE- método convencional, casca desidratada, etanol; EBDW-método convencional, casca desidratada, água; EBDM-método convencional, casca desidratada, etanol: água; EUE- ultrassom, casca in natura, etanol; EUW- ultrassom, casca in natura, água; EUM-ultrassom, casca in natura, etanol: água; EUDE-ultrassom, casca desidratada, etanol; EUDW-ultrassom, casca desidratada, água; EUDM: ultrassom, casca desidratada, etanol: água.

Etapa 1 – Obtenção dos extratos



Etapa 2- Caracterização dos extratos

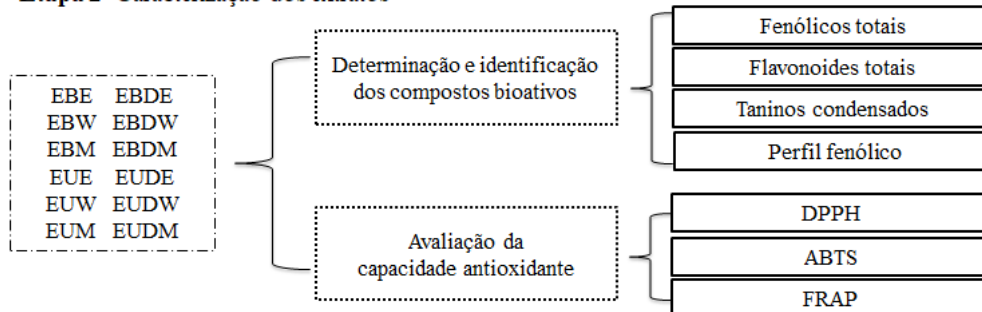


Figura 6 - Delineamento experimental da obtenção e caracterização de extratos da casca do café

3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

3.3.1 Extração convencional sólido-líquido com temperatura de 60 °C em banho-maria

A extração convencional foi realizada seguindo a metodologia de Neto (2019). A matéria-prima (casca in natura ou casca desidratada) foi homogeneizada manualmente por 5 minutos com a solução extratora 1:10 (p:v) e em seguida, foi submetida à incubação em banho maria (Cientec, CT 245-9, São Paulo, Brasil) a 60 °C por 1 h. Logo após, a mistura foi

centrifugada a 3.500 x g por 20 min a 10 °C (Solab, SL 706, São Paulo, Brasil) e os sobrenadantes recolhidos e filtrados em papel de filtro qualitativo (80 g.m⁻²).

3.3.2 Extração assistida por ultrassom

A extração assistida por ultrassom foi realizada seguindo metodologia de Andrade et al. (2012), com adaptações. A extração foi realizada por 1 h com solução extratora de 1:10 (p:v), em temperatura de $\pm 35^{\circ}\text{C}$. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 3.500 x g por 20 min a 10 °C (Solab, SL 706, São Paulo, Brasil) e os sobrenadantes recolhidos e filtrados em papel de filtro qualitativo (80 g.m⁻²). O equipamento usado foi um banho ultrassônico (Marconi, Ultracleaner 1400), operando em frequência de 40 kHz e potência de 220 V.

3.4 DETERMINAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

3.4.1 Compostos fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965), adaptado por Andrade et al. (2012). Alíquotas de 100 μL dos extratos foram homogeneizados com 7.900 μL de água destilada, 500 μL do reagente Folin Ciocalteu e 1.500 μL de carbonato de sódio à 20%. Em seguida, os frascos foram agitados e mantidos em repouso, no escuro, por 2 horas, seguidos de leitura em espectrofotômetro UV-VIS (Quimis, Q798U, São Paulo, Brasil), a 765 nm. Os resultados foram calculados com o auxílio de uma curva padrão de ácido clorogênico (10 à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e o conteúdo de compostos fenólicos totais foi expresso em miligramas de ácido clorogênico equivalente (CAE) por grama de amostra (mg CAE g^{-1}).

3.4.2 Determinação de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado de acordo com o método proposto por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999), com algumas adaptações. Uma alíquota de 100 μL do extrato foi homogeneizado com 150 μL de NaNO_2 5% (m:v), aguardando reagir por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 150 μL de AlCl_3 10% (m:v), aguardando reagir por 6 minutos. Por fim, foi adicionado 1000 μL de NaOH 1M e 1200 μL de água destilada. A absorbância da mistura foi comparada a um branco (solvente) e medido a 510 nm. Uma curva padrão foi construída com catequina (20 - 200 $\mu\text{g/mL}$) e o conteúdo de flavonoides totais foi expresso como miligrama de catequina equivalente por grama de amostra (mg CE/ g^{-1}).

3.4.3 Determinação de taninos condensados

A determinação de taninos condensados foi realizada pelo método de Broadhurst e Jone, (1978). Uma alíquota de 30 μL do extrato foi misturada com 900 μL de vanilina 4% (m:v) preparada com metanol e, em seguida, foi adicionado 450 μL de HCl concentrado. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 20 minutos ao abrigo da luz. Após o período de incubação, a leitura da absorbância foi realizada a 500 nm usando o espectrofotômetro UV/Visível (Quimis, Q798U, São Paulo, Brasil). A curva padrão foi preparada com padrão de catequina (50 - 800 $\mu\text{g/mL}$), e o resultado expresso em miligrama equivalente de catequina por grama de amostra (mg CE/ g).

3.4.4 Perfil de compostos fenólicos

O perfil dos compostos fenólicos dos extratos da casca de café foi determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE), usando uma coluna C18 Shim-pack (com diâmetro interno de 4,6 mm e comprimento de 250 mm). Uma alíquota de 20 μL de cada amostra foi injetada na coluna termostatizada a 40 °C, utilizando a fase móvel composta de acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (15:85, v/v) escoando com vazão de 0,8 mL/min. A determinação quantitativa foi baseada no método de padrão externo por comparação com o tempo de retenção de padrões de compostos fenólicos puros. Para todas as amostras, a concentração final dos compostos será determinada pela média dos resultados de duas injeções consecutivas (ANDRADE et al. 2012).

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO

3.5.1 Atividade sequestradora do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH•)

A capacidade sequestradora do radical DPPH• dos extratos da casca de café foi determinada seguindo a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Uma alíquota de 100 μL do extrato foi adicionada a 3,9 mL do radical DPPH (0,06 mM) em metanol. Após homogeneização, foi realizada a leitura do tempo zero apenas do ensaio branco (radical livre e solvente) e os demais ensaios foram mantidos a 25°C por 60 minutos. Em seguida a atividade de eliminação do radical de acordo com a capacidade antioxidante dos extratos foi verificada a 515 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Quimis, Q798U, São Paulo, Brasil), em triplicata de ensaio. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do

radical DPPH● em relação ao potencial antioxidante das amostras, de acordo com a equação 1.

$$\% \text{ Inibição} = \left[\frac{(ADPPH - A_{extrato})}{ADPPH} \right] \times 100$$

Equação 1. Porcentagem de inibição do radical DPPH●

Onde, ADPPH é a absorbância da solução de DPPH e Aextrato é a absorbância da amostra.

3.5.2 Atividade Sequestradora do Radical 2,2'-azino-bis(3-etilbezotiazolina)-6-ácido sulfônico (ABTS●+)

A capacidade sequestradora do radical ABTS●+ foi determinada seguindo a metodologia proposta por Re et al. (1999). A solução de ABTS●+ foi preparada usando 5 mL de uma solução de 2,2'-Azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-suphonic acid)-diammonium salt] – (ABTS) 7,0 mM e 88 µL de uma solução de persulfato de potássio (K2S2O8) 140 mM. O sistema foi mantido em repouso de 12 a 16 horas a temperatura ambiente e na ausência de luz. Uma vez formado o radical ABTS●+, o mesmo foi diluído em etanol para o ajuste da absorbância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm. Em seguida, uma alíquota de 30 µL da amostra foi adicionada à 3000 µL do radical ABTS●+. Após 6 minutos de incubação à temperatura ambiente e no escuro, a absorbância foi medida a 734 nm contra um branco (etanol). Em seguida, a atividade de eliminação do radical de acordo com a capacidade antioxidante dos extratos foi verificada a 734 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Quimis, Q798U, São Paulo, Brasil). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical ABTS●+ em relação ao potencial antioxidante das amostras, de acordo com a equação 2.

$$\% \text{ de Inibição} = \left[\frac{(Abs. ABTS - A_{extrato})}{Abs. ABTS} \right] \times 100$$

Equação 2. Porcentagem de inibição do radical ABTS●+

Onde, Abs. ABTS é a absorbância da solução de ABTS●+ e Aextrato é a absorbância da amostra.

3.5.3 Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)

A capacidade de redução férrica foi avaliada utilizando a metodologia FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), conforme descrita por Benzie e Strain (1999). O reagente de FRAP foi preparado por mistura de acetato tampão (300 mmol/L - pH 3,6) a uma solução de 10 mmol / L TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) em HCl a 40 mmol / L e 20 mmol / L de FeCl₃ a 10:1:1 (v:v:v). Uma alíquota de 90 µL do extrato foi adicionada a 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP, seguida de homogeneização e incubação em banho-maria à 37°C por 30 minutos. Posteriormente, de acordo com o potencial antioxidante, a atividade de redução do ferro (Fe³⁺) para a forma ferrosa (Fe²⁺) dos extratos foi verificada a 595 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Quimis, Q798U, São Paulo, Brasil), utilizando-se solvente e reagente FRAP como branco. Com base na curva padrão preparada com diferentes concentrações de Trolox (50-1000 µM), os resultados serão expressos em µmol de equivalente Trolox (TE) por grama de amostra (µmol TE/g).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas análises de influência das variáveis de extração (processo, obtenção da matéria-prima e solução extratora) sobre a atividade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e taninos condensados por análise de variância (ANOVA) usando o software Minitab 16® (Minitab Inc., State College, PA, EUA) com um nível de confiança de 95% (valor $p \leq 0,05$).

REFERÊNCIAS

- ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café). 2019. Disponível em: <<http://abic.com.br/cafe/historia/>>. Acesso em: 29 Outubro 2019.
- AL-DHABI, N.A.; PONMURUGAN, K.; MARAN, P. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 206-213, 2017.
- ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.; BAHARLOUEI, A.; WATSON, D.G.; LIGHTFOOT, D.A. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. **Plants**, v. 6, n.4, p. 42-65, 2017.
- ALVES, R. C.; RODRIGUES, F.; NUNES, M.A.; VINHA, A.F.; OLIVEIRA, M.B.P.P. **State of the art in coffee processing by-products**. In Handbook of coffee processing byproducts: Sustainable applications, p. 1-26, 2017.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, v. 84, p. 551-562, 2004.
- AMEER, K.; SHAHBAZ, H.M.; KWON, J. **Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017 doi: 10.1111/1541-4337.12253
- ANDRADE, K. S.; GONÇALVES, 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.
- ANOKWURU, C.P.; ANYASOR, G.N.; AJIBAYE O.; FAKOYA O.; OKEBUGWU P. Effect of Extraction Solvents on Phenolic, Flavonoid and Antioxidant activities of Three Nigerian Medicinal Plants. **Nature and Science**, v. 9, n.7, p. 53-61, 2011.
- APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; ÇELİK, S.E.; BEKTAŞOĞLU, B.; BERKER, K.I.; ÖZYURT, D. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. **Molecules**, v. 12, p.1496-1547, 2007.
- APAK, R.; GORINSTEIN, S.; BÖHM, V.; SCHAICH, K.M.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). **Pure and applied chemistry**, v. 85, n.5, p. 957-998, 2013.
- ARAÚJO, N.M.P.; PEREIRA, G.A.; ARRUDA, H.S.; PRADO, L.G.; RUIZ, A.L.T.G.; EBERLIN, M.N.; CASTRO, R.J.S.; PASTORE, G.M. Enzymatic treatment improves the antioxidant and antiproliferative activities of *Adenanthera pavonina* L. seeds. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. e101002, 2019.
- ARRUDA, H.S.; SILVA, E.K.; PEREIRA, G.A.; ANGOLINI, C.F.F.; EBERLIN, M.N.; MEIRELES, M.A.A.; PASTORE, G.M. Effects of high-intensity ultrasound process parameters on the phenolic compounds recovery from araticum peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 50, p. 82-95, 2019.

ÁVILA, P.F.; MARTINS, M.; COSTA, F.A.A.; GOLDBECK, R. Xylooligosaccharides production by commercial enzyme mixture from agricultural wastes and their prebiotic and antioxidant potential. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v.24, p. 100234, 2020.

AYSELI, M.T.; KELEBEK, H.; SELLI, S. Elucidation of aroma-active compounds and chlorogenic acids of Turkish coffee brewed from medium and dark roasted *Coffea arabica* beans. **Food Chemistry**, v. 388, p. 127821, 2021.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I.S.M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K.M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M.H.A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N.A.N.; OAR, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BAGUETA, M. R.; SILVA, J.T. da P.; MOREIRA, T.F.M.; CANESIN, E.A.; GONÇALVES, O.H.; SANTOS, A.R.; COQUEIRO, A.; DEMCZUK JUNIOR, B.; LEIMANN, F.V. Extração e caracterização de compostos do resíduo vegetal casca de café. **Brazilian Journal of Food Research**, v.8, n.2, p. 68-89, 2017.

BARROS, H.D.F.Q.; BASEGGIO, A.M.; CÉLIO F.F. ANGOLINI, C.F.F.; PASTORE, G.M.; CAZARIN, C.B.B.; MAROSTICA-JUNIOR, M.R. Influence of different types of acids and pH in the recovery of bioactive compounds in Jabuticaba peel (*Plinia cauliflora*). **Food Research International**, v. 124, p. 16-26, 2019.

BEDOYA, A.; GORDILLO-DELGADO, F.; CRUZ-SANTILLANA, Y.E.; PLAZAS, J.; MARIN, E. Thermal effusivity measurement of conventional and organic coffee oils via photopyroelectric technique. **Food Research International**, v.102, p. 419-424, 2017.

BEKHIT, A. E. A., HOPKINS, D. L., FAHRI, F. T., & PONNAMPALAM, E. N. Oxidative processes in muscle systems and fresh meat: sources, markers, and remedies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.12, p.565-597, 2013.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 15-27, 1999.

BIESAGA, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 18, p. 2505-2512, 2011.

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

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

BROADHURST, R. B.; JONES, W. T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, p. 788-794, 1978.

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

CAO, G.; BOOTH, S.L.; SADOWSKI, J.A.; PRIOR, R.L. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p.1081–1087, 1998.

CASTALDO, L.; GRAZIANI, G.; GASPARI, A.; IZZO, L.; LUZ, C.; MAÑEZ, J.; RUBINO, M.; MECA, G.; RITIENI, A. Study of the Chemical Components, Bioactivity and Antifungal Properties of the Coffee Husk. **Journal of Food Research**, v. 7, n. 4, p.43-54, 2018.

CASTALDO, L.; NARVÁEZ, A.; IZZO, L.; GRAZIANI, G.; RITIENI, A. In Vitro Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Coffee Silverskin Polyphenolic Extract and Characterization of Bioactive Compounds Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. **Molecules**, v. 25, p. e2132, 2020.

CECAFÉ (Conselho do Exportadores de Café). **Relatório Mensal Setembro 2020**. CECAFÉ, 2020, 20p. Disponível em:< www.cecafe.com.br>. Acesso em: 20 de Novembro de 2020.

COLLAZO-BIGLIARD, S.; ORTEGA-TORO, R.; CHIRALT, A. Improving properties of thermoplastic starch films by incorporating active extracts and cellulose fibres isolated from rice or coffee husk. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 22, p. e100383, 2019.

CONSONNI, R.; POLLA, D.; CAGLIANI, L.R. Organic and conventional coffee differentiation by NMR spectroscopy. **Food Control**, v. 94, p. 284-288, 2018.

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

CHEMAT, F.; VIAN, M.A.; CRAVOTTO, G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. **Molecules**, v. 13, p. 8615-8627, 2012.

CHEMAT, F.; FABIANO-TIXIER, A.S.; VIAN, M.A.; ALLAF, T.; VOROBIEV, C. Solvent-free extraction of food and natural products. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 157-168, 2015.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A.; 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.

CLIFFORD, M.N.; JAGANATH, I.B.; LUDWIG, I.A.; CROZIER, A. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. **Natural Product Reports**, v. 34, n.12, p. 1391–1421, 2017.

CRUZ, A.P.G. **Recuperação de moléculas bioativas a partir de coprodutos de produção vitivinícola**. 69f. 2013. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DEBASTIANI, R.; SANTOS, C.E.I.; RAMOS, M.M.; SOUZA, V.S.; AMARAL, L.; DIAS, J.F. Variance of elemental concentrations of organic products: the case of Brazilian coffee. **Nuclear Inst. and Methods in Physics Research B**, v.486, p. 18-21, 2021.

DORTA, E.; LOBO, M.G.; GONZALEZ, M. Reutilization of Mango Byproducts: Study of the Effect of Extraction Solvent and Temperature on Their Antioxidant Properties. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 1, p. 80-88, 2012.

ERDOGAN, S.; ATES, B.; DURMAZ, G.; YILMAZ, I.; SECKIN, T. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from Anatolia propolis and their radical scavenging capacities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p.1592-1597, 2012.

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

FAN, H.; ZHANG, M.; BHANDARI, B.; YANG, C. Food waste as a carbon source in carbon quantum dots technology and their applications in food safety detection. **Trends in Food Science & Technology**, v. 95, p. 86-96, 2020.

FERREIRA, I. C. F. R. & ABREU, R. M. V. – Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Sociedade Portuguesa de Bioanalistas da Saúde**, v. 2 p. 32-39, 2007.

FERREIRA, T.; SHULER, J.; GUIMARÃES, R.; FARAH, A. Coffee: Production, quality and chemistry. In A. Farah (Ed.), Coffee: Production, quality and chemistry. **Royal Society of Chemistry**, p. 3-22, 2019.

GARCÍA, L. R. P.; DEL BIANCHI, L. V. Antioxidant capacity in coffee industry residues. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 307-313, 2015.

GEMECHU, F.G. Embracing nutritional qualities, biological activities and technological properties of coffee byproducts in functional food formulation. **Trends in Food Science & Technology**, v. 104, p. 235-261, 2020.

GONZÁLEZ-MONTELONGO, R.; LOBO, M.G.; GONZÁLEZ, M. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1030-1039, 2010.

GUGLIELMETTI, A.; FERNANDEZ-GOMEZ, B.; ZEPPA, G.; CASTILLO, M.D. Nutritional Quality, Potential Health Promoting Properties and Sensory Perception of an Improved Gluten-Free Bread Formulation Containing Inulin, Rice Protein and Bioactive Compounds Extracted from Coffee Byproduct. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 69, n. 2, p. 157–166, 2019.

GRANATO, D.; SHARIDI, F.; WROLSTAD, R.; KILMARTIN, P.; MELTON, L.D.; HIDALGO, F.J.; Miyashita, K.; CAMP, J.V.; ALASALVAR, C.; ISMAIL, A.B.; ELMORE, S.; BIRCH, G.G.; Charalampopoulos, D.; ASTLEY, S.B.; PEGG, R.; ZHOU, P.; FINGLAS, P. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? **Food Chemistry**, v. 264, p. 471-475, 2018.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G.M.; PLATA-OVIEDO, M.S.V.; PERALTA, R.M. Phenolic compounds in fruits - an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023–2044, 2012.

HEJNA, A. Potential applications of by-products from the coffee industry in polymer technology – Current state and perspectives. **Waste Management**, v. 121, p. 296-30, 2021.

HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, M.G.; GONZÁLEZ, M. Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. **Food Chemistry**, v. 114, p. 734-741, 2009.

HU, G.L.; WANG, X.; ZHANG, L.; QIU, M.H. The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee. **Food Funcional**, v. 10, p. 3113–3126, 2019.

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 and Emerging Technologies**, v. 51, p.194-204, 2019a.

IRIONDO-DEHOND, A.; RIOS, M.B.; HERRERA, T.; RODRIGUEZ-BERTOS, A.; NUÑEZ, F.; ANDRES, M.I.S.; SANCHEZ-FORTUN, S.; CASTILLO, M.D. Coffee Silverskin Extract: Nutritional Value, Safety and Effect on Key Biological Functions. **Nutrients**, v.11, p. e2693, 2019b.

ICO (International Coffee Organization). **Relatório Mensal Outubro 2020**. ICO, 2020, 8p. Disponível em: < <http://www.ico.org/documents/cy2020-21/cmr-1020-e.pdf>>. Acesso em: 10 de Novembro de 2020.

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

KALSCHNE, D.L.; VIEGAS, M.C.; CONTI, A.J.; CORSO, M.P.; BENASSI, M. T. Effect of steam treatment on the profile of bioactive compounds and antioxidant activity of defective roasted coffee (*Coffea canephora*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 364-370, 2019.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328–2375, 2013.

LEÃO, L.L.; OLIVEIRA, F.S.; SOUZA, R.S.; FARIAS, P. K. S.; FONSECA, F. S. A.; MARTINS, E. R.; SOUZA, R. M. Uso de antioxidantes naturais em carnes e seus subprodutos. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 1, p. 94-100, 2017.

MAGRO, A.E.A.; CASTRO, R.J.S. Effects of solid-state fermentation and extraction solvents on the antioxidant properties of lentils. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 28, p. 101753, 2020.

MARAN, J.P.; MANIKANDAN, S.; NIVETHA, C. V.; DINESH, R. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. **Arabian Journal of Chemistry** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.007>

MATOS, L. P.C. de. **Compostos fitoquímicos e atividade antioxidante de casca de café**. 31f. 2014. Trabalho de conclusão de curso. (Tecnologia de Alimentos) – Curso de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná.

MEREGALLI, M.M.; PUTON, B.M.S.; CAMERA, F.D.; AMARAL, A.U.; ZENI, J.; CANSIAN, R.L.; MIGNONI, M.L.; BACKES, G.T. Conventional and ultrasound-assisted methods for extraction of bioactive compounds from red araçá peel (*Psidium cattleianum* Sabine). **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, p. 5800-5809, 2020.

MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. **Separation and Purification Technology**, v. 162, p. 68-76, 2016.

MONTEIRO, M.C.; FARAH, A. Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops. **Food Chemistry**, v. 134, p. 611-614, 2012.

MUNEKATA, P.E.S.; ALCÁNTARA, C.; ŽUGČIĆ, T.; ABDELKEBIR, R.; COLLADO, M.C.; GARCÍA-PÉREZ, J.V.; JAMBRAK, A.R.; GAVAHIAN, M.; BARBA, F.J.; LORENZO, J.M. Impact of ultrasound-assisted extraction and solvent composition on bioactive compounds and in vitro biological activities of thyme and rosemary. **Food Research International**, v. 134, p. e109242, 2020.

MURADOR, D. C.; MESQUITA, L., M., de S. VANNUCHI N.; BRAGA A. R. C.; ROSSO V. V. Bioavailability and biological effects of bioactive compounds extracted with natural deep eutectic solvents and ionic liquids: advantages over conventional organic solvents, **Current Opinion in Food Science**, v. 26, p. 25-34, 2019.

MURTHY, P.S.; NAIDU, M.M. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 897–903, 2012.

NAYAK, B.; LIU, R. H.; TANG, J. Effect of processing on phenolic antioxidants of fruits, vegetables, and grains—A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 7, p. 887–918, 2015.

NETO, D.C. de S. **Desenvolvimento e aplicação de extrato de Spondias mombim L. para manutenção da qualidade de hambúrguer de frango pronto para consumo**. 169f. 2019. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal da Paraíba, Bananeiras, Paraíba.

NGO, T.V.; SCARLETT, C.J.; BOWYER, M.C.; NGO, P.D.; VUONG, Q.V. Impact of Different Extraction Solvents on Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity from the Root of *Salacia chinensis* L. **Journal of Food Quality**. doi.org/10.1155/2017/9305047.

NZEKOU, 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. e109128, 2020.

OLIVEIRA, L.S.; FRANCA, A.S. An overview of the potential uses for coffee husks. Elsevier Inc.; 2015.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

QUATRIN, A.; PAULETTO, R.; MAURER, L.H.; MINUZZI, N.; NICHELLE, S.M.; CARVALHO, J.F.C.; MARÓSTICA JÚNIOR, M.R.; RODRIGUES, E.; BOCHI, V.C.; EMANUELLI, T. Characterization and quantification of tannins, flavanols, anthocyanins and matrix-bound polyphenols from jaboticaba fruit peel: a comparison between *Myrciaria trunciflora* and *M. jaboticaba*. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 78, p.59-74, 2019.

RASHMI, H.B.; NEGI, P.S. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. **Food Research International**, v. 136, p. e109298, 2020.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M., RICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 1, p. 1231-1237, 1999.

REBOLLO-HERNANZ, M.; ZHANG, Q.; AGUILERA, Y.; MARTÍN-CABREJAS, M.A.; MEJIA, E.G. Phenolic compounds from coffee by-products modulate adipogenesis-related inflammation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance in adipocytes, via insulin/PI3K/AKT signaling pathways. **Food and Chemical Toxicology**, v. 132, p. e110672, 2019.

RECHARLA, N.; RIAZ, M.; KO, S.; PARK, S. Novel Technologies to enhance solubility of food-derived bioactive compounds: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 39, p. 63-73, 2017.

ROJAS, J.; BUITRAGO, A. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Biosynthesized by Plants and Its Relationship With Prevention of Neurodegenerative Diseases. In: Maira Rubi Segura Campos. (Org.). **Bioactive Compounds** Health Benefits and Potential Applications. 1ed. Duxford: Elsevier, 2018, v. 1, p. 3-31.

SETTER, C.; SILVA, F.T.M.; ASSIS, M.R.; ATAÍDE, C.H.; TRUGILLO, P.F.; OLIVEIRA, T.J.P. Slow pyrolysis of coffee husk briquettes: Characterization of the solid and liquid fractions. **Fuel**, v.261, p.116- 127, 2020.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144– 158, 1965.

SOUSA, J. R. de M. **Extração de compostos fenólicos da casca do café por diferentes métodos**. 2018. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Engenharia de Alimentos)- Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas.

SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. **UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde**, v. 14, n.4, p. 263-269, 2012.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; ASHRAF, M. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. **Molecules**, v.14, p.2167-2180, 2009.

SHAHIDI, F.; YEO, J. D. Insoluble-bound phenolics in food. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1216, 2016.

SHARIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of functional foods**, v.18, p.757–781, 2015.

THOURI, A.; CHAHDOURA, H.; EL AREM, A.; HICHRI, A.O.; RIHAB, R.B.; ACHOUR, L. Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var. Korkobbi and Arechti). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, p. 248-258, 2017.

VARDANEGA, R.; SANTOS, D.T.; MEIRELES, M.A. Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. **Pharmacognosy reviews**. v. 8, n. 16, p. 88-95, 2014.

VUOLO, M.M.; LIMA, V.S.; MARÓSTICA-JÚNIOR, M.R. Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. In: Maira Rubi Segura Campos. (Org.). **Bioactive Compounds** Health Benefits and Potential Applications. 1ed. Duxford: Elsevier, 2018, v. 1, p. 33-52

WIJNGAARD, H.; HOSSAIN, M.B.; RAI, D.K.; BRUNTON, N. Techniques to extract bioactive compounds from food byproducts of plant origin. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 505–513, 2012.

ZAPATA, F. J.; REBOLLO-HERNANZ, M.; NOVAKOFSKI, J.E.; NAKAMURA, M.T.; MEJIA, E.G. Caffeine, but not other phytochemicals, in mate tea (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) attenuates high-fat-high-sucrose-diet-driven lipogenesis and body fat accumulation. **Journal of Functional Foods**, v. 64, p. 103646, 2020.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n.4, p. 555–559, 1999.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO

Obtaining bioactive compounds from the coffee husk (*Coffea arabica* L.) using different extraction methods

Artigo pulicado

(Molecules, fator de impacto: 3.26)

Article

Obtaining Bioactive Compounds from the Coffee Husk (*Coffea arabica* L.) Using Different Extraction Methods

Mariana de Oliveira Silva , John Nonvignon Bossis Honfoga, Lorena Lucena de Medeiros, Marta Suelly Madruga  and Taliana Kênia Alencar Bezerra * 

Technology Centre, Department of Food Engineering, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil; marianaoliveira.ufpb@gmail.com (M.d.O.S.); jnbossis91@hotmail.com (J.N.B.H.); lozenalucena@live.com (L.L.d.M.); msmadruga@uol.com.br (M.S.M.)

* Correspondence: taliana.kenia@hotmail.com; Tel.: +55-83-3216-7269; Fax: +55-83-32167269

Abstract: Coffee husks (*Coffea arabica* L.) are characterized by exhibiting secondary metabolites such as phenolic compounds, which can be used as raw material for obtaining bioactive compounds of interest in food. The objective of this study is to evaluate different methods for obtaining the raw material and extracting solutions of bioactive compounds from coffee husks. Water bath and ultrasound-assisted extraction methods were used, using water (100%) or ethanol (100%) or a mixture of both (1:1) as extracting solutions and the form of the raw material was in natura and dehydrated. The extracts were evaluated by their antioxidant potential using DPPH radicals, ABTS, and iron reduction (ferric reducing antioxidant power (FRAP)), and later total phenolic compounds, total flavonoids, and condensed tannins were quantified the phenolic majority compounds were identified. It was verified that the mixture of water and ethanol (1:1) showed better extraction capacity of the compounds with antioxidant activity and that both conventional (water bath) or unconventional (ultrasound) methods showed satisfactory results. Finally, a satisfactory amount of bioactive compounds was observed in evaluating the chemical composition (total phenolic compounds, total flavonoids, condensed tannins, as well as the analysis of the phenolic profile) of these extracts. Corroborating with the results of the antioxidant activities, the best extracting solution was generally the water and ethanol mixture (1:1) using a dehydrated husk and water bath as the best method, presenting higher levels of the bioactive compounds in question, with an emphasis on chlorogenic acid. Thus, it can be concluded that the use of coffee husk as raw material to obtain extracts of bioactive compounds is promising. Last, the conventional method (water bath) and the water and ethanol mixture (1:1) stood out among the methods and extracting solutions used for the dehydrated coffee husk.

Keywords: phenolic compounds; antioxidant capacity; plant extract; coffee husk; conventional extraction; ultrasound-assisted extraction



Citation: Silva, M.d.O.; Honfoga, J.N.B.; Medeiros, L.L.d.; Madruga, M.S.; Bezerra, T.K.A. Obtaining Bioactive Compounds from the Coffee Husk (*Coffea arabica* L.) Using Different Extraction Methods. *Molecules* **2021**, *26*, 46. <https://dx.doi.org/10.3390/molecules26010046>

Academic Editor: Krystian Marszałek
Received: 23 November 2020
Accepted: 1 December 2020
Published: 24 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Brazil is considered the world's largest producer and exporter of coffee, and is also the second largest consumer of the product. The country accounts for 30% of the international market, producing a total of approximately 20 million bags, with 46.25% for domestic consumption [1–3].

Coffee processing can be done by dry or wet routes, generating different types of residues [4]. According to Setter et al. [5], the most used method in Brazil is dry processing, with the main residue generated being the husk obtained with a yield of approximately 50% of the weight of the coffee beans. Coffee husks are characterized by secondary metabolites, such as caffeine and tannins, and phenolic acids such as chlorogenic acid, thereby being a potential source for obtaining bioactive compounds of interest to apply in food. Chlorogenic acid is widely distributed in the plant kingdom, and coffee and its by-products are considered its greatest source. The biological function of this phenolic compound is linked to its antioxidant, antimicrobial, and anticarcinogenic activities [6–8].

Bioactive compounds are widely studied and widely found in plant sources, in particular phenolic compounds, which can have numerous applications in science and the food industry [9]. According to García and Bianchi [10], phenolic compounds constitute one of the main classes of antioxidants from natural sources, being distributed in leaves, seeds, grains, roots, and bark. In addition to the antioxidant activity as technological application, the presence of these compounds has been attributed to benefits in human health by delaying or preventing the appearance of diseases due to the antioxidant action in the organism, as well as anti-inflammatory, antimicrobial, and anti-allergic actions.

The extraction procedure is the most important step for recovering phenolic compounds from vegetables, directly affecting the yield of the bioactive compounds [11,12]. According to Wijngaard et al. [13], different techniques are used to extract these compounds, as determined by conventional and non-conventional methods.

Ultrasound-assisted extraction (UE) is a non-conventional method which consists in applying mechanical waves that aim to intensify the extraction by means of a phenomenon called cavitation. This is an indirect method, where the waves are propagated through the sample container while the probe acts directly on the matrix and solvent [14,15]. However, conventional processes, such as extraction using water bath, are based on the use of solvents that extract the compounds of interest from the solute or matrix, being associated with the use of heat [16].

The recovery of bioactive compounds from different plant matrices, such as jaboticaba peel, grape pomaces, red araçá peel, silver, and coffee grounds, has already been reported in several studies. In this research, different extraction methods were used, such as conventional extraction by maceration and heat application as well as ultrasound-assisted extraction [12,16–19].

In light of the above, the objective of this study was to evaluate different extraction methods—water bath (B) and ultrasound (U)—of bioactive compounds from coffee husks (*Coffea arabica* L.) in natura and after dehydration (D) using different extracting solutions—ethanol E, water (W), and mixture ethanol: water (M)—and evaluating the antioxidant activity of the extracts.

2. Results and Discussion

2.1. Effects and Interactions of Extraction Variables on the Antioxidant Activity of Coffee Husk Extracts (*Coffea arabica* L.)

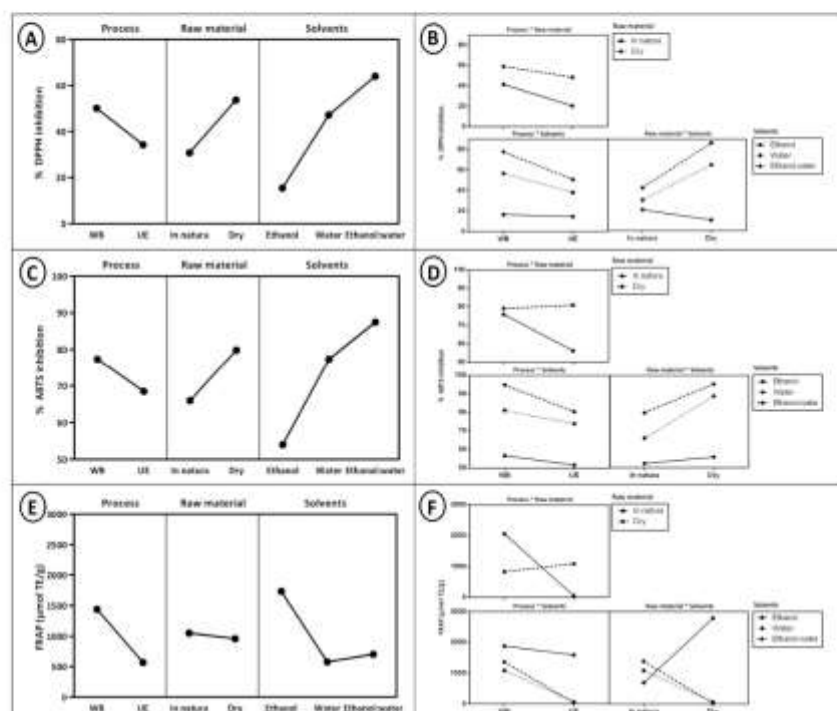
Table 1 presents the mean values referring to the antioxidant activity (DPPH, ABTS, and ferric reducing antioxidant power (FRAP)) of the extracts, and Figure 1 shows the effects of the extraction variables on the study responses. The extracts were obtained from conventional (water bath) and non-conventional (ultrasound-assisted) extraction methods of the coffee husk using different extraction systems—water (100%), ethanol (100%), or its mixture (1:1)—as an extraction solution. Thus, the entire study was performed on both in natura and dehydrated husks.

The extraction methods were called processes, with the solvent extraction solutions and the way to obtain the coffee husk as raw material. The interaction between process and raw material ($p = 0.0001$), process and solvent ($p < 0.0001$), and raw material and solvent ($p < 0.0001$) had a significant effect on the antioxidant activity measured by the DPPH method. The extraction in water bath, the use of dehydrated husk, and the water and ethanol mixture (1:1) presented higher efficiency, and consequently obtained extracts with a high inhibition percentage of DPPH (84.95%), as shown in Figure 1A,B.

Table 1. Results of antioxidant activity of coffee husk extracts.

Extraction Method	Extract	%DPPH Inhibition	%ABTS Inhibition	FRAP ($\mu\text{mol TE/g}$)
Water bath	EBE	14.17 ± 0.04	52.56 ± 0.09	1291.85 ± 0.02
	EBW	37.52 ± 0.1	76.05 ± 0.6	2103.9 ± 0.8
	EBM	67.52 ± 0.1	91.48 ± 0.1	2639.4 ± 0.02
	EBDE	15.86 ± 0.3	56.09 ± 0.8	2425.9 ± 0.1
	EBDW	72.50 ± 0.1	81.63 ± 0.01	58.73 ± 0.02
	EBDM	84.95 ± 0.02	92.81 ± 0.01	23.38 ± 0.1
Ultrasound	EUE	23.16 ± 0.01	48.75 ± 0.4	30.01 ± 0.9
	EUW	19.55 ± 0.01	51.97 ± 0.3	51.01 ± 0.6
	EUM	13.24 ± 0.2	64.03 ± 0.3	64.11 ± 0.02
	EUDE	2.44 ± 0.1	51.24 ± 0.7	3136.4 ± 0.1
	EUDW	53.71 ± 0.02	93.24 ± 0.01	89.75 ± 0.02
	EUDM	84.20 ± 0.03	97.21 ± 0.01	27.62 ± 0.9

TE: Trolox equivalents.

**Figure 1.** (A) Effects of extraction variables for DPPH; (B) Effects of interaction between extraction variables for DPPH; (C) Effects of extraction variables for ABTS; (D) Effects of interaction between extraction variables for ABTS; (E) Effects of extraction variables for ferric reducing antioxidant power (FRAP); (F) Effects of interaction between extraction variables for FRAP.

According to Thouri et al. [20], the polarity of the solvent used for extraction has a great influence on the level of polyphenols extracted. The optimal extraction of the polyphenols is obtained in polar solvents because they present better efficiency in the

solvation process as a result of the interaction (hydrogen bridges) between the polar sites of the antioxidant compounds and the solvent.

Therefore, polar solvent mixtures are used for recovering phenolic compounds. Water is a highly polar solvent, while ethanol has less polarity; however, both solvents can be mixed, forming a more efficient combination to extract antioxidant compounds [21]. It is also observed that dehydrating the sample provided greater concentration of bioactive compounds in the extracts and thus intensified the antioxidant action. Pereira et al. [22] report that the rupture of the raw material structure during the dehydration and drying process promotes a release of more phenolic compounds.

The values found in this test were superior (260 times) to those found by García and Bianchi [10], who presented 23.1% in acetic extract of the dehydrated husk of robusta coffee. Variations in antioxidant activity values found in the literature may be associated to the variety of the raw material, solvents, and extraction methods used [23].

The interactions between process and raw material ($p < 0.0001$), process and solvent ($p = 0.03$), and raw material and solvent ($p < 0.0001$) presented significant effects in evaluating the antioxidant action against the ABTS radical (Figure 1C,D). In the same way as the DPPH radical, the water bath extraction, the use of the dehydrated husk, and the action of the water and ethanol mixture (1:1) showed prominence for extracting bioactive compounds which provide antioxidant action against this radical (92.81%).

However, water (100%) is also highlighted for the ABTS in addition to the water and ethanol mixture as an extracting solution. The literature reports that the use of organic solvents such as ethanol mixed with water favors creating a polar environment, facilitating the extraction of polyphenols from coffee husks. However, the use of water as the only extraction solvent provides the extract with impurities such as organic acids and sugars, which can interfere with phenolic quantification [24,25].

Andrade et al. [6] studied the extraction of bioactive compounds from coffee residues (spent coffee grounds and coffee husks) using the ultrasound method and ethanol as an extracting solution. These authors found lower values than in this work of 13.3% for the husk and 10.6% for lees, which can be justified by the use of a different extracting solution (ethanol).

According to Figure 1E,F, it is possible to observe different behavior of the extracts with respect to FRAP. The highest antioxidant activity for the DPPH and ABTS methods was measured by the dehydrated coffee husk together with a water and ethanol mixture (1:1). The highest antioxidant activity for the FRAP method was found in the extract which used the coffee husk in natura and ethanol as solvent (100%). The interaction between process and raw material ($p < 0.000$), process and solvent ($p < 0.000$), and raw material and solvent ($p < 0.000$) had a significant effect on the antioxidant activity measured for this method. The extracts with the highest capacity to reduce the iron ion for conventional water bath extraction were those that used the in natura husk with the ethanol:water (1:1) (2639.4 $\mu\text{mol TE/g}$) and ethanol (100%) (1291.85 $\mu\text{mol TE/g}$) extract solutions. However, the extract which used ethanol extract solution (100%) but with the dehydrated husk also showed satisfactory values (2425.9 $\mu\text{mol TE/g}$). Moreover, the extract with the highest capacity to reduce the iron ion in the ultrasound-assisted extraction was the extract obtained with the ethanol extract solution (100%) using the dehydrated coffee (3136.4 $\mu\text{mol TE/g}$).

Measuring FRAP antioxidant activity consists of the capacity of the antioxidant compounds to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} , with this reaction being performed in an interval of 30 min [26]. According to Barros et al. [12], this difference in behavior between the methods can be explained by the fact that few phenolic compounds, such as quercetin, cannot reduce Fe^{3+} within 30 min, thus it does not enable its measurement within this interval, requiring a greater reaction time than 30 min for its total quantification, in addition to the fact that the reduction of iron may occur more quickly or does not depend on the type of solvent. Therefore, these two factors may explain why ethanol presented higher antioxidant activity than the other solvents.

Muñoz et al. [27] evaluated the antioxidant capacity of green and roasted coffee by FRAP analysis and found values of 21.04 $\mu\text{mol TE/g}$ and 23.25 $\mu\text{mol TE/g}$, respectively. Barros et al. [12] found a value of 722 $\mu\text{mol TE/g}$ in jaboticaba bark extract, where the extraction of bioactive compounds was also performed with ultrasound and the mixture of solvents water and ethanol as an extraction solution.

Therefore, it can generally be seen that the mixture of ethanol and water solvents proved to be the most efficient solvent for extracting phenolic compounds from the coffee husks in this study. According to Mokrani and Madane [24], the solubility of these compounds mainly depends on the polarity of the solvent chosen to extract them, its polymerization degree, the interaction with other food components, and the formation of insoluble complexes.

In addition to the use of the mixture, differences between the two extraction methods were also observed. The extracts that were obtained through conventional water bath extraction showed higher antioxidant activity compared to those by ultrasound-assisted extraction. However, extracts obtained by ultrasound also presented satisfactory values in the ABTS and FRAP analyses. According to Meregalli et al. [16], the use of conventional water bath extraction is a more advantageous process compared to ultrasound-assisted extraction, as the equipment is of high value. Therefore, it can be observed that the conventional extraction used in this study could better obtain extracts which were rich in bioactive compounds with high antioxidant activity from the coffee husks; thus, presenting an alternative use for the coffee husk, minimizing the amount of agro-industrial residue generated by the coffee industry and adding value to it.

Another relevant factor was the influence of the moisture content of the raw material, i.e., the use of the husk in natura ($82.74\% \pm 0.60$) or dehydrated ($10.49\% \pm 0.13$). It is verified that the most satisfactory results were presented by the extracts which used the dehydrated raw material. The drying process made the compounds present in the coffee husk more concentrated when the water content was removed. However, Stepien et al. [28] report that ideal conditions are needed in the drying process so that there are no adverse changes in the chemical composition of the raw material and that its bioactive properties are preserved.

2.2. Determination of Bioactive Compounds

Table 2 shows the average values of total phenolic, total flavonoid, and condensed tannin content of coffee husk extracts, and Figure 2 shows the effects of extraction variables on the responses.

Table 2. Total phenolic content, total flavonoids, and condensed tannins extracted from coffee husk.

Extraction Method	Extract	Total Phenolic (mg CAE/g)	Total Flavonoid (mg CE/g)	Condensed Tannins (mg CE/g)
Water bath	EBE	31.35 $\pm$ 1.90	0.79 $\pm$ 0.12	13.50 $\pm$ 1.8
	EBW	42.51 $\pm$ 0.72	0.63 $\pm$ 0.07	17.43 $\pm$ 0.7
	EBM	95.00 $\pm$ 1.39	2.81 $\pm$ 0.12	37.07 $\pm$ 1.09
	EBDE	45.20 $\pm$ 1.90	4.1 $\pm$ 0.5	15.12 $\pm$ 0.8
	EBDW	47.57 $\pm$ 0.44	9.93 $\pm$ 0.9	35.92 $\pm$ 0.4
	EBDM	97.89 $\pm$ 0.72	4.53 $\pm$ 1	79.71 $\pm$ 0.8
Ultrasound	EUE	16.54 $\pm$ 2.18	0.75 $\pm$ 0.42	12.73 $\pm$ 0.1
	EUW	34.10 $\pm$ 3.78	0.21 $\pm$ 0.16	17.04 $\pm$ 4
	EUM	77.57 $\pm$ 0.44	2.00 $\pm$ 0.19	23.75 $\pm$ 8
	EUDE	26.74 $\pm$ 2.99	5.16 $\pm$ 0.3	13.21 $\pm$ 0.4
	EUDW	36.16 $\pm$ 3.26	4.61 $\pm$ 0.2	32.04 $\pm$ 1.30
	EUDM	90.95 $\pm$ 1.73	15.69 $\pm$ 0.3	72.53 $\pm$ 1.01

CAE: Chlorogenic acid equivalente; CE: Catechin equivalente.

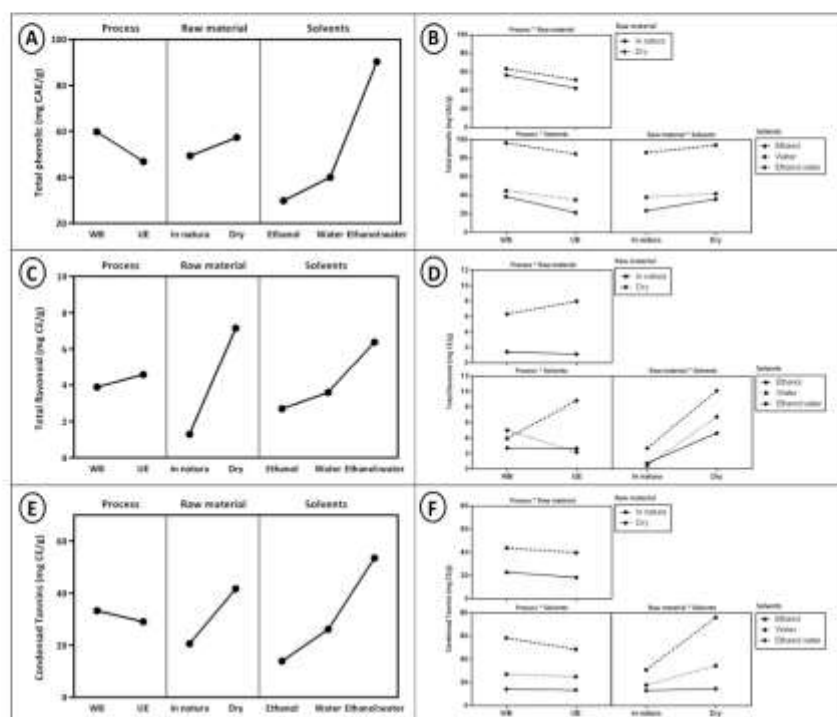


Figure 2. (A) Effects of extraction variables for total phenolic. (B) Effects of interaction between extraction variables for total phenolic. (C) Effects of extraction variables for flavonoids. (D) Effects of interaction between extraction variables for flavonoids. (E) Effects of extraction variables condensed tannins. (F) Effects of interaction between extraction variables for condensed tannins.

According to Figure 2A,B, the statistical analysis showed that the interaction between process and raw material ($p = 0.001$), process and solvent ($p < 0.000$), and raw material and solvent ($p < 0.000$) had a significant effect on total phenolic content. The extracts obtained by the conventional extraction method (water bath) were highlighted in the phenolic values (31.35–97.89 mg CAE/g). Among these extracts, those which were elaborated with the water and ethanol mixture (1:1) showed a higher value of 97.89 mg CAE/g, as shown in Table 2. However, the extract obtained with ultrasound also showed satisfactory results of 90.95 mg CAE/g using the same extracting solution and both with dehydrated husks. Thus, it can be observed that dehydration was a very important factor to concentrate and provide higher phenolic compound levels, while the extracting solution with higher potential was the water:ethanol mixture (1:1).

The antioxidant properties of the coffee husk are a consequence of the presence of caffeine and chlorogenic acid, with these two being the bioactive compounds found in greater abundance in coffee husks [6]. Chlorogenic acid belongs to the family of esters formed by hydroxynaphthoic acids, caffeic acid together with quinic acid, while caffeine is found in several beverages of economic and cultural importance such as coffee, tea, and soft drinks [29]. Andrade et al. [6] studied coffee residues and found the presence of total phenolic compounds ranging from 16.1 mg CAE/g to 151 mg CAE/g for husk and from 24 mg CAE/g to 587.7 mg CAE/g for spent coffee grounds using different extracting solutions and extraction techniques.

Regarding the total flavonoid analysis, according to Figure 2C,D it can be observed that the statistics indicate that the process ($p = 0.01$), the raw material ($p < 0.000$), and the solvents ($p < 0.000$) had a significant effect. In agreement with the other analyses of the study, the use of the dehydrated husk was more efficient for extracting bioactive compounds from the coffee husk. In relation to the conventional extraction (water bath), the extract obtained with water (100%) and that used the dehydrated coffee husk presented a more expressive result in the flavonoid content (9.93 mg CE/g), followed by the extract obtained with the water and ethanol mixture (1:1) (4.53 mg CE/g). The extract which presented the best result in the ultrasound-assisted extraction used the solvent mixture (15.69 mg CE/g).

The prominence of water as an extracting solution is attributed to the polarity of the solvent and its affinity for extracting this type of phenolic compound. According to Mokrani and Madane [24], there is not a single solvent capable of extracting all classes of phenolic compounds from a sample simultaneously, so there are solvents which extract one type of compound better than another.

Therefore, the evaluation regarding the extracting solutions is very important, because the solubility of the phenolic compounds greatly depends on the chemical nature of the sample and the polarity of the solvent used to extract them, as the quantity of these compounds found in food is directly related to its antioxidant capacity [12]. Saada et al. [30] found total flavonoid values of 2.58 mg CE/g using ethanol (100%) and 2.8 mg CE/g using an ethanol:water mixture (1:1), both by conventional extraction by maceration of the coffee silverskin and coffee ground by-products, respectively.

In evaluating the condensed tannins, according to Figure 2E,F it can be observed that the statistical analysis showed that the process ($p < 0.000$), raw material ($p < 0.000$), and solvents ($p < 0.000$) presented significant effects. Furthermore, the use of dehydrated husk and the water and ethanol mixture (1:1) presented greater efficiency with the water bath extraction (79.71 mg CE/g).

Condensed tannins are formed by chains of catechin, epicatechin, and the esters of gallic acid, which may be associated with potential health benefits [8]. The values found in this study were higher than those highlighted by Saada et al. [30], who found condensed tannin values in coffee silverskin and coffee ground by-products of 3.84 mg CE/g and 0.997 mg CE/g, respectively, using conventional extraction by maceration. Castaldo et al. [31] reports that tannins are mainly found in coffee pulp and husks.

2.3. Profile of Phenolic Compounds

The major phenolic compounds which were found in coffee husk extracts are presented in Table 3, and the results are expressed in $\mu\text{g/g}$. The phenolic compound identified in higher concentration in both extracts was chlorogenic acid, ranging from 16.64 to 337.07 $\mu\text{g/g}$. Gallic and caffeic acids were also identified, however, in lower concentrations. The phenolic compounds which represent the main phenolic amount in coffee beans and which are most discussed in the literature are chlorogenic acids and their metabolites [6,7]. Thus, several studies involving coffee beans and their by-products have identified and quantified phenolic acids such as chlorogenic, gallic, and caffeic acids [23,27,31,32] in these matrices, being in accordance with the compounds identified in this study.

The best way to extract these compounds was by the conventional method (water bath) using the dehydrated husk and ethanol:water solvent mixture (1:1), being in accordance with the results of total phenolic compounds for which the same extract obtained the best result in the recovery of the compounds. However, extracts that used water as a solvent (100%) by both the conventional method and by ultrasound-assisted extraction were also able to recover amounts of chlorogenic, gallic, and caffeic acid.

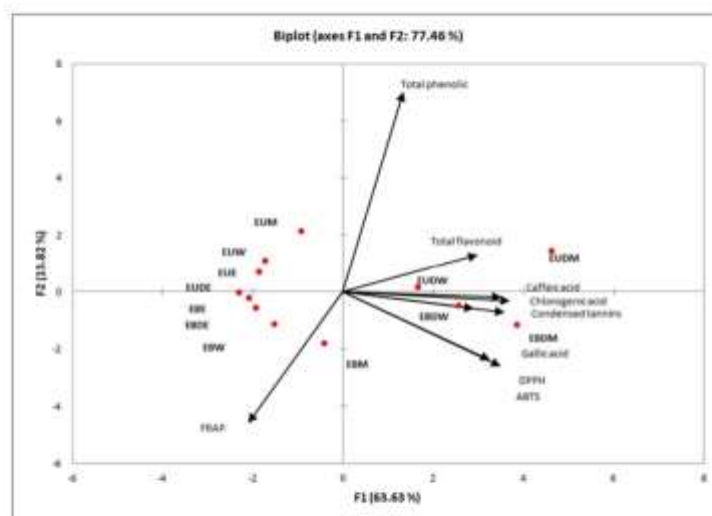
Table 3. Profile of major phenolic compounds from coffee husk extracts.

Extraction Method	Extract	Gallic Acid ($\mu\text{g/g}$) $R_t = 4.67 \text{ min}$	Chlorogenic Acid ($\mu\text{g/g}$) $R_t = 6.03 \text{ min}$	Caffeic Acid ($\mu\text{g/g}$) $R_t = 7.28 \text{ min}$
Water bath	EBE	3.18 ± 0.04	29.35 ± 2.52	1.61 ± 0.35
	EBW	4.45 ± 0.44	19.64 ± 3.30	1.32 ± 0.26
	EBM	2.17 ± 0.07	25.93 ± 0.84	1.40 ± 0.10
	EBDE	Nd	67.49 ± 1.01	1.27 ± 0.01
	EBDW	60.22 ± 1.95	220.89 ± 12.51	2.76 ± 0.49
	EBDM	20.81 ± 4.53	337.07 ± 9.88	6.15 ± 0.60
Ultrasound	EUE	0.72 ± 0.22	24.78 ± 2.86	1.38 ± 0.11
	EUW	1.91 ± 0.15	27.99 ± 0.55	1.23 ± 0.15
	EUM	2.41 ± 0.77	27.64 ± 1.68	1.95 ± 0.34
	EUDE	Nd	37.29 ± 1.35	1.19 ± 0.04
	EUDW	33.15 ± 4.15	178.68 ± 7.56	3.35 ± 0.02
	EUDM	25.52 ± 4.58	304.36 ± 13.01	4.53 ± 1.04

 R_t = retention time (min).

2.4. Principal Component Analysis (PCA)

The analysis of principal components was applied to generally evaluate the behavior of the extraction methods, the extracting solutions, and the dehydration of the coffee husk through the results obtained from the antioxidant activity, total phenolic compounds, total flavonoids, condensed tannins, and the profile of the extracted compounds (Figure 3). The F1 and F2 principal components presented variance of 63.63% and 13.82%, respectively.

**Figure 3.** Principal component analysis (PCA).

According to Figure 3, it is noted that the extracts which presented greater antioxidant action against the DPPH and ABTS radicals were those which used the dehydrated coffee husks, both through the conventional water bath extraction and by ultrasound-assisted using the water and ethanol solvent mixture (1:1) or only water (100%). The total phenolic compounds, total flavonoids, and tannins are observed in the same grouping, as well as the compounds identified in the phenolic profile (chlorogenic, galic, and caffeic acids),

indicating the antioxidant action of these compounds present in the extracts. According to Araújo et al. [21], the antioxidant activity of vegetable raw materials is often related to the presence of bioactive compounds. Andrade et al. [6] evaluated the extraction of phenolic compounds in coffee husks and also identified compounds such as chlorogenic acid, gallic acid, and caffeic acid.

3. Materials and Methods

3.1. Experimental Design

The extraction study of the compounds was carried out using the conventional (water bath) and unconventional (ultrasound) extraction method with three solvent systems (water, ethanol, and the 1:1 mixture), as shown in Figure 4, both in the in natura husk and in the dehydrated husk.

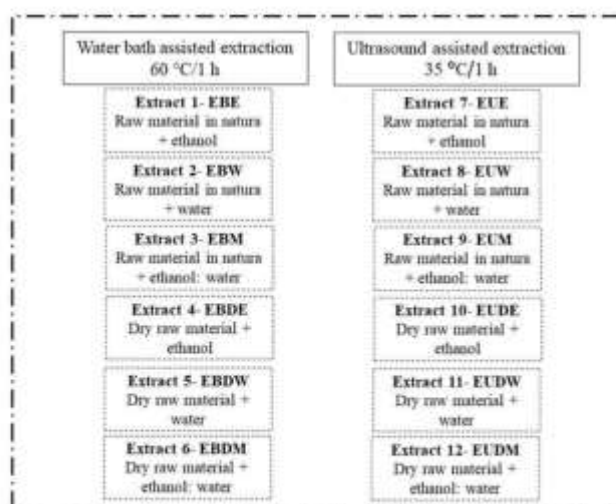


Figure 4. Representative scheme of extraction procedure.

3.2. Husk Dehydration

The coffee husks used in the work were supplied by a company that produces 100% arabica and typica coffee, located in the city of Taquaritinga do Norte, PE, Brazil (Latitude: -7.88809 , $36^{\circ}5'33''$ West). The raw material was used both in its fresh form with a moisture content of $82.74 \pm 0.60\%$ and after going through an oven drying process with forced air circulation at 40°C for 48 h and then ground in a ball mill (Solab, São Paulo, Brazil), presenting a final moisture content of $10.49 \pm 0.13\%$.

3.3. Extraction Procedure

The extraction solution (100% water or 100% ethanol or water + 1:1 ethanol) and the extraction methods applied were selected based on studies in the literature [6,29,33–35]. The extraction in a water bath was performed following the methodology of Neto [35]. The raw material (in natura husk or dehydrated husk) was homogenized manually for 5 min with the extracting solution 1:10 (*p:v*), subjected to incubation in a water bath (Cientec, CT 245-9, São Paulo, Brazil) at 60°C for 1 h. Then, the mixture was centrifuged at $3500 \times g$ for 20 min at 10°C (Solab, SL 706, São Paulo, Brazil), and the supernatants were collected and filtered on qualitative filter paper ($80\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$).

Ultrasound extraction (UE) was performed following the methodology of Andrade et al. [6], with adaptations. The extraction was carried out for 1 h with an extractor solution

of 1:10 (*p:v*) at a temperature of $\pm 35^\circ\text{C}$. Then, the mixture was centrifuged at $3500 \times g$ for 20 min at 10°C (Solab, SL 706, São Paulo, Brazil), and the supernatants were collected and filtered on qualitative filter paper ($80\text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$). The equipment used was an ultrasonic bath (Marconi, São Paulo, Brazil), operating at a frequency of 40 kHz and power of 220 V.

3.4. Antioxidant Activity

3.4.1. Sequestering Activity for the 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl Radical (DPPH•)

The ability of coffee husk extracts to sequester the DPPH• radical was determined according to the method described by Brand-Williams, Cuvelier, and Berset [36]. The radical elimination activity according to the antioxidant capacity of the extracts coffee husk was verified at 515 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Quimis, São Paulo, Brazil) in triplicate. The antioxidant potential of the samples was expressed as the percent inhibition of the DPPH• radical, according to Equation (1).

$$\% \text{Inhibition} = \left[\frac{(ADPPH - A_{\text{extract}})}{ADPPH} \right] \times 100 \quad (1)$$

3.4.2. Sequestering Activity for the 2,2-Azino-bis (3-Ethylthiothiazoline)-6-Sulphonic Acid Radical (ABTS•+)

The ability to sequester the ABTS•+ radical was determined according to the method proposed by Re et al. [37]. The radical elimination activity was verified according to the antioxidant capacity of the coffee husk extracts at 734 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Quimis, São Paulo, Brazil). The antioxidant potential of the samples was expressed as the percentage of inhibition of the ABTS•+ radical, according to Equation (2).

$$\% \text{Inhibition} = \left[\frac{(Abs.ABTS - A_{\text{extract}})}{Abs.ABTS} \right] \times 100 \quad (2)$$

3.4.3. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

The ferric reducing capacity was evaluated using the ferric reducing antioxidant power (FRAP) method described by Benzie and Strain [26]. According to the antioxidant potential, the ability of the coffee husk extracts to reduce iron (Fe^{3+}) to the ferrous form (Fe^{2+}) was verified at 593 nm in a UV-VIS spectrophotometer (Quimis, São Paulo, Brazil). Based on the calibration curve prepared with different concentrations of Trolox (50–1000 μM), the results were expressed as the equivalent of μmol of Trolox/g of sample.

3.4.4. Total Phenolic Content (TPC)

The content of total phenolic compounds was determined to the according Folin-Ciocalteu method proposed by Singleton and Rossi [38], adapted by Andrade et al. [6]. Briefly, the reaction mixture was composed by 0.1 mL of extract, 7.9 mL of distilled water, 0.5 of Folin-Ciocalteu reagent and 1.5 mL of 20% sodium carbonate. The flasks were agitated, held for 2 h and absorbance was measured at 465 nm. TPC was calculated according to a standard curve, prepared with chlorogenic acid and the results were expressed in milligrams of equivalent chlorogenic acid (CAE) per gram of sample (mg CAE/g).

3.4.5. Total Flavonoid Content

The content of total flavonoids was determined to the according method proposed by Zhishem et al. [39] with some adaptations. The reaction system was carried out through 0.15 mL of NaNO_2 , waiting to react for 5 min, followed by the addition of 0.15 mL of AlCl_3 and waiting for the reaction to proceed for 6 min. Finally, 1.0 mL of NaOH and 1.2 mL of distilled water were added. The absorbance readings were performed on a spectrophotometer UV-VIS (Quimis, Q798U, São Paulo, Brazil), at 510 nm. The quantification of total flavonoids in the extracts was performed using a standard curve prepared with catechin and expressed in milligrams equivalent of catechin (CE) per gram of sample (mg CE/g).

3.4.6. Condensed Tannins

The content condensed tannins was determined to the according method proposed by Broadhurst & Jone [40]. Aliquot of 30 μL of the extract was mixed with 900 μL of 4% (*w/v*) vanillin prepared with methanol and then 450 μL of concentrated HCl was added. The mixture was incubated at room temperature for 20 min under light. The absorbance reading was performed at 500 nm using the UV/Visible spectrophotometer (Quimis, Q798U, São Paulo, Brazil). The quantification was performed using a standard curve prepared with catechin and expressed in milligrams equivalent of catechin (CE) per gram of sample (mg CE/g).

3.5. Profile of Phenolic Compounds

The identification and the relative quantification of the phenolic compounds present in the coffee husk extracts were achieved by a liquid chromatography (HPLC) in reverse phase using a C18 column (4.6 mm $\times$ length 250 mm, 5 μ particle size, Varian, Santa Clara, EUA) and UV/VIS detector. An aliquot of 20 μL of each solution was injected into the HPLC column maintained at 40 $^{\circ}\text{C}$ using a mobile phase consisting of acetonitrile/0.1% formic acid (15:85, *v/v*) flowing at a flow rate of 0.8 mL min^{-1} . The quantification was based on external standard method by comparison with the retention time of pure standards of phenolic compounds. For all samples, the final concentration of the compounds was determined by averaging the results of three consecutive injections [6].

3.6. Statistical Analysis

Analysis of the influence of extraction variables (process, obtaining raw material, and extracting solution) on the antioxidant activity and the of content total phenolic compounds and total flavonoids by analysis of variance (ANOVA) using the Minitab 16[®] software (Minitab Inc., State College, PA, USA) with a 95% confidence level (*p*-value ≤ 0.05). Principal component analysis (PCA) was performed using XLSTAT software version 5.03 (Addinsoft, New York, NY, USA, 2014).

4. Conclusions

The use of coffee husk as a raw material for extract obtention is a promising strategy due to the presence of bioactive compounds with antioxidant action. Besides, the use of coffee husks helps to minimize the amount of agro-industrial waste while adding additional value to this specific waste. In this study, the conventional and unconventional methods of extraction were efficient in the process, with the extraction by water bath being better than extraction by ultrasound, which also had the benefit of low cost. The best extracting solution was the water:ethanol (1:1) mixture, showing greater efficiency in the antioxidant compounds recovery from the coffee husk extracts, as well as the use of the dehydrated raw material.

Therefore, future studies on the application of these extracts by the food industry should be carried out, such as the subsequent drying of the extraction. The powder compounds will facilitate the insertion into processed products, such as meat products or packaging, acting as a natural antioxidant able to inhibit lipidic and protein oxidation reactions.

Author Contributions: Conceptualization, M.d.O.S., T.K.A.B. and M.S.M.; methodology, M.d.O.S., J.N.B.H. and L.L.d.M. software, M.d.O.S. and T.K.A.B.; validation, M.d.O.S. and T.K.A.B.; formal analysis, M.d.O.S. and T.K.A.B.; investigation, M.d.O.S., J.N.B.H., M.S.M. and T.K.A.B.; resources, M.S.M. and T.K.A.B.; data curation, M.d.O.S. and T.K.A.B.; writing—original draft preparation, M.d.O.S. and T.K.A.B.; writing—review and editing, M.d.O.S., T.K.A.B. and M.S.M.; visualization, M.d.O.S., T.K.A.B. and M.S.M.; supervision, T.K.A.B. and M.S.M.; project administration, T.K.A.B. and M.S.M.; funding acquisition, M.S.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research was supported by the Research Support Foundation of the State of Paraíba (FAPESQ/CNPq-Project approved in the Program of Support for Centers of Excellence—Edital 006/2018-PRONEX 2018).

Acknowledgments: The authors would like to thank Fazenda Yaguara Ecológica for the partnership and availability of the raw material and the Coordination for Higher Education Personnel Improvement (CAPES) for granting the scholarship. The authors would also like to thank the Research Support Foundation of the State of Paraíba (Fapesq PB) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for financial support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- United States Department of Agriculture (USDA). Foreign Agricultural Service. Coffee Summary. 2015. Available online: <http://apps.fas.usda.gov/> (accessed on 28 December 2019).
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Café. 2016. Available online: <http://www.agricultura.gov.br/> (accessed on 28 February 2016).
- ABIC. Associação Brasileira da Indústria de Café. 2019. Available online: <http://abic.com.br/cafe-com/historia/> (accessed on 29 October 2019).
- Oliveira, L.S.; Franca, A.S. *An Overview of the Potential Uses for Coffee Husks*; Elsevier Inc.: London, UK, 2015. [CrossRef]
- Setter, C.; Silva, F.T.M.; Assis, M.R.; Ataíde, C.H.; Trugilho, P.F.; Oliveira, T.J.P. Slow pyrolysis of coffee husk briquettes: Characterization of the solid and liquid fractions. *Fuel* **2020**, *261*, 116–127. [CrossRef]
- Andrade, K.S.; Goncalves, R.T.; Maraschin, M.; Ribeiro-Do-Valle, R.M.; Martinez, 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* **2012**, *88*, 544–552. [CrossRef] [PubMed]
- Clifford, M.N.; Jaganath, I.B.; Ludwig, I.A.; Crozier, A. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: Discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, *34*, 1391–1421. [CrossRef] [PubMed]
- Gemechu, F.G. Embracing nutritional qualities, biological, activities and technological properties off coffee byproducts in functional foods formulation. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *104*, 235–261. [CrossRef]
- Das, A.K.; Nanda, P.K.; Madane, P.; Biswas, S.; Das, A.; Zhang, W.; Lorenzo, J.M. A comprehensive review on antioxidant dietary fibre enriched meat-based functional foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *99*, 323–336. [CrossRef]
- Garcia, L.R.P.; Del Bianchi, V.L. Antioxidant capacity in coffee industry residues. *Braz. J. Food Technol.* **2015**, *18*, 307–313. [CrossRef]
- Quatrin, A.; Pauletto, R.; Maurer, L.H.; Minuzzi, N.; Nichelle, S.M.; Carvalho, J.F.C.; Maróstica Júnior, M.R.; Rodrigues, V.C.; Bochi, V.C.; Emanuelli, T. Characterization and quantification of tannins, flavonols, anthocyanins and matrix-bound polyphenols from jaboticaba fruit peel: A comparison between *Myrciaria trunciflora* and *M. jaboticaba*. *J. Food Compos. Anal.* **2019**, *78*, 59–74. [CrossRef]
- Barros, H.D.E.Q.; Baseggio, A.M.; Angolini, C.F.F.; Pastore, G.M.; Cazarin, C.B.B.; Maróstica-Junior, M.R. Influence of different types of acids and pH in the recovery of bioactive compounds in Jaboticaba peel (*Plinia cauliflora*). *Food Res. Int.* **2019**, *124*, 16–26. [CrossRef]
- Wijngaard, H.; Hossain, M.B.; Rai, D.K.; Brunton, N. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Res. Int.* **2012**, *46*, 505–513. [CrossRef]
- Chemat, F.; Khan, M.K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* **2011**, *18*, 813–835. [CrossRef]
- Vardanega, R.; Santos, D.T.; De Almeida, M.A. Intensification of bioactive compounds extraction from medicinal plants using ultrasonic irradiation. *Pharmacogn. Rev.* **2014**, *8*, 88–95. [CrossRef] [PubMed]
- Meregalli, M.M.; Puto, B.M.S.; Camera, F.D.M.; Amaral, A.U.; Zeni, J.; Cansin, R.L.; Mignoni, M.L.; Backes, G.T. Conventional and ultrasound-assisted methods for extraction of bioactive compounds from red araçá peel (*Psidium cattleianum* Sabine). *Arab. J. Chem.* **2020**, *13*, 5800–5809. [CrossRef]
- Restuccia, D.; Giorgi, G.; Spizzirri, U.G.; Sciubba, F.; Capuani, G.; Rago, V.; Carullo, G.; Aiello, F. Autochthonous white grape pomaces as bioactive source for functional jams. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2018**, *54*, 1313–1320. [CrossRef]
- Castaldo, L.; Narváez, A.; Izzo, L.; Graziani, G.; Ritieni, A. In Vitro Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Coffee Silverskin Polyphenolic Extract and Characterization of Bioactive Compounds Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Molecules* **2020**, *25*, 2132. [CrossRef] [PubMed]
- Bravo, J.; Monente, C.; Juárez, I.; Peña, M.P.; Cid, C. Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Res. Int.* **2013**, *50*, 610–616. [CrossRef]
- Thouri, A.; Chahdoura, H.; Arem, A.E.; Hliichri, A.O.; Hassin, R.B.; Achour, L. Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var. Korkobbi and Arechti). *Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 248–258. [CrossRef] [PubMed]

21. Araújo, N.M.P.; Pereira, G.A.; Arruda, H.S.; Prado, L.G.; Ruiz, A.L.T.G.; Eberlin, M.N.; De Castro, R.J.S.; Pastore, G.M. Enzymatic treatment improves the antioxidant and antiproliferative activities of *Adenanthera pavonina* L. seeds. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *18*, e101002. [\[CrossRef\]](#)
22. Pereira, G.A.; Arruda, H.S.; Molina, G.; Pastore, G.M. Extraction optimization and profile analysis of oligosaccharides in banana pulp and peel. *J. Food Proc. Preserv.* **2017**, e13408. [\[CrossRef\]](#)
23. Murthy, P.S.; Naidu, M.M. Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food Bioprocess Technol.* **2012**, *5*, 897–903. [\[CrossRef\]](#)
24. Mokrani, A.; Madani, K. Effect of Solvent, Time and Temperature on the Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Peach (*Prunus persica* L.) Fruit. *Sep. Purif. Technol.* **2016**, *162*, 68–76. [\[CrossRef\]](#)
25. Lou, J.C.; Chang, C.K. Completely treating heavy metal laboratory waste liquid by an improved ferrite process. *Sep. Purif. Technol.* **2007**, *57*, 513–518. [\[CrossRef\]](#)
26. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzym.* **1999**, *239*, 15–27. [\[CrossRef\]](#)
27. Muñoz, A.E.; Hernández, S.S.; Tolosa, A.R.; Burillo, S.P.; Olalla Herrera, M. Evaluation of differences in the antioxidant capacity and phenolic compounds of green and roasted coffee and their relationship with sensory properties. *LWT Food Sci. Technol.* **2020**, *128*, e109457. [\[CrossRef\]](#)
28. Stepień, A.E.; Gorzelany, J.; Matlok, N.; Lech, K.; Figiel, A. The effect of drying methods on the energy consumption, bioactive potential and colour of dried leaves of Pink Rock Rose (*Cistus creticus*). *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 2386–2394. [\[CrossRef\]](#)
29. Bagueta, M.R.; Silva, J.T.P.; Moreira, T.F.M.; Canesin, E.A.; Gonçalves, O.H.; Dos Santos, A.R.; Coqueiro, A.; Junior Demczuk, B.; Leimann, F.V. Extração e caracterização de compostos do resíduo vegetal casca de café. *Bras. J. Food Res.* **2017**, *8*, 68–89. [\[CrossRef\]](#)
30. Saada, M.; Kasmi, M.; Ksouri, R. Towards coffee processing by-products valorization: Phenolic compounds and antioxidant activity of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Int. J. Biotech. Trends Technol.* **2019**, *9*, 11–15.
31. Castaldo, L.; Graziani, G.; Gasparini, A.; Izzo, L.; Luz, C.; Manes, J.; Rubino, M.; Meca, G.; Ritieni, A. Study of the Chemical Components, Bioactivity and Antifungal Properties of the Coffee Husk. *J. Food Res.* **2018**, *7*, 43–54. [\[CrossRef\]](#)
32. 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 Res. Int.* **2020**, *133*, 109128. [\[CrossRef\]](#)
33. De Matos, L.P.C. Compostos Fitoquímicos e Atividade Antioxidante de Casca de Café. Trabalho de Conclusão de Curso. Bachelor's Thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Brazil, 2014.
34. Sousa, J.R.M. Extração de Compostos Fenólicos da Casca do Café por Diferentes Métodos. Trabalho de Conclusão de Curso. Bachelor's Thesis, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, Brazil, 2018.
35. Neto, D.C.S. Desenvolvimento e Aplicação de Extrato de *Spondias mombim* L. Para Manutenção da Qualidade de Hambúrguer de Frango Pronto Para Consumo. Ph.D. Thesis, Universidade Federal da Paraíba, Bananeiras, Brazil, 2019.
36. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [\[CrossRef\]](#)
37. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [\[CrossRef\]](#)
38. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
39. Jia, Z.; Tang, M.; Wu, J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* **1999**, *64*, 555–559.
40. Broadhurst, T.R.B.; Jones, W.T. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.* **1978**, *29*, 788–794. [\[CrossRef\]](#)

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos com o presente estudo pode-se constatar que a utilização da casca de café se mostrou eficiente como uma matéria-prima para obtenção de extratos com elevado potencial antioxidante. Além do mais, a utilização da casca de café auxilia minimizando a quantidade de subprodutos agroindustriais gerados pela indústria cafeeira, agregando valor ao produto.

Ambos os métodos de extração, convencional (sólido-líquido com temperatura de 60 °C em banho-maria) e não convencional (ultrassom), apresentaram resultados eficientes para recuperação dos compostos bioativos e consequentemente a obtenção de extratos com elevado potencial antioxidante. No entanto, a extração convencional apresentou maior destaque, sendo este um processo mais vantajoso frente à extração assistida por ultrassom, uma vez que extração convencional apresenta baixo custo. A mistura de solventes água: etanol (1:1) foi a solução extratora mais eficiente na extração dos compostos fenólicos da casca do café, bem como a utilização da matéria-prima desidratada.

Os compostos fenólicos majoritários encontrados em ambos os extratos foram o ácido gálico, cafeico e clorogênico, sendo este último o composto identificado em maior concentração em todos os extratos.

Estudos futuros sobre a aplicação desses extratos pela indústria de alimentos devem ser realizados, como a posterior secagem dos extratos. Os extratos em pó facilitarão a inserção em produtos processados, como produtos cárneos ou embalagens, atuando como um antioxidante natural capaz de inibir reações de oxidação lipídica e proteica. Bem como, novos estudos tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre outras possíveis atividades biológicas dos extratos da casca de café.