



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
2014

**Ricardo Manuel  
da Costa Magalhães**

**Reaproveitamento do resíduo de café por extração de  
compostos de interesse**



**Ricardo Manuel  
da Costa Magalhães**

**Reaproveitamento do resíduo de café por extração de  
compostos de interesse**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo Bioquímica Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado c/ Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Cláudia Pereira Passos, bolsreira de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha família e amigos.

*“The beautiful thing about learning is that nobody can take it away from you”*  
*BB King*

## **O júri**

Presidente

Doutor Rui Miguel Pinheiro Vitorino  
Investigador auxiliar convidado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Orientador

Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva  
Professor associado com agregação do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Arguente

Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues  
Professora Auxiliar com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Agradeço aos meus orientadores Professor Doutor Manuel António Coimbra e Doutora Cláudia Passos por todo o conhecimento transmitido, disponibilidade, paciência e por todos os puxões de orelhas que de uma maneira ou de outra foram-me empurrando para a frente.

Ao Professor Doutor Manuel Vilanova pela disponibilidade do laboratório de imunologia, ICBAS, bem como ao Doutor Pedro Madureira pela ajuda e conhecimentos transmitidos na elaboração do estudo.

Agradeço ao Professor Doutor Fernando Nunes da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro pela colaboração prestada na quantificação de cafeína por HPLC.

Professor Dmitry Evtugin pela ajuda e disponibilidade na cedência do equipamento de SEC e análise dos dados obtidos.

Ao QOPNA e a todos os meus colegas de laboratório pelo acolhimento, boa disposição, união, alegria e discussão sobre futebol.

Obrigado a todos os que caminharam comigo ao longo destes anos e me ajudaram a ser quem sou hoje. Obrigado a todos os amigos que ao longo desta aventura Universitária tive a sorte de conseguir amearhar.

Um muito obrigado aos suspeitos do costume, amigos de longa data que desde sempre me acompanharam de perto e à distância e que sempre souberam as palavras certas a dizer.

Aos meus pais e irmã por serem os meus pilares, por fazerem de mim o que sou hoje e por acreditarem em mim. Esta tese é tanto minha como vossa.

A ti! Sei que ias gostar de me ver a completar esta etapa da minha vida e a partir para a próxima...

## Palavras-chave

Resíduo de café, otimização, óleo de café, polissacarídeos, atividade imunoestimuladora

## Resumo

O resíduo de café é um resíduo excedentário da indústria agroalimentar produzido em larga escala. O seu escoamento nem sempre é feito de forma adequada e raramente é feito de forma sustentada. Este resíduo é rico em compostos de valor acrescentado, e apresenta um elevado potencial bioquímico, sendo passível de ser valorizado.

O resíduo de café é constituído por uma gama de tipos de moléculas passíveis de serem extraídas e que têm um grande potencial ao nível da sua aplicabilidade em vários setores.

Atualmente, ainda não existe nenhum método de extração sequencial eficaz para obtenção de compostos de interesse aplicado à escala industrial com vista à valorização de resíduo de café.

Através deste estudo foi possível verificar que o resíduo de café tem imensas potencialidades, algumas delas ainda muito pouco exploradas, nomeadamente no que diz respeito ao aproveitamento da sua fração lipídica e dos polissacarídeos presentes na matriz do resíduo de café.

A fração lipídica pode ser extraída de forma simples e barata com rendimentos na ordem dos 14% ( $m_{\text{óleo}}/m_{\text{resíduo}}$ ), óleo esse com uma composição em termos de triacilglicerídeos bastante interessante para potencial aplicação na indústria alimentar.

Os polissacarídeos podem ser extraídos de várias formas (extrações alcalinas ou microondas) com diferentes graus de pureza e diferentes rendimentos de extração dependendo do objetivo a nível industrial. A extração utilizando MW foi a que deu origem a um extrato mais puro em termos de polissacarídeos, embora muitas macromoléculas não tenham precipitado.

O material de alto peso molecular foi extraído com rendimentos de 27%, 19% e 52% utilizando KOH, NaOH e extração com micro-ondas respetivamente. A análise imunoestimuladora às frações separadas do sobrenadante da extração utilizando micro-ondas revelou que os seus compostos constituintes não apresentam atividade imunoestimuladora devido ao seu reduzido tamanho.

**keywords**

Spent coffee grounds, optimization, coffee oil, immunostimulatory activity, polysaccharides

**abstract**

Spent coffee grounds are an agro-food industry waste produced on a large scale. The discard of this waste is not always done properly and is rarely done in a sustainable way. This residue is rich in compounds of added value, and has a high biochemical potential, being able to be valued.

Spent coffee grounds consists of a variety of molecules that can be extracted, which have great potential in terms of its applicability in various sectors.

Through this study it was found that the spent coffee grounds have an immense potential, yet poorly explored, in particular as regards the use of his lipid fraction and the polysaccharides in the spent coffee grounds matrix.

The lipid fraction can be easily extracted and inexpensively with yields of approximately 14% ( $m_{oil} / m_{SCG}$ ), and with a composition of triglycerides that is quite interesting considering the coffee oil aplcability in the food industry.

The polysaccharides can be extracted using diferent methods (MW or alkaline extractions) with different degrees of purity and different yields depending on the purpose of extraction at an industrial level.

microwave extraction was the one that originated the most pure sample from all the extractions, polysaccharide wise, althought most macromolecules didn't precipitated.

High molecular weight material was extracted with yelds of 27%, 19% and 52% using KOH, NaOH and microwave extraction.

The immunostimulatory analysis to the supernadant fractions separeted by molecular weight exclusion revealed that it they didn't show any immunostimulatory activity due to their lack of size.





# Índice Geral

<b>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. CARACTERIZAÇÃO DO CAFÉ.....	3
1.2. RESÍDUO DE CAFÉ .....	5
1.2.1. ÓLEO DE CAFÉ.....	5
1.2.1.1. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA .....	7
1.3. POLISSACARÍDEOS .....	10
1.3.1. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS .....	12
1.3.2. PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS POLISSACARÍDEOS DO RESÍDUO DE CAFÉ .....	14
1.3.3. POTENCIAL IMUNOESTIMULADOR DOS POLISSACARÍDEOS DO RESÍDUO DE CAFÉ .	14
1.3.3.1. PROPRIEDADES BIOATIVAS DAS GALACTOMANANAS.....	16
<b>CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
2.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CAFEÍNA DO RESÍDUO DE CAFÉ .....	18
2.3. EXTRAÇÃO DO ÓLEO DO RESÍDUO DE CAFÉ.....	19
2.3.1. QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS DO ÓLEO DO RESÍDUO DE CAFÉ .....	20
2.4. EXTRAÇÕES ALCALINAS DE POLISSACARÍDEOS .....	20
2.4.1. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS .....	22
2.5. EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DO RESÍDUO DE CAFÉ POR MICRO-ONDAS.....	23
2.5. SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DO SNĒTOH SEGUNDO O SEU TAMANHO .....	25
2.6. ANÁLISE DOS AÇÚCARES NEUTROS COMO ACETATOS DE ALDITOL POR GC-FID .	25
2.7. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DOS COMPOSTOS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES F1 E F2.....	27
2.8. DETERMINAÇÃO DA ACETILAÇÃO DE PPĒTOH DO MWB, F1 E F2 .....	27

<b>2.9. ESTUDO DA ATIVIDADE IMUNOESTIMULADORA DAS FRAÇÕES F1 E F2.....</b>	<b>28</b>
<b>2.9.1. DESCONTAMINAÇÃO DO GEL .....</b>	<b>28</b>
<b>2.9.2. DESCONTAMINAÇÃO DA AMOSTRA.....</b>	<b>29</b>
<b>2.9.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS B E T DO BAÇO DO RATINHO.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO III – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1. EXTRAÇÃO DE CAFEÍNA .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.1. QUANTIFICAÇÃO DE CAFEÍNA.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.2. QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES NO EXTRATO E SUA COMPOSIÇÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2. ÓLEO DE CAFÉ.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.1. COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS DE CAFÉ.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3. EXTRAÇÃO DE MATERIAL DE ALTO PESO MOLECULAR (HMWM) .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.1. EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS ALCALINAS (KOH).....</b>	<b>38</b>
<b>3.3.1.1. PUREZA E COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS ppEtOH EM TERMOS DE POLISSACARÍDEOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.3.2. EXTRAÇÃO SEQUENCIAIS ALCALINAS (NaOH).....</b>	<b>43</b>
<b>3.3.2.1. COMPOSIÇÃO E PUREZA DOS EXTRATOS ppEtOH EM TERMOS DE POLISSACARÍDEOS.....</b>	<b>43</b>
<b>3.3.3. RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS (MW) .....</b>	<b>45</b>
<b>3.3.3.1. PUREZA E COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS ppEtOH EM TERMOS DE POLISSACARÍDEOS.....</b>	<b>47</b>
<b>3.3.3.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE IMUNOESTIMULADORA DAS AMOSTRAS .....</b>	<b>52</b>
<b>CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES .....</b>	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO V – PROPOSTAS DE TRABALHO FUTURO.....</b>	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>

---



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação de uma montagem de Soxhlet tradicional.....	8
Figura 2: Figura representativa dos principais tipos de agregação por peneiramento possíveis no caso de uma extração industrial utilizando solventes orgânicos: A- Agregação por peneiramento side-to-side; B- Agregação por peneiramento top-to-bottom. ....	9
Figura 3: Figura representativa da estrutura genérica de uma galactomanana.....	11
Figura 4: Figura representativa da estrutura genérica de uma arabinogalactana.....	11
Figura 5: Imagem de um aparelho de micro-ondas laboratorial.....	13
Figura 6: Imagem demonstrativa da montagem efetuada para a extração etanol/água (1:1) em refluxo de solvente.....	19
Figura 7: Esquema representativo do procedimento experimental A para a extração sequencial de polissacarídeos do resíduo de café previamente desengordurado.....	21
Figura 8: Esquema representativo do procedimento experimental A para a extração sequencial de polissacarídeos do resíduo de café previamente desengordurado.....	22
Figura 9: Esquema representativo do sistema de extração e isolamento de polissacarídeos por MO.....	24
Figura 10: Abundância relativa (% molar) de açúcares no extrato obtido por extração EtOH/H <sub>2</sub> O (1:1).....	32
Figura 11: Pastilhas de resíduo de café feitas utilizando uma prensa manual no interior de uma montagem Soxhlet. ....	35
Figura 12: Abundância relativa (%molar) de TAG do óleo de café obtido por diferentes condições de extração (1h e 2h com o resíduo húmido e 2h com o resíduo em pastilhas). .	37

---

---

Figura 13: Abundância relativa (% molar) de açúcares nos diferentes extratos obtidos por extração sequencial em meio alcalino utilizando KOH. (Legenda: arabinose (Ara), manose (Man), galactose (Gal) e Glucose (Glc).) .....	41
Figura 14: Monitorização da abundância relativa (% molar) de açúcares nos resíduos intermédios da extração sequencial em meio alcalino utilizando KOH.(Legenda: arabinose (Ara), manose (Man), galactose (Gal) e Glucose (Glc)) .....	42
Figura 15: Média da abundância relativa (% molar) de açúcares nos extratos obtidos por extração em meio alcalino utilizando NaOH. (Legenda: arabinose (Ara), manose (Man), galactose (Gal) e Glucose (Glc)) .....	44
Figura 16: Abundância relativa (% molar) de açúcares dos extrato obtidos por extração assistida com radiação MW e respetivos resíduos remanescentes. (Legenda: arabinose (Ara), manose (Man), galactose (Gal) e Glucose (Glc)). .....	48
Figura 18: Análise espectrofotométrica (280nm, 325nm e 405nm) e de condutividade das alíquotas recolhida após eluição do SnEtOH da extração MW B, na coluna de exclusão molecular. “Ve” significa volume de exclusão e “Vi” significa volume de inclusão. ....	51
Figura 19: Abundância relativa (% molar) de açúcares presentes nas frações F1 e F2 recolhidas por eluição do SnEtOH da extração MW B. ....	52
Figura 20: Citogramas obtidos através da análise da atividade imunoestimuladora das amostras F1, F2, F1 (25) e F2 (25) por citometria de fluxo. ....	53

---

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Composição da semente de café verde, semente de café torrada e resíduo de café. .....	4
Tabela 2: Principais ácidos gordos presentes nos triacilglicerídeos do óleo de café .....	6
Tabela 3: Percentagens de extração de óleo de café do resíduo de café utilizando diferente tempos de extração (1h, 2h e 4h) e diferentes tamanhos de partículas do resíduo de café (pó e pastilhas). .....	33
Tabela 4: Análise comparativa da abundância relativa de TAG entre este trabalho e trabalhos anteriores utilizando o mesmo método utilizado neste trabalho e utilizando outros métodos de extração do óleo de café.....	38
Tabela 5: Rendimentos de extração obtidos na extração sequencial em meio alcalino utilizando KOH tendo em conta o material precipitado e os açúcares presentes nesse material. .....	39
Tabela 6: Rendimentos de extração obtidos nas extrações sequenciais em meio alcalino utilizando NaOH tendo em conta o material precipitado e os açúcares presentes nesse material. ....	43
Tabela 7: Tabela comparativa entre rendimentos de extração de açúcares, obtidos utilizando KOH e NaOH como agente alcalinizantes do meio. ....	45
Tabela 8: Rendimentos de extração de HMWM utilizando extração assistida com radiação MW.....	46
Tabela 9: Rendimentos de extração obtidos nas extrações sequenciais em meio alcalino utilizando NaOH tendo em conta o material precipitado e os açúcares presentes nesse material. ....	48
Tabela 11: Valores do peso molecular médios das moléculas presentes em F1, F2, MW(0,1M) e MW (0,2M) (M <sub>w</sub> – peso molecular médio; M <sub>n</sub> – média numérica; PD – fator de multidiversidade) .....	55

---

## **ABREVIATURAS**

AG - arabinogalactanas

AGI – arabinogalactanas do tipo I

AGII - arabinogalactanas tipo II

AGP - complexo arabinogalactana-proteína

Ara – arabinose

DVB/CAR/PDMS - divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EtOH - Etanol

FACS - Fluorescence-activated cell sorting

FAME - Fatty acid methyl ester (ácidos gordos metil esterificados)

Fuc - fucose

Gal – galactose

GC - gas chromatography (cromatografia de fase gasosa)

GC-FID - gas chromatography acoplated to flame ionizing detector (cromatografia de fase gasosa acoplada com detetor de ionização de chama)

Glc – glucose

GPC – cromatografia de permeação em gel

HMWM - material de alto peso molecular

HPLC - High-performance liquid chromatography (cromatografia em fase líquida de alta

HPLC-UV - High-performance liquid chromatography acoplated to Ultraviolet spectroscopy (cromatografia em fase líquida de alta performance com espectroscopia ultravioleta acoplada)

ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

LPS – Lipopolissacarídeos

Man – manose

MCP-1 - monocyte chemoattractant protein-1

Mw – peso molecular

MWA – extração micro-ondas A

MWB – extração micro-ondas B

---

NK - natural killers

P1KOH – extrato obtido após a primeira extração alcalina com KOH

P2KOH - extrato obtido após a segunda extração alcalina com KOH

P3KOH - extrato obtido após a terceira extração alcalina com KOH

PBS - phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)

P1NaOH - extrato obtido após a primeira extração alcalina com NaOH

P2NaOH - extrato obtido após a segunda extração alcalina com NaOH

ppEtOH – precipitado obtido por precipitação em etanol

PD – fator de multidispersão

R1KOH – resíduo de café remanescente da primeira extração alcalina com KOH

R2KOH - resíduo de café remanescente da segunda extração alcalina com KOH

R3KOH - resíduo de café remanescente da terceira extração alcalina com KOH

R MWA – resíduo de café remanescente da extração utilizando MW A

R MWB – resíduo de café remanescente da extração utilizando MW B

RD – resíduo desengordurado

Res. - Resíduo

Rha – ramnose

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SnEtOH - sobrenadante da precipitação em etanol

SPME - Solid phase micro extraction (micro-extração em fase sólida)

TAG - triacilglicerídeos

TNF - tumor necrosis factor

Xyl – xilose

---



# Capítulo I – Introdução

Atualmente, uma das preocupações mais evidentes da indústria agroalimentar é o escoamento de resíduos inerentes à produção dos produtos que comercializam, devido ao seu elevado volume produzido. O seu escoamento nem sempre é feito corretamente e o elevado potencial destes resíduos é frequentemente negligenciado. Assim sendo, o elevado volume de resíduos produzidos, conjugado com o valor de determinados compostos de interesse presentes nos mesmos, fazem do setor agroalimentar uma área com enorme potencial na valorização de resíduos através do seu escoamento sustentável e rentabilização.

Nos dias que correm já existem alguns tipos de escoamento e aproveitamento de resíduos agroalimentares que têm como objetivo a valorização comercial dos mesmos. Não obstante, alguns destinos dados a estes resíduos não exploram todo o seu potencial, como a utilização na preparação de ração animal, como fertilizante ou da sua combustão de resíduos com elevados potenciais calóricos para obtenção de energia.<sup>1</sup> Este tipo de aplicação, embora útil, uma vez que existe um escoamento proveitoso dos resíduos, fica aquém de usufruir de todo potencial económico que estes possuem.

O surgimento de máquinas de venda automática para a comercialização de bebidas quentes como o café surge como uma oportunidade do aproveitamento do resíduo de café na medida em que permite uma obtenção constante de resíduo de café em condições ótimas de conservação. O excelente estado de conservação do resíduo de café neste tipo de máquinas deve-se ao facto de não ser misturado com outros tipos de resíduos provenientes da preparação de outras bebidas disponíveis. Desta forma, o resíduo de café é armazenado isoladamente, contrariamente ao que sucede nas superfícies que comercializam a bebida, onde o resíduo de café é armazenado de forma grosseira e em conjunto com muitos outros resíduos inerentes à sua atividade comercial.

O resíduo de café apresenta na sua constituição vários compostos, como lípidos, cafeína, ácidos clorogénicos e açúcares, passíveis de serem extraídos com sustentabilidade e rentabilidade, conferindo ao resíduo de café um elevado potencial económico.<sup>2</sup>

Assim sendo, neste trabalho foi efetuada uma análise experimental da valorização comercial do resíduo de café através da otimização da extração sequencial de compostos com valor comercial para possível aplicação à escala industrial. Foi dado destaque aos polissacarídeos e ao óleo de café como compostos com maior viabilidade de aplicação deste tipo de metodologia à escala industrial, uma vez que são compostos majoritários do resíduo de café e com características biológicas interessantes.

Para a extração destes compostos foram utilizadas técnicas já descritas na literatura científica como eficazes, como a metodologia de Soxhlet para a extração da fração lipídica e extrações em meio alcalino ou extração assistida por micro-ondas para a extração dos polissacarídeos. Foi também efetuada uma breve caracterização do material extraído para aferir a sua real potencialidade, sendo ainda testado o potencial imunostimulador dos polissacarídeos extraídos.

## 1.1. CARACTERIZAÇÃO DO CAFÉ

O café, bebida mundialmente consumida e com um elevado reconhecimento científico ao nível das suas propriedades estimulantes, é uma bebida com origem na província de Kaffa, na Etiópia, embora a planta fosse já utilizada desde a antiguidade por algumas culturas africanas. O grão de café é a semente do cafeeiro e a infusão denominada de café é preparada a partir desta semente torrada e triturada por extração com água quente.<sup>3</sup>

As duas espécies de café mais consumidas mundialmente são a *Coffea arábica* L. e *Coffea canephora* (variedade robusta), que apresentam características organoléticas e químicas distintas entre si, apropriadas para diferentes aplicações na indústria do café. A espécie *Coffea arabica* é a mais apreciada para a comercialização de café para preparação de café expresso devido ao seu sabor menos amargo, enquanto a espécie *Coffea canephora* é a mais utilizada para a produção de café instantâneo por ser uma espécie que contém uma maior quantidade de compostos solúveis e por conter um maior teor de cafeína.<sup>3</sup>

O café é um produto que sofre bastantes alterações ao longo do seu processamento até à obtenção do produto final.<sup>4</sup> A torra do grão de café, um processo geralmente efetuado a temperaturas de 200-250°C<sup>5</sup>, é responsável pela degradação de alguns compostos presentes na matriz do grão de café, como alguns polissacarídeos, proteínas e ácidos clorogénicos, dando origem a determinados compostos que dão ao café o seu aroma característico, como polissacarídeos com o terminal redutor substituído por uma série de compostos, através de reações de caramelização, reações de Maillard, reações de descarboxilação e de oxidação.<sup>6</sup>

Durante o processo de torra ocorre também a formação de lactonas fenólicas por reações de pirólise<sup>7</sup>, a partir de compostos fenólicos como os ácidos clorogénicos (compostos fenólicos constituídos por um ácido trans-cinâmico ligado a ácido quínico por uma ligação do tipo ester)<sup>8</sup> presentes na sua composição. Também as melanoidinas, que são compostos acastanhados com uma composição extremamente variada e complexa<sup>9</sup>, são formadas durante o processo de torra através de reações ainda algo incompreendidas mas que englobam reações de Maillard, pirólise, entre outras.<sup>10,11</sup>

A moagem é um processo físico de trituração do grão de café que também provoca ligeiras alterações na sua matriz. Tem como objetivo final o aumento da superfície do grão de

café de modo a maximizar a extração do material solúvel presente no grão, obtendo assim uma melhor infusão. A moagem deve ser efetuada imediatamente antes da preparação da infusão, pois após o processo de moagem, alguns compostos presentes na matriz do café começam a sofrer oxidação por exposição a agentes oxidantes existentes no ar.<sup>3</sup>

A composição do café a nível biomolecular é bastante diversa e depende amplamente da espécie de café e do processamento do mesmo. Como se pode verificar na tabela 1, o café é constituído maioritariamente por polissacarídeos e óleo de café.<sup>12,13</sup>

**Tabela 1:** Composição da semente de café verde, semente de café torrada e resíduo de café.<sup>12-14</sup>

<b>Composto</b>	<b>Café verde</b>	<b>Grão de café torrado</b>	<b>Resíduo de café</b>
<b>Polissacarídeos (%)</b>	50 - 55	24 - 39	65,9
<b>Óleo de café (%)</b>	12 - 18	14,5 - 20	11 - 20
<b>Ácidos clorogénicos (%)</b>	5,5 - 8,0	1,2 - 2,3	0,212 - 0,766
<b>Proteínas (%)</b>	11 - 13	13 - 15	≈ 15
<b>Cafeína (%)</b>	0,9 - 1,2	≈ 1	≈ 0,0225
<b>Melanoidinas (%)</b>	n.d	16 - 17	

Embora em quantidades mais baixas, existem moléculas como a cafeína e os ácidos clorogénicos que são responsáveis por algumas das características mais apreciadas no café, tais como o seu poder estimulante do sistema nervoso central<sup>15</sup> devido à capacidade da cafeína atuar como antagonista da adenosina nos recetores de adenosina A<sub>2A</sub>, estimulando os neurotransmissores colinérgicos.<sup>16</sup>

De igual forma, o poder antioxidante do café, isto é, a capacidade de defenderem as células e biomoléculas do organismo do efeito oxidante dos radicais livres, é uma característica bastante apreciada e bastante procurada pelos consumidores e deve-se em grande parte à atividade biológica dos ácidos clorogénicos. Estudos *in vitro* e *in vivo* apontam para o facto de alguns ácidos clorogénicos apresentarem capacidade de atuarem também como antivirais<sup>17</sup>, modeladores do sistema imunitário<sup>18</sup> e hepatoprotetores.<sup>19</sup>

Similarmente, as lactonas fenólicas, compostos produzidos a partir dos ácidos clorogénicos por reações de pirólise no processo de torra, apresentam atividade biológica,

nomeadamente como moléculas com efeito hipoglicémico<sup>20</sup> e como antagonistas da adenosina.<sup>21</sup>

## **1.2. RESÍDUO DE CAFÉ**

O resíduo de café, comumente designado de “borra de café”, é o resíduo excedentário obtido através da preparação da infusão denominada de café. É um resíduo que difere do café torrado e moído por ter sido sujeito a extração utilizando água quente, por um determinado período de tempo, dependendo do modo de preparação da bebida. Regra geral, 1000 kg de café verde gera 650 kg de resíduo de café<sup>22</sup>, o que tendo em conta o consumo mundial de café, implica uma produção anual de resíduo de café a rondar os 6 mil milhões de toneladas.<sup>23</sup> Esta extração é responsável pela remoção de compostos solúveis presentes no grão de café, como a cafeína, alguns polissacarídeos e compostos voláteis, embora não na sua totalidade.

O método de preparação da bebida tem uma grande influência na composição do resíduo resultante, pois fatores como a temperatura da água e o tempo de extração vão ditar uma maior ou menor extração de certos compostos, originando assim resíduos com composições distintas.<sup>24,25</sup> Apesar da extração prévia de compostos solúveis, o resíduo de café mantém uma composição extremamente rica em compostos extratáveis com valor comercial bastante interessante, mantendo-se os polissacarídeos e a fração lipídica como compostos maioritários.

Apesar da diversidade molecular que o resíduo de café apresenta, e não descartando o importante contributo de compostos como a cafeína, ácidos clorogénicos e melanoidinas para a valorização deste resíduo, consideramos os polissacarídeos e os lípidos como sendo os principais compostos passíveis de serem extraídos com assinalável sustentabilidade e rentabilidade devido à grande quantidade destes compostos presente no resíduo de café, nomeadamente os polissacarídeos, e à relativa facilidade da sua extração, principalmente o óleo de café.

### **1.2.1. ÓLEO DE CAFÉ**

O óleo de café corresponde à fração lipídica do resíduo de café. É o conjunto das moléculas hidrofóbicas presentes no grão de café e dos compostos lipossolúveis em si dissolvidos, não sendo extraído no processo de preparação da bebida.<sup>26</sup> Existe no grão de café

em quantidades que rondam os 11% e os 20%.<sup>13</sup> Esta percentagem mantém-se relativamente constante ao longo do processamento do café (torra, moagem e preparação da bebida) encontrando-se no resíduo de café em percentagens de aproximadamente 15%.<sup>13</sup>

A fração lipídica do resíduo de café, após extração, caracteriza-se por ser um líquido acastanhado e viscoso com o forte aroma a café, apresentando uma composição de 75% de triacilglicerídeos, 19% de compostos diterpénicos, 5% de esteróis livres esterificados e outros compostos em quantidades vestigiais.<sup>27</sup>

Os triacilglicerídeos são moléculas constituídas por 3 ácidos gordos (cadeias carbonadas saturadas ou com algumas insaturações) ligados a uma molécula de glicerol por ligações tipo éster. Cada glicerol pode ter diferentes ácidos gordos ligados a si em combinações várias de 3 ácidos gordos. Os ácidos gordos presentes no óleo de café e as suas quantidades relativas estão indicados na tabela 2. O ácido gordo presente em maior quantidade é o ácido linoleico, que é um  $\omega$ -6 que o organismo humano não consegue sintetizar mas que é necessário, entre outras razões, por ser o substrato para a biossíntese de ácido di-homo- $\gamma$ -linolénico e de ácido araquidónico, que por sua vez são precursores da biossíntese de prostaglandinas, moléculas que assumem de apoio na regulação da pressão sanguínea, na contração muscular e agregação das plaquetas do sangue.<sup>28</sup>

**Tabela 2:** Principais ácidos gordos presentes nos triacilglicerídeos do óleo de café.<sup>29</sup>

	<i>Robusta (%)</i>	<i>Arabica (%)</i>
<b>Palmítico (16:0)</b>	30,05 - 34,16	30,69 - 35,57
<b>Estearico (18:0)</b>	7,09 - 7,81	6,61 - 8,62
<b>Oleico (18:1)</b>	11,28 - 13,17	7,33 - 13,11
<b>Linoleico (18:2)</b>	40,83 - 44,40	41,41 - 47,80
<b>Linolénico (18:3)</b>	0,78 - 0,93	1,04 - 1,69
<b>Araquidónico (20:0)</b>	2,94 - 3,19	2,12 - 2,90

Os compostos diterpénicos encontrados no óleo de café, tais como o cafestol, kahweol e o 16-O-metilcafestol (exclusivo da espécie Arabica) principais diterpenos encontrados no óleo de café, são compostos bastante interessantes uma vez que vários estudos reportam o seu potencial como moléculas com elevada atividade biológica: células tratadas com compostos

diterpénicos apresentam maior resistência a danos no ADN provocados por radicais lívres, apontando para a capacidade antioxidante deste tipo de compostos.<sup>30</sup>

Cardenas *et al*<sup>31</sup> reportaram que o kahweol reduz a quantidade de cicloxigenase-2 e MCP-1 (proteínas reguladoras da resposta inflamatória) em estudos realizados com células endoteliais da veia umbilical, apontando para o facto de este diterpeno ter propriedades anti-inflamatórias e anti-angiogénicas, sendo que já em estudos anteriores tinha sido proposta esta capacidade anti-inflamatória do kahweol por reduzir a óxido nítrico sintase na sua isoforma induzível (enzima envolvida na resposta inflamatória) em ratos tratados com carragenana.<sup>32</sup>

Os triacilglicerídeos, principais compostos presentes no óleo de café, tem também um elevado potencial industrial como matéria-prima para a produção de biodiesel. Através de processos de transesterificação utilizando um álcool e um catalisador ácido ou alcalino, ocorre a formação de ésteres de alquilo de cadeia longa e glicerol, sendo o rendimento reacional de 90-97% quando na presença de excesso de álcool.<sup>33</sup> Os ésteres de alquilo formados são moléculas altamente energéticas e passíveis de serem aplicadas como combustível biológico (biodiesel).<sup>34</sup>

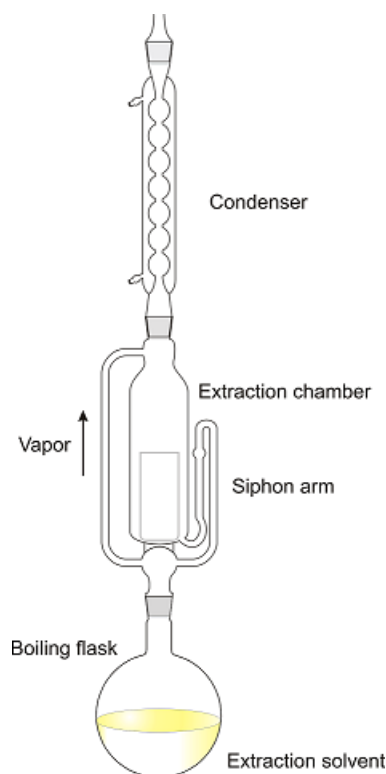
O biodiesel produzido atualmente a partir do óleo de café ainda não obedece às normas energéticas europeias (NP EN 14214:2009) devido ao elevado valor de acidez final, valor de iodo (técnica utilizada para quantificar as insaturações dos ésteres metílicos do biodiesel), de viscosidade e densidade e ao baixo conteúdo de ésteres metílicos, quando comparado com os valores de referência da norma NP EN 14214:2009.<sup>35</sup> Apesar destes fatores, a potencialidade do óleo de café como matéria-prima para a produção de biodiesel é real, sendo a elevada estabilidade do óleo de café e o seu baixo nível de saponificação, características bastante favoráveis para uma possível aplicação do óleo de café na produção de biodiesel.<sup>1</sup>

#### **1.2.1.1. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO LIPÍDICA**

A extração da fração lipídica pode ser feita utilizando fluídos supercríticos (CO<sub>2</sub>)<sup>26</sup> ou através do uso de solventes orgânicos (p.e. hexano, pentano, éter de petróleo, entre outros). O uso de solventes orgânicos como o n-hexano para a extração de lípidos de vários tipos de matrizes vegetais é um método já amplamente utilizado industrialmente, nomeadamente na produção de óleo de soja<sup>36</sup> e do azeite refinado. Recentemente, foram feitos avanços na tecnologia de extração de lípidos utilizando fluidos supercríticos.<sup>37,38</sup> Apesar das boas

indicações ao nível de rendimento de extração e de pureza da amostra que este tipo de tecnologia revelou, este é ainda um método pouco utilizado devido aos seus custos elevados associados.

O processo de extração com solventes orgânicos aplicando a metodologia de Soxhlet é uma extração efetuada em sistema fechado com reutilização contínua do solvente que permite efetuar várias extrações sucessivas utilizando sempre o volume de solvente inicial. A chave desta metodologia reside no extrator utilizado (extrator de Soxhlet) que permite fazer vários ciclos de extração.<sup>39</sup>

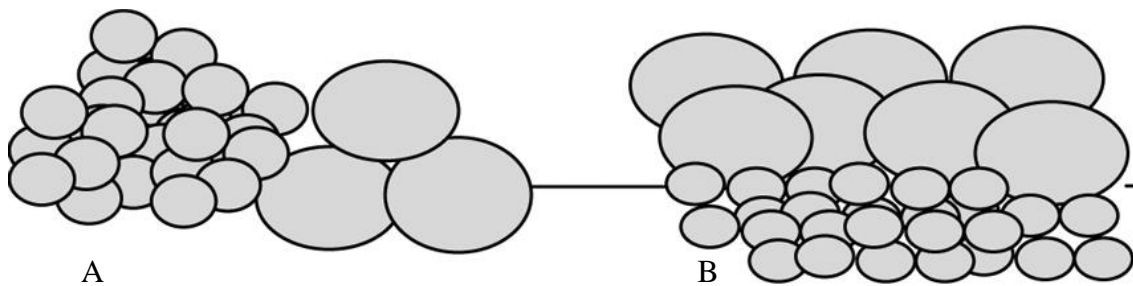


**Figura 1:** Representação de uma montagem de Soxhlet tradicional.

A utilização de solventes orgânicos associada com a metodologia de Soxhlet para a extração de lípidos apresenta-se atualmente como sendo uma ótima opção para este tipo de extração apesar da toxicidade associada aos solventes orgânicos, sendo necessária uma extração do solvente extremamente eficaz e controlada por evaporação do mesmo. De entre muitos solventes orgânicos já testados, o n-hexano mostrou ser o solvente que apresenta melhores rendimentos de extração do óleo do resíduo de café.<sup>40</sup>



A nível industrial, quando se utiliza matrizes sob a forma de partículas aglomeradas como é o caso do resíduo de café, verifica-se comumente casos de agregação dessas partículas. Esta agregação pode ser dividida em várias categorias dependendo do processo aplicado e da matriz utilizada. No contexto do trabalho efetuado, atendendo à matriz utilizada e ao processo de extração do óleo de café utilizado, o tipo de agregação mais comum é a agregação por peneiramento. Este fenómeno consiste no deslocamento das partículas mais pequenas da matriz no sentido da deslocação do solvente,<sup>41</sup> que pode ser dividido em dois tipos específicos: agregação vertical, onde as partículas mais pequenas acumulam-se no fundo do extrator e as maiores no topo (agregação top-to-bottom), ou a agregação horizontal, onde as partículas mais pequenas deslocam-se para a lateral a jusante do extrator no caso de a extração ser efetuada com um extrator horizontal (agregação side-to-side) (figura 1).



**Figura 2:** Figura representativa dos principais tipos de agregação por peneiramento possíveis no caso de uma extração industrial utilizando solventes orgânicos: A- Agregação por peneiramento side-to-side; B- Agregação por peneiramento top-to-bottom.

A acumulação de partículas finas na extremidade do extrator pode dar origem à formação de placas bastante sólidas de partículas agregadas entre si. Isto é problemático pois, além de estas placas poderem tamponar o extrator e afetar de sobremaneira a extração, a remoção destas placas pode ser bastante complicada, dependendo do nível de agregação em que estas partículas se encontram. De modo a prevenir que estes fenómenos aconteçam é necessário efetuar uma avaliação ao tamanho e a forma das partículas da matriz de modo a otimizar a extração de maneira a minimizar o risco de ocorrência destes fenómenos.<sup>42</sup> Geralmente pode ser efetuada uma alteração à forma das partículas (comumente polir as partículas) no caso de estas terem uma superfície irregular que permita encaixes entre elas.<sup>43</sup> Outra solução, e a mais utilizada,

passa por diminuir a diferença de tamanhos entre partículas, quer por granulação de partículas maiores em partículas menores, quer por aglomeração de partículas menores em partículas maiores.<sup>44</sup> Este método permite um equilíbrio entre tamanhos, minimizando os fenómenos de agregação por peneiramento.

### 1.3. POLISSACARÍDEOS

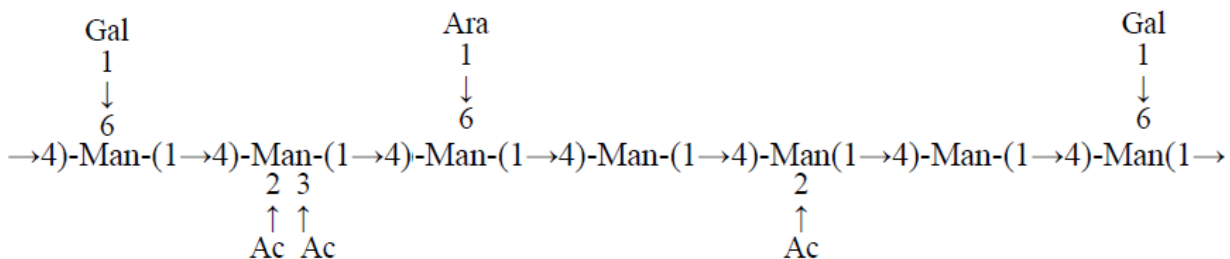
Os polissacarídeos presentes no café são responsáveis por muitas das características organolépticas mais apreciadas no café tais como a viscosidade, atribuída, em parte, ao facto de estes polissacarídeos estarem envolvidos na retenção de compostos voláteis do café, a sensação cremosa sentida na degustação do café e ainda a consistência da espuma do café.<sup>45</sup>

Estudos recentes revelam que estes polissacarídeos apresentam atividade biológica, apresentando propriedades imunoestimuladoras ao nível da mucosa gástrica<sup>46</sup>, atividade antioxidante, antitumoral, antiviral e antitússica<sup>47,48</sup>, além de apresentarem características estruturais ideais para o desempenho de funções de fibra dietética<sup>49,50</sup> e de gelificantes<sup>51</sup>, sendo que a sua potencial aplicabilidade na indústria alimentar confere-lhes um valor intrínseco bastante interessante.

Na preparação da infusão, grande parte do material solúvel presente no café, e os polissacarídeos, sendo moléculas muito menos solúveis (particularmente as galactomananas e a celulose) e que portanto, permanecem no resíduo resultante da preparação da infusão. Apenas de 6%-12% dos polissacarídeos que não são degradados pelo processo de torra do café são extraídos no processo de preparação da bebida, e alguns polissacarídeos sofrem degradação durante o processo de torra e os fragmentos formados podem ser extraídos na bebida.<sup>52</sup> Os polissacarídeos, correspondem a  $65,9 \pm 6,5\%$  da massa de resíduo de café, sendo que 50%, 25% e 25% dessa fração de polissacarídeos correspondem a Galactomanans, arabinogalactanas e celulose, respetivamente.<sup>14,53,54</sup>

As galactomananas são polissacarídeos pouco ramificados e pouco solúveis, sendo os polissacarídeos maioritários do resíduo de café.<sup>55</sup> São compostos por uma cadeia principal de resíduos de D-manose, ligados entre si por ligações  $\beta(1 \rightarrow 4)$ , tendo ramificações de galactose em ligação  $\alpha(1 \rightarrow 6)$  e também resíduos de arabinose ligados à cadeia principal igualmente com

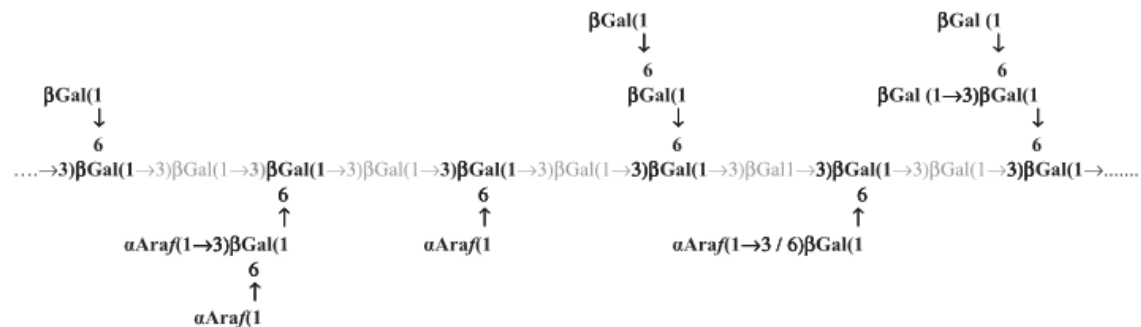
ligações  $\alpha(1\rightarrow6)$ . Estas galactomananas podem também ser acetiladas nas posições 2 e/ou 3 da cadeia principal<sup>6</sup> (Figura 3).



**Figura 3:** Figura representativa da estrutura genérica de uma galactomanana

As galactomananas presentes no grão de café são estruturalmente muito semelhantes às galactomananas encontradas em extratos de *Aloe vera*<sup>56</sup>, e o seu grau de ramificação e acetilação é variável e dependente do grau de maturação a que o grão de café foi sujeito.

As arabinogalactanas presentes no resíduo de café são do tipo II (AGII). A estrutura destes polissacarídeos consiste em uma cadeia principal constituída por resíduos de galactose em ligação  $\beta(1\rightarrow3)$  com ramificações compostas por resíduos de galactose em ligação  $\beta(1\rightarrow6)$  e/ou arabinose em ligação  $\alpha(1\rightarrow3)$ , podendo apresentar ainda resíduos de glucose nos terminais redutores da cadeia principal em ligação  $\beta(1\rightarrow4)$ <sup>57</sup> (Figura 4). Estas arabinogalactanas são um grupo bastante heterogéneo de polissacarídeos com uma estrutura variável consoante a proporção de arabinose-galactose.



**Figura 4:** Figura representativa da estrutura genérica de uma arabinogalactana

As AGII encontram-se usualmente ligadas a proteínas ou frações proteicas, formando um complexo arabinogalactana-proteína (AGP) contendo percentagens proteicas entre os 0,4% e os 1,9%.<sup>58</sup>

A celulose é um polissacarídeo também presente no resíduo de café. É um composto comum a todo o tipo de matrizes vegetais em quantidades variáveis de planta para planta, pois desempenha funções estruturais ao nível da parede celular das células vegetais. É constituído por uma cadeia linear de monómeros de glucose ligados por ligações  $\beta(1\rightarrow4)$  e devido ao facto de não ter ramificações e devido ao elevado tamanho da cadeia, é um polissacarídeo insolúvel. Esta estrutura linear confere á celulose uma ordenação espacial intermolecular que, conjugada com o facto de as várias cadeias de celulose formarem ligações H-H bastante fortes entre si, faz com que a celulose seja muito mais difícil de extrair por comparação com outros polissacarídeos.<sup>59</sup>

### 1.3.1. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS

A extração de material de alto peso molecular, como é o caso dos polissacarídeos, do resíduo de café pode ser efetuada de várias formas. As duas metodologias mais utilizadas são a extração aquosa em ambiente alcalino com aplicação de temperatura por um determinado período de tempo seguida da neutralização do sobrenadante e posterior diálise do mesmo.

A utilização de radiação micro-ondas tem vindo a revelar-se como uma alternativa viável e eficaz para a extração de polissacarídeos da matriz do resíduo de café.<sup>14,60</sup> É uma metodologia que pode utilizar apenas água como único solvente a uma temperatura e pressão elevadas. Por isso, trata-se de uma metodologia que se enquadra no conceito de química verde por ter custos de utilização baixos e impacto a nível ambiental muito reduzido.

Vários estudos mostram que a utilização de radiação de micro-ondas diminui o tempo necessário para a ocorrência de reações químicas, pode aumentar o rendimento de reação e permite uma seletividade na formação de produtos de reação, em sínteses químicas. À semelhança de um micro-ondas doméstico, um micro-ondas laboratorial, funciona através da irradiação da amostra com radiação micro-ondas. A radiação (campo elétrico de alta frequência) faz com que os iões livres e os eletrões presentes na amostra se desloquem na mesma direção do campo elétrico aplicado. Moléculas polares como a água, na presença deste campo elétrico de alta frequência começam a oscilar constantemente, sendo este efeito o responsável pelo aquecimento da amostra.<sup>61</sup>

Os aparelhos atualmente utilizados em laboratório são equipados para suportar ambientes de altas temperaturas e altas pressões no seu interior (Figura 5), permitindo atingir condições de reação até aqui muito difíceis de alcançar, abrindo a porta à otimização de vários tipos de reações químicas.



**Figura 5:** Imagem de um aparelho de micro-ondas laboratorial.

A extração aquosa em ambiente alcalino é um método bastante eficaz na extração de material de alto peso molecular e a metodologia consiste na utilização de uma solução alcalina (geralmente KOH ou NaOH) numa concentração que pode variar dependendo do objetivo da extração. O ambiente alcalino envolvente à amostra permite o enfraquecimento e quebra das pontes H-H intermoleculares nas moléculas de alto peso molecular como os polissacarídeos, promovendo a separação entre elas e a sua solubilização no sobrenadante aquoso, sendo a extração geralmente efetuada a uma temperatura baixa ou temperatura ambiente. Simões *et al* propôs uma metodologia de extração dos polissacarídeos da matriz do café utilizando reagentes alcalinos que consiste em extrações sequenciais com concentração crescente de NaOH.<sup>46</sup> A recuperação dos polissacarídeos a partir do sobrenadante da reação pode ser conseguida por precipitação em etanol utilizando percentagens variáveis de etanol em solução de modo a seleccionar o tipo de moléculas de interesse. Também a cromatografia de exclusão molecular

pode ser utilizada para a separação dos vários tipos de macromoléculas em solução, inclusive os polissacarídeos, consoante o seu tamanho.

### **1.3.2. PROPRIEDADES BIOATIVAS DOS POLISSACARÍDEOS DO RESÍDUO DE CAFÉ**

Os polissacarídeos no resíduo de café apresentam uma elevada atividade biológica, podendo atuar como moléculas imunoestimuladoras<sup>46</sup>, anti tumorais e antivirais<sup>62</sup>, anti-inflamatórias e anticoagulantes<sup>63</sup>, além de atuarem como fibras dietéticas<sup>49</sup>, hidratos de carbono que não são digeridos ao nível do intestino delgado, sofrendo posterior fermentação no intestino grosso por intermédio dos microrganismos da flora intestinal (*Codex Alimentarius* Comissão). A capacidade destes polissacarídeos terem uma atividade biológica tão variada depende de fatores, como a sua composição e estrutura, tipo de ligações, ramificações e grau de acetilação dos mesmos.<sup>64</sup> São polissacarídeos não exclusivos do resíduo de café, sendo encontrados polissacarídeos semelhantes na composição e estrutura, em plantas como o *Aloe vera*, alfarroba e resíduos lenho-celulósicos.<sup>64</sup>

### **1.3.3. POTENCIAL IMUNOESTIMULADOR DOS POLISSACARÍDEOS DO RESÍDUO DE CAFÉ**

O sistema imunitário é um sistema bastante complexo de defesa contra ataques externos ao organismo. A sua forma de atuação pode ser dividida em dois tipos. Por um lado temos a imunidade inata, que tal como o nome indica é inato a qualquer organismo. É uma defesa primária do organismo e que atua indiscriminadamente em todos os antigénios (todas as células, moléculas ou vírus estranhos ao organismo). Os macrófagos, neutrófilos e o sistema de complemento são os principais componentes da imunidade inata e são responsáveis pela identificação e imediata eliminação destes antigénios.<sup>65</sup>

A imunidade adquirida funciona como um arquivo de memória de todos os antigénios que a dada altura desencadearam respostas imunitárias no organismo. Esta memorização permite que exposições futuras ao mesmo antigénio desencadeiem respostas imunitárias mais rápidas e mais eficientes.<sup>65</sup> O mecanismo de atuação da resposta imunitária adquirida é dividido em três fases de atuação: reconhecimento, mobilização e ataque.<sup>65</sup>

O reconhecimento corresponde identificação de antigénios presentes no organismo. Este reconhecimento é feito maioritariamente por parte dos macrófagos que reconhecem o antigénio

invasor e fragmentam-no. Posteriormente, os macrófagos transmitem a informação da invasão às células do centro de histocompatibilidade major através da deposição dos fragmentos de antígeno na membrana celular destas células, que por sua vez transmite essa informação aos linfócitos T através da sua ligação ao fragmento de antígeno que as células do centro de histocompatibilidade major que transportam na sua superfície membranar.<sup>65</sup>

A mobilização corresponde à ativação das células responsáveis pela destruição do antígeno, e é feita através da libertação de citocinas como a interleucina-1, que mobiliza mais linfócitos T ao local da infeção, a interleucina-12, que é responsável pela mobilização das células NK (natural killer) e pela estimulação da produção de maiores quantidades de interferão, e a interleucina-8 que funciona como “rastros” para que os neutrófilos sejam capazes de descobrir o local de infeção.<sup>65</sup>

O ataque, tal como o nome indica, corresponde à destruição dos antígenos invasores, principalmente por parte das células NK, dos macrófagos e dos neutrófilos através de processos como a fagocitose ou a libertação de interferões. Quando a destruição total dos antígenos invasores não é possível, como é o caso da tuberculose, os remanescentes são encapsulados por células do sistema imunitário (granulomas) formando uma prisão que se mantém intacta desde que o sistema imunitário se mantenha forte e saudável.<sup>65</sup>

O sistema imunitário utiliza, no desempenho das suas funções, vários tipos de células como os neutrófilos, os macrófagos, nos quais se incluem os monócitos, e os linfócitos, que englobam os linfócitos B e T e as células NK. Estas células têm um papel próprio no desencadeamento da resposta imunitária, embora algumas tenham finalidades semelhantes mas locais e formas de atuação distintas.<sup>65</sup> Os macrófagos e os neutrófilos têm um papel muito semelhante, que passa pela destruição dos antígenos invasores. Enquanto os neutrófilos percorrem a corrente sanguínea livremente, os macrófagos estão colocados estrategicamente em possíveis pontos de entrada de antígenos no organismo como os pulmões.<sup>65</sup>

Várias fases da resposta imunitária parecem ser ativadas na presença de polissacarídeos como os encontrados no resíduo de café, como a estimulação da produção de macrófagos, produção de anticorpos, estimulação de linfócitos T<sup>66</sup>, e a estimulação da produção de TNF e outras citocinas<sup>47</sup>, mas mais estudos de correlação entre estrutura e funcionalidade dos polissacarídeos com atividade imunoestimuladora já comprovada são necessários de modo a tentar

identificar quais os processos da resposta imunitária que estes polissacarídeos são capazes de influenciar positivamente e de que forma.

#### **1.3.3.1. PROPRIEDADES BIOATIVAS DAS GALACTOMANANAS**

Um dos polissacarídeos com propriedades bioativas comprovadas do *Aloe vera*, e que desperta grande interesse é uma manana estruturalmente muito semelhante às galactomananas encontradas no resíduo de café. Ambas apresentam um grau de acetilação e uma estrutura e composição em termos de açúcares muito semelhantes. Simões *et al* observaram que estes dois polissacarídeos extraídos de matrizes distintas apresentam um elevado potencial como moléculas com atividade imunoestimuladora quando acetilados, potencial este comprovado com testes *in vitro*.<sup>46</sup>

As galactomananas têm ainda a particularidade de sofrerem uma rápida fermentação no cólon, prevenindo a quelação de minerais comumente verificada em alguns tipo de fibras dietéticas, tendo como produtos de fermentação manooligossacarídeos.<sup>67</sup> Estes manooligossacarídeos apresentam por si só uma elevada atividade biológica. Estudos *in vivo* mostram que estes compostos de fermentação estimulam o sistema imunitário da mucosa gástrica atuando ao nível da flora intestinal, contribuindo assim para a diminuição da quantidade de compostos de putrefação no intestino.<sup>67</sup>

#### **1.3.3.2. PROPRIEDADES BIOATIVAS DAS ARABINOGALACTANAS**

Arabinogalactanas de origem vegetal, como a descrita por Yamada *et al* apresentam uma elevada atividade biológica.<sup>68</sup> No resíduo de café encontramos arabinogalactanas do tipo II, sendo este tipo de arabinogalactanas o que apresenta uma maior diversidade de atividades biológicas, principalmente na estimulação da libertação de TNF (tumor necrosis factor),<sup>47</sup> ativando respostas imunitárias no organismo.



### 1.3.3.3. APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DA CELULOSE

A celulose, além das comprovadas competências como fibra dietética, possui uma série de possíveis aplicações nas mais variadas áreas, desde a construção civil, medicina e particularmente na indústria alimentar. Devido ao elevado número de grupos hidroxilo presentes na molécula de celulose, a sua modificação química permite explorar o seu grande potencial. Já desde há muito tempo que a celulose é utilizada na indústria alimentar, podendo ser alterado de maneira a desempenhar papéis de agente emulsionante e gelificante, sendo um aditivo alimentar já fortemente implementado.<sup>51,69</sup>

A celulose tem sido estudada como potencial substrato para a produção de bioetanol por fermentação. A produção de bioetanol utilizando celulose como substrato é já uma realidade,<sup>70</sup> e uma aplicação que torna a celulose um bom objeto de estudo na substituição de matérias produzidas à base do petróleo, quer a nível de polímeros quer a nível de produção energética.<sup>71</sup>

## Capítulo II – Materiais e métodos

### **2.1. DETERMINAÇÃO DA PERCENTAGEM DE HUMIDADE DO RESÍDUO DE CAFÉ**

Ao longo do processo, foi necessário quantificar a água presente nas diferentes amostras. Esta quantificação foi efetuada por gravimetria.

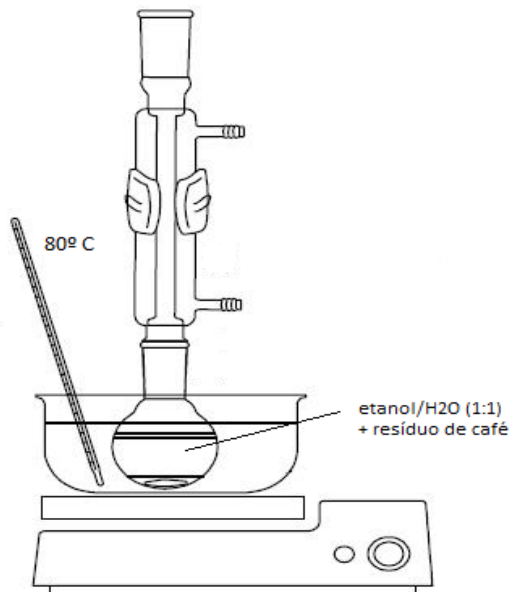
Uma alíquota de amostra foi colocada numa caixa de pesagem cuja massa foi previamente determinada e colocada numa estufa a 105°C durante 5h. As amostras foram arrefecidas à temperatura ambiente no exsicador e a sua massa determinada. O processo foi repetido até que a massa de amostra fosse constante. A diferença entre a massa de amostra inicial e a massa de amostra após secagem corresponde à massa de água perdida por evaporação.

### **2.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CAFEÍNA DO RESÍDUO DE CAFÉ**

Foi efetuada uma extração prévia utilizando um solvente polar, neste caso, uma solução de etanol e H<sub>2</sub>O numa proporção 1:1, utilizando um sistema de refluxo (sistema fechado) com agitação contínua (figura 6).

Foi medido 500g de resíduo de café com uma percentagem de humidade de 63,3% e colocado num balão de ebulição juntamente com 640mL de uma solução de etanol e H<sub>2</sub>O na proporção de 1:1 (o volume de água já presente no resíduo de café foi considerada na preparação da solução de solvente), submergindo o balão de ebulição num banho de água a 80°C com agitação constante durante 1h.

O sobrenadante foi então separado do resíduo por filtração e posteriormente desidratado por sublimação no liofilizador. Posteriormente procedeu-se à análise de açúcares e HPLC de modo a quantificar os açúcares e cafeína, respetivamente, presente no extrato obtido.



**Figura 6:** Imagem demonstrativa da montagem efetuada para a extração etanol/água (1:1) em refluxo de solvente.

A análise de HPLC ao extrato obtido por extração EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1) teve o objetivo de quantificar a cafeína extraída. A análise foi realizada na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro Doutor Fernando Nunes, tendo sido enviada uma amostra de 20,3 mg para quantificação. Utilizou-se um HPLC-UV com uma coluna de C18 de fase reversa, de 5 µm de diâmetro. Os compostos foram eluídos usando um gradiente de concentrações do eluente A [ácido fórmico 5%] e eluente B [metanol]. O gradiente começa com 95% de eluente A e 5% de B durante 5 min. Dos 5 aos 45 min o eluente B aumenta gradualmente até 40%. Dos 45 aos 65 min o eluente B aumenta gradualmente até 70%. Dos 65 aos 75 min o eluente B é reduzido gradualmente até 5%. O fluxo usado foi de 0,8 ml/min à temperatura de 25°C. Os picos foram detetados a 280 nm para quantificação da cafeína.

### 2.3. EXTRAÇÃO DO ÓLEO DO RESÍDUO DE CAFÉ

Para a extração da fração lipídica do resíduo de café utilizou-se uma montagem de Soxhlet com n-hexano destilado como solvente extrator. Colocou-se o resíduo de café num cartucho de Soxhlet de dimensões 23 X 100. Colocou-se 300mL de n-hexano num balão de ebulição de 500mL de volume submergindo-o num banho de água a 80°C, tendo as amostras

estado sujeitas a extração contínua durante 1, 2 ou 4h. Terminada a extração o solvente foi evaporado a pressão reduzida até à secura (*Rotavapor R-114, Buchi Water Bath B-480*).

### **2.3.1. QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS DO ÓLEO DO RESÍDUO DE CAFÉ**

Os ácidos gordos totais foram determinados por GC após transesterificação dos triacilglicerídeos nos correspondentes ésteres metílicos, utilizando a metodologia descrita por *Aued-Pimentel et al.* Os ésteres metílicos foram preparados utilizando uma solução de KOH (200 µL, 2,0 M) com metanol como solvente, seguida da adição de 1mL de n-hexano e posterior homogeneização. De maneira a formar duas fases de extração adicionou-se uma solução saturada de NaCl (2 mL), seguindo-se uma centrifugação a 2000 rpm durante 5 min. Recolheu-se 1mL da fase orgânica para um novo tubo de cultura e injetados no GC-FID 1,5 µL.

Foi utilizado um cromatógrafo de gás (*Clarus 400, PerkinElmer, Inc., MA, USA*) equipado com uma coluna DB-1 com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,15 µm de espessura de filme (*J&W Scientific, Agilent Technologies, Folsom, CA, USA*) e um detetor de ionização de chama. O injetor do GC foi programado a 250°C e o detetor a 270°C. Foi utilizado um programa de temperaturas com as seguintes condições: 3min a 50°C, rampa de 25°C/min até 180°C com estabilização a 180°C durante 6 min, rampa de 40°C/min até 260°C com estabilização a 260°C durante 3 min. Como gás de arraste foi utilizado hidrogénio com um caudal de 1,7 mL min<sup>-1</sup>. As concentrações relativas dos ácidos gordos foram calculadas pelo método da área percentual com normalização adequada, considerando a soma de todas as áreas dos ácidos gordos identificados.

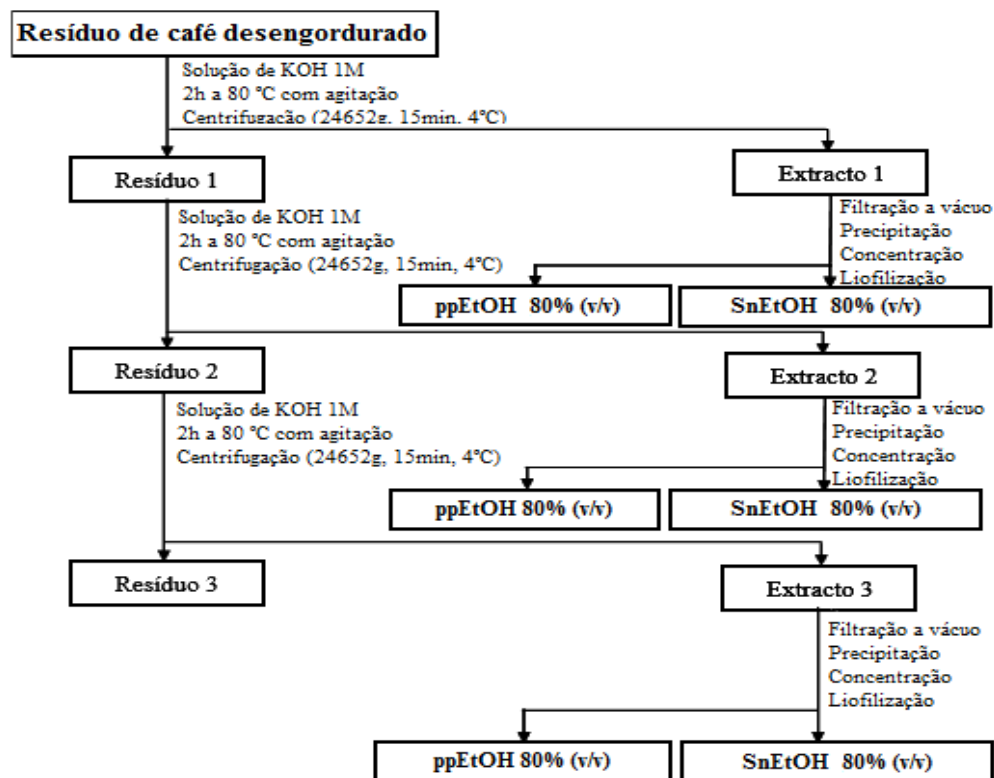
### **2.4. EXTRAÇÕES ALCALINAS DE POLISSACARÍDEOS**

A metodologia usada para a extração sequencial de polissacarídeos tem como base o procedimento descrito por *Simões et al (2009)* tendo sido feitas algumas alterações.<sup>46</sup> A metodologia utilizada compreende 3 passos distintos, a preparação das amostras, a extração dos polissacarídeos com reagentes alcalinos e o isolamento e purificação dos mesmos.

Nas extrações alcalinas foi utilizado resíduo de café obtido nas máquinas de venda automática cujo café utilizado é produzido pela empresa Delta®. O resíduo foi previamente desengordurado, em quantidades entre 20g e ~330,7 g com percentagens de hidratação variáveis. Para a extração de polissacarídeos do resíduo de café foram utilizadas soluções de KOH, e de NaOH, ambas com uma concentração de 1M.

Os polissacarídeos do resíduo de café foram extraídos por extração sequencial com (1) 420mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) a 1M + NaBH<sub>4</sub> a 0,02M, sob agitação, à temperatura de 80°C durante 1h; (2) 400mL de solução de KOH a 1M + NaBH<sub>4</sub> a 0,2M, sob agitação, à temperatura de 80°C durante 1h; (3) 325mL de solução de KOH a 1M + NaBH<sub>4</sub> a 0,02M, sob agitação, à temperatura de 80°C durante 1h.

As soluções de KOH com NaBH<sub>4</sub> foram preparadas imediatamente antes de cada extração.

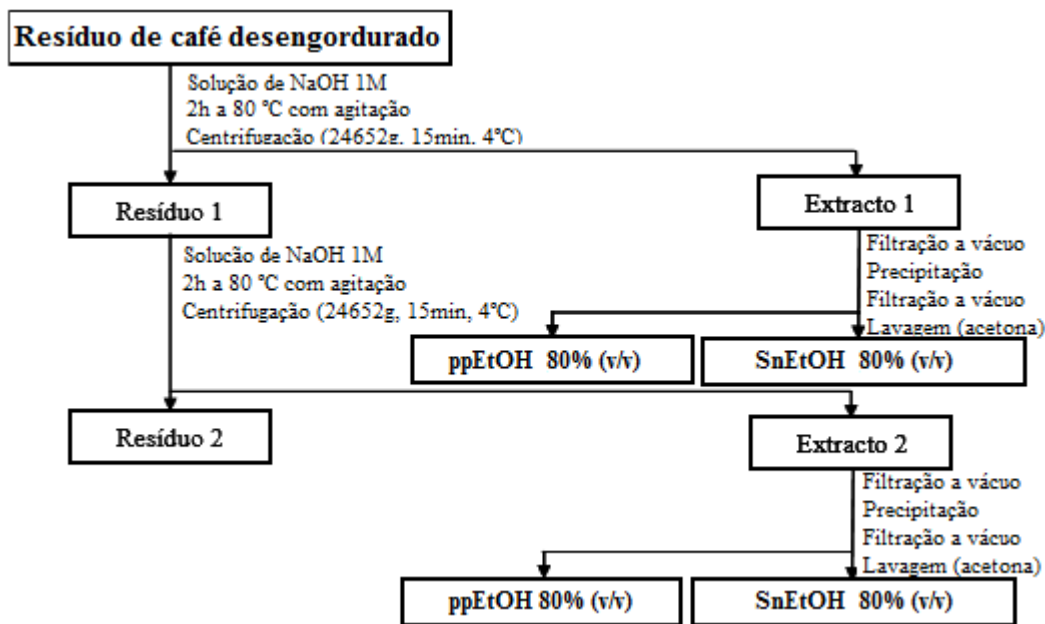


**Figura 7:** Esquema representativo do procedimento experimental A para a extração sequencial de polissacarídeos do resíduo de café previamente desengordurado.

Os polissacarídeos do resíduo de café foram extraídos por extração sequencial com (1) 200mL de solução de NaOH a 1M + NaBH<sub>4</sub> a 0,02M, sob agitação, à temperatura de 80°C durante 1h; (2) 200mL de solução de NaOH a 1M + NaBH<sub>4</sub> a 0,02M, sob agitação à temperatura ambiente durante a noite (aproximadamente 16h). As soluções de NaOH com NaBH<sub>4</sub> foram preparadas imediatamente antes de cada extração.

Foram ainda testadas extrações sequenciais sob as mesmas condições de tempo e temperatura descritas em B, utilizando uma menor quantidade de resíduo de café e de solução de NaOH, numa proporção de 1:4 de resíduo para solução alcalina.

Foram também testadas extrações sequenciais sob as mesmas condições de tempo e temperatura descritas em B, utilizando a quantidade de resíduo diretamente obtida após extração sohxlet e com um volume de solução de NaOH correspondente a uma proporção de 1:4.



**Figura 8:** Esquema representativo do procedimento experimental A para a extração sequencial de polissacarídeos do resíduo de café previamente desengordurado.

#### 2.4.1. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Depois de cada extração com as soluções alcalinas o resíduo insolúvel foi separado por centrifugação a 24652 g, 15 min, 4 °C (Sigma, rotor 12159), seguindo-se uma filtração do extrato aquoso, através de um filtro de fibra de vidro (Filtros Anovia-GF/B).

Os extratos de KOH e NaOH foram acidificados a pH 5 com ácido acético glacial, (Carlo Erba, 99%), ou com uma solução de ácido clorídrico 37% (v/v). Os extratos foram concentrados e foi adicionado etanol até perfazer uma solução de etanol a 80% (v/v) de modo a ocorrer a precipitação dos polissacarídeos (insolúveis em etanol). O precipitado formado foi separado por centrifugação e posterior filtração com pressão reduzida utilizando um filtro de fibra de vidro (Filtros Anovia-GF/B).

No caso da extração sequencial A, os polissacarídeos foram solubilizados em água destilada, e evaporado o etanol proveniente da precipitação que pudesse ter ficado em solução. As soluções de polissacarídeos foram então congeladas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  procedendo-se posteriormente a uma liofilização das mesmas.

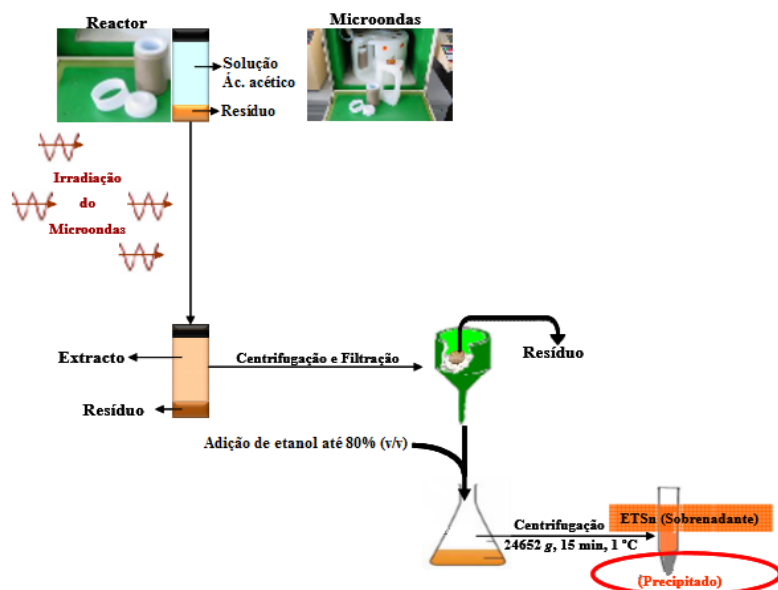
Na extração sequencial B, após centrifugação e filtração com pressão reduzida utilizando um filtro de fibra de vidro, os polissacarídeos foram lavados diretamente no filtro utilizando solventes orgânicos (acetona, etanol, ou éter de petróleo) procedendo-se posteriormente à sua secagem na estufa a  $40^{\circ}\text{C}$  ou à temperatura ambiente durante a noite.

Numa das extrações sequenciais utilizando NaOH, foi também testada a filtração imediatamente após a precipitação em etanol, não recorrendo a uma centrifugação prévia da solução contendo os polissacarídeos.

## **2.5. EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DO RESÍDUO DE CAFÉ POR MICRO-ONDAS (MW)**

Na tentativa de proceder à extração de polissacarídeos do resíduo de café em simultâneo com uma acetilação dos polissacarídeos extraídos recorreu-se a um tratamento hidrotérmico assistido por MW em condições semelhantes às utilizadas por *Passos et al*<sup>14</sup> com soluções de ácido acético de concentrações variáveis como solvente.

A figura 9 representa o esquema experimental do processo de extração de polissacarídeos do resíduo por tratamento hidrotérmico assistido por micro-ondas (MicroSYNTH Labstation for Synthesis).



**Figura 9:** Esquema representativo do sistema de extração e isolamento de polissacarídeos por MO

Foram realizados 3 ensaios distintos com 6 g de resíduo de café desengordurado em 60 mL de solução de ácido acético com concentrações de 0,1, 0,2 e 0,5M. O programa de temperaturas utilizado foi o seguinte: irradiação a 1000W durante 1min até 170°C, irradiação a 900W durante 3min até 200°C com estabilização a 200°C durante 3min. A temperatura e a pressão foram controladas durante a realização de cada experiência. Para cada experiência realizaram-se dois ensaios e o pH da solução foi medido antes e depois da extração por MO. Decorrido o tempo de extração, o extrato foi separado do resíduo por centrifugação (26452 g, 15 min, 4°C) e filtrado sob vácuo. Foi efetuada uma precipitação em etanol até 80 % (v/v) separando-se posteriormente o precipitado obtido (ppEtOH) do sobrenadante (SnEtOH) por filtração a vácuo utilizando um filtro de fibra de vidro (Filtros Anóia-GF/B). O material que ficou retido no filtro (ppEtOH) foi então dissolvido em água destilada e o etanol remanescente da precipitação prévia foi evaporado em pressão reduzida a 40°C. A solução foi então congelada e liofilizada. O sobrenadante (SnEtOH) foi evaporado em pressão reduzida a 40°C de modo a retirar o etanol em solução, sendo posteriormente armazenado.

Foi testada ainda uma segunda extração de polissacarídeos utilizando o resíduo de café remanescente da extração por MW com solução de ácido acético de 0,5M sob as mesmas



condições (60mL de solução de ácido acético de 0,5M com o mesmo programa de temperatura e pressão) seguindo o procedimento acima descrito.

## **2.5. SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DO SnEtOH SEGUNDO O SEU TAMANHO**

Foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular com o objetivo de separar os compostos presentes no SnEtOH obtido por extração com MW. A separação foi feita utilizando uma coluna de poliacrilamida (Bio-Gel P2 da BIO-RAD) com um diâmetro de 2,5 cm e 35 cm de altura. A coluna foi previamente montada e calibrada com dextrana azul (Mw = 2,00 kDa) e glucose (Mw = 180 Da).

Foi introduzido na coluna 1mL de SnEtOH previamente centrifugado (para eliminar algum precipitado que estivesse presente na solução), e eluído com água desgaseificada com o auxílio de uma bomba peristáltica com um fluxo de 0,5mL/min. A amostra eluída na coluna foi recolhida em tubos (3mL por tubo), tendo sido medida a condutividade e absorvância a 280, 325 e 405nm em cada tubo com o objetivo de diferenciar as frações obtidas.

## **2.6. ANÁLISE DOS AÇÚCARES NEUTROS COMO ACETATOS DE ALDITOL POR GC-FID**

A análise de açúcares neutros das amostras foi realizada recorrendo a uma hidrólise ácida dos polissacarídeos segundo o método descrito por Selvendran *et al.*<sup>72</sup> Posteriormente, os resíduos foram convertidos a acetatos de alditol (derivados voláteis e termoestáveis) por redução e acetilação dos mesmos, possibilitando a análise quantitativa e qualitativa dos resíduos de açúcar por GC-FID.

A hidrólise dos polissacarídeos foi efetuada em tubos de cultura com 2-3mg de amostra, dependendo da pureza das mesmas. Às amostras foram adicionados 200µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (m/m) deixando reagir por 3 h à temperatura ambiente. De seguida adicionou-se 1mL de água destilada (concentração final de ácido de 2 M), deixando-se a incubar num bloco de aquecimento a 120 °C durante 1h.

Terminada a hidrólise, os tubos foram arrefecidos em banho de gelo e adicionou-se 200µL da solução de padrão interno (2-desoxiglucose, 1 mg/mL). De seguida transferiu-se 1mL

de hidrolisado para novos tubos de cultura e neutralizou-se o ácido com 200µL de NH<sub>3</sub> a 25%. Adicionou-se 100µL de solução de NaBH<sub>4</sub> 15% (m/v) em NH<sub>3</sub> 3 M (agente redutor) preparada imediatamente antes de utilizar. A solução foi agitada e incubada num bloco de aquecimento a 30°C por 1 h. Os tubos foram arrefecidos em banho de gelo e o excesso de NaBH<sub>4</sub> foi eliminado por adição de duas alíquotas de 50µL de ácido acético glacial. De seguida foram transferidos 300µL de solução contendo os açúcares reduzidos para tubos de Sovirel, e colocaram-se os tubos em banho de gelo. A cada tubo foram adicionados 450µL de 1-metilimidazol e 3mL de anidrido acético, agitando muito bem e deixando reagir por 30 min num bloco de aquecimento a 30°C. Os acetatos de alditol formados foram isolados por extração líquido-líquido com 3mL de água destilada e 2,5mL de diclorometano, ficando os acetatos de alditol na fase orgânica e o excesso de anidrido acético na fase aquosa. Após agitação manual vigorosa, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 1 min, e a fase aquosa foi descartada por aspiração. À fase orgânica remanescente foram adicionados 3mL de H<sub>2</sub>O destilada e 2,5mL de diclorometano repetindo o processo de agitação vigorosa e centrifugação sob as mesmas condições, descartando novamente fase aquosa por aspiração. De seguida, a fase orgânica foi lavada com duas adições sucessivas de 3mL de água destilada intercaladas por agitação vigorosa, centrifugação e aspiração de fase aquosa. Na última aspiração a fase aquosa foi completamente removida, e a fase orgânica contendo os acetatos de alditol foi transferida para tubos de speedvac. As amostras foram concentradas até à secura num concentrador de amostras (speedvac), lavadas 2 vezes com 1mL de acetona anidra e concentradas novamente. Os acetatos de alditol foram depois diluídos em 50µL de acetona anidra para posterior análise por GC-FID.

Foi utilizado um cromatógrafo (Perkin Elmer – Clarus 400) com uma coluna capilar DB-225 (30 m comprimento, 0,25 mm de diâmetro, e 0,15 µm espessura) e uma fase estacionária composta por 50% de cianopropilfenil e 50% metilpolisiloxano. O volume de injeção foi de 2µL, com temperatura do injetor de 220°C e do detetor de 230°C. Utilizou-se hidrogénio como gás de arraste à pressão de 17 psi, uma atenuação de 6 e “split” de 10 min. Foi utilizado um programa de temperaturas com as seguintes condições: início a 200°C, rampa de 40°C/min até 220°C, estabilização a 220°C durante 7 min, rampa de 20°C/min até 230°C, e estabilização a 230°C durante 1 min.

Os acetatos de alditol foram identificados comparando os tempos de retenção com os padrões de referência. A quantificação dos acetatos de alditol identificados nas amostras foi correlacionada com a área do padrão interno 2-desoxi-D-glucose (técnica do padrão interno). Foram realizados 2 ensaios para cada amostra analisada.

## **2.7. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DOS COMPOSTOS CONSTITUINTES DAS FRAÇÕES F1 E F2**

Foi efetuado um estudo da determinação do peso molecular médio dos polissacarídeos extraídos por MO em meio contendo ácido acético recorrendo a uma cromatografia de exclusão molecular preparativa, por adaptação do método proposto por Evtuguin *et al.*<sup>73</sup>

Foram dissolvidos ~3 mg de cada amostra em 4mL de NaNO<sub>3</sub>, de modo a ter uma concentração final de ~0,7 mg/mL. As amostras foram filtradas e injetadas num sistema PL-GPC 110 (polymer Laboratories), protegido com uma pré-coluna PL aquagel-OH Guard 8 µm e equipado com duas colunas PL aquagel-OH MIXED 8 µm com 30 cm de comprimento e 7,5mm de diâmetro. Foi utilizado como eluente uma solução de NaNO<sub>3</sub> 0,1M com um fluxo de 0,9mL/min.

## **2.8. DETERMINAÇÃO DA ACETILAÇÃO DE PPETHOH DO MWB, F1 E F2**

Para a determinação do grau de acetilação foi utilizado o método HS-SPME-GC-FID descrito por Nunes *et al.*<sup>6</sup> Foi construída uma curva de calibração utilizando 5 padrões de ácido acético com concentrações entre os 6,25 e os 500mg/L, tendo sido calculadas as concentrações de grupos acetilo na amostra com base na mesma. Foi utilizada uma fibra revestida por três polímeros, nomeadamente, DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/ carboxeno/ polidimetilsiloxano).

Foram preparados 5 padrões de ácido acético com concentrações de 6.25, 12.5, 250, 375 e 500mg/L. Para cada padrão, foram transferidos 4mL de solução para um vial, e colocado num banho a 40°C durante 30min. A fibra de SPME foi exposta no vial durante 15 min a 40°C, absorvendo assim os compostos voláteis presentes no espaço de cabeça.

Foram pesados 2mg de amostra num tubo de cultura e adicionados 2,4mL de água destilada e 0,8mL de NaOH (2M). A reação decorreu durante 1h à temperatura ambiente de maneira a permitir a libertação dos grupos acetilo presentes nos polissacarídeos em solução. Posteriormente foram adicionados 0,8mL de HCl para parar a reação e acertou-se o pH a 2,0. A solução foi transferida para um *vial* e colocada num banho a 40°C durante 30 min com agitação constante. Inseriu-se a fibra no *vial*, permanecendo exposta durante 15 min a 40°C.

Foi utilizado um cromatógrafo Perkin Elmer – Clarus 400 com um *liner* SPME e uma coluna capilar DB-FFAP (30 m comprimento, 0,32 mm de diâmetro, e 0,25 µm espessura) com uma fase estacionária composta por ácido polietilenoglicol modificado. A fibra foi exposta durante 3 min no injetor do cromatógrafo a uma temperatura de 250°C e foi utilizado um programa de temperaturas com as seguintes condições: início a 50°C, rampa de 5 °C/min até 65 °C, rampa de 20 °C/min até 185 °C, rampa de 35 °C/min até 220 °C com estabilização a 220 °C durante 1 min.

## **2.9. ESTUDO DA ATIVIDADE IMUNOESTIMULADORA DAS FRAÇÕES F1 E F2**

Foram realizados dois estudos de atividade imunoestimuladora para os polissacarídeos obtidos por extrações alcalinas e por extração com MO em ambiente ácido. Um dos estudos foi precedido de uma descontaminação da amostra de modo a eliminar falsos positivos por ativação das células B e T por contaminantes externos, enquanto o segundo estudo não foi precedido de qualquer procedimento de descontaminação da amostra.

### **2.9.1. DESCONTAMINAÇÃO DO GEL**

Para cada fração de 2,5mL de gel polimixina B foram adicionados 10mL de água mili-Q (desionizada e autoclavada) e centrifugou-se a 3000 rpm durante 5min. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se 5mL de desoxicolado de modo a eliminar as contaminações e adicionou-se 10mL de água mili-Q. A solução foi centrifugada a 3000 rpm durante 5 min, o sobrenadante descartado, e adicionados 5mL de PBS. Efetuou-se uma nova centrifugação a 3000 rpm durante 5 min e descartando-se posteriormente o sobrenadante.

### **2.9.2. DESCONTAMINAÇÃO DA AMOSTRA**

Foi preparada uma solução com concentração de 1mg/mL de amostra em tampão fosfato salino (PBS). A solução foi centrifugada a 3000 rpm durante 5min, com o objetivo de evitar a contaminação do gel com algum precipitado presente na solução (passo particularmente importante em amostras com baixa solubilidade em PBS). Paralelamente foram colocados 500  $\mu$ L de gel polimixina B num tubo de *falcon*, adicionados 10 mL de PBS e centrifugou-se a 3000 rpm durante 5 min, descartando-se o PBS após a centrifugação. Foi adicionado 1mL da solução de amostra ao gel polimixina B, ficando a solução a incubar durante 30 min com agitação. Efetuou-se uma nova centrifugação seguida da recolha do sobrenadante (fração que contem a amostra descontaminada). Colocou-se 100 $\mu$ L de sobrenadante num tubo de cultura de modo a efetuar uma análise de açúcares neutros e o restante foi colocado num eppendorf, e armazenado na câmara de fluxo laminar para posterior análise de atividade imunoestimuladora.

### **2.9.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS B E T DO BAÇO DO RATINHO**

Para o estudo da ativação das células B e T do baço do ratinho recorreu-se à técnica de citometria de fluxo, onde células do baço foram incubadas com diferentes soluções de polissacarídeos extraídos do resíduo de café. Foram utilizados marcadores de fluorescência associados a anticorpos anti-CD69, anti-B220 e anti-CD3 de maneira a distinguir células ativadas e não ativadas, assim como distinguir as células B das T.

Foi preparada uma suspensão de células esplénicas de ratinhos por homogeneização do baço em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com antibióticos e soro bovino. Após centrifugação, o sobrenadante contendo as células viáveis para o estudo de atividade imunoestimuladora foi recolhido.

Numa placa de cultura ELISA de 96 poços foram adicionados 100 $\mu$ L de solução de células em cada poço ( $10^6$  células/poço) e foram adicionados, em duplicado, 50 $\mu$ L de RPMI (controlo negativo), 2 $\mu$ L de LPS em 48 $\mu$ L de RPMI (controlo positivo), e 50 $\mu$ L de amostras com concentração de açúcares entre os 58,6 e os 690 $\mu$ g/mL. O volume final de todos os poços foi preenchido a 200 $\mu$ L por adição de 50 $\mu$ L de meio RPMI, totalizando uma concentração de

amostra final no poço entre os 14,7 e os 172,5µg/mL. Todo o processo foi realizado numa câmara de fluxo laminar de modo a minimizar a probabilidade de falsos positivos por contaminação externa das amostras.

A placa foi incubada durante 17 h numa estufa a 37°C com atmosfera humidificada e CO<sub>2</sub> controlado (5 %). Decorrida a incubação, a placa foi centrifugada e o sobrenadante descartado. Para detetar as células ativas por citometria de fluxo, procedeu-se à marcação prévia das células com anticorpos associados a fluorocromos. Dependendo do tipo de células foram preparadas soluções de diferentes anticorpos em tampão *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) para coloração da superfície. Para marcar linfócitos B foram adicionados anticorpos monoclonais anti-B220 e para avaliar a ativação de células adicionou-se anti-CD69, um marcador precoce de ativação. A cada poço da placa ELISA foram adicionados 25µL das 2 soluções de marcadores. Após 20 min de incubação no escuro à temperatura ambiente foram adicionados aos poços 150µL de tampão FACS procedendo-se à centrifugação da placa a 15000 rpm durante 7 min descartando-se posteriormente o sobrenadante contendo células mortas e anticorpos que não reagiram. Foram adicionados 25µL do fluorocromo PE-Cy5 que liga ao marcador anti-CD69 e após incubação durante 15 min, suspenderam-se as células marcadas em 150µL de tampão FACS, e o conteúdo de cada poço foi transferido cuidadosamente para tubos de citómetro, aos quais foram adicionados 600µL de tampão FACS, e feita análise por citometria de fluxo.

Todo o procedimento foi efetuado em colaboração com o Professor Manuel Vilanova no laboratório de imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS).

# Capítulo III – Resultados e Discussão

## 3.1. EXTRAÇÃO DE CAFEÍNA

Esta extração teve como o objetivo, verificar quais os compostos extratáveis utilizando água e etanol, dois solventes polares, misturados numa proporção de 1:1. Sabendo de antemão que a cafeína é um dos compostos passíveis de serem extraídos nestas condições, o objetivo passou também por verificar se a cafeína seria extraída com um grau de pureza assinalável e, em caso de isso não acontecer, quais os demais compostos que poderiam ser extraídos através deste método.

O rendimento, em termos de massa extraída, foi de 4,71% (m/m). Este extrato foi posteriormente analisado quanto à sua composição em termos de cafeína e açúcares.

### 3.1.1. QUANTIFICAÇÃO DE CAFEÍNA

O extrato obtido por extração EtOH/água, foi analisado por HPLC de modo a quantificar a cafeína extraída do resíduo de café. A quantificação de cafeína por HPLC indica que foi extraída alguma cafeína (0,0824g) tendo sido obtido um rendimento de 0,038% (m/m). Tendo em conta que a literatura reporta uma quantidade de cafeína presente no resíduo de café correspondente a 0,0225%<sup>13</sup> da sua massa, podemos afirmar que as condições de extração utilizadas são adequadas para extrair toda a cafeína “disponível” no resíduo de café. Apesar da impureza do extrato obtido, a completa extração da cafeína do resíduo de café é bastante importante, pois tendo em conta que a utilização do mesmo como fertilizante é um método muito utilizado por agricultores, permite debelar a ecotoxicidade associada ao resíduo de café que a cafeína lhe confere<sup>2</sup>. Segundo a literatura, parte da cafeína presente no resíduo encontra-se dentro dos vacúolos das células do grão de café, formando complexos com ácidos clorogénicos.<sup>74</sup> Esta formação de complexos entre a cafeína e os ácidos clorogénicos associada à localização dos mesmos pode dificultar a extração da cafeína do resíduo de café.

### 3.1.2. QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES NO EXTRATO E SUA COMPOSIÇÃO

Após uma análise de quantificação de açúcares ao extrato obtido por extração EtOH/água, foi possível verificar que 7,64% (m/m) do extrato extraído utilizando uma solução EtOH/água, corresponde a açúcares.

Como podemos verificar na figura 10, os resíduos de monossacarídeos mais abundantes, de entre os que se encontram no extrato, são a arabinose (26,3%), a manose (5,4%), a galactose (50,1%), a glucose (10,4%) e a fucose (5,3%). Este perfil de açúcares mostra que nas condições de extração utilizadas (50% de EtOH) existem arabinogalactanas que se dissolvem, o que não é anormal dado que existem arabinanas que são solúveis em soluções com uma percentagem de etanol muito superior,<sup>75</sup> dado que os polissacarídeos do resíduo de café são pouco solúveis e as condições de extração não foram extremas o suficiente extrair polissacarídeos.

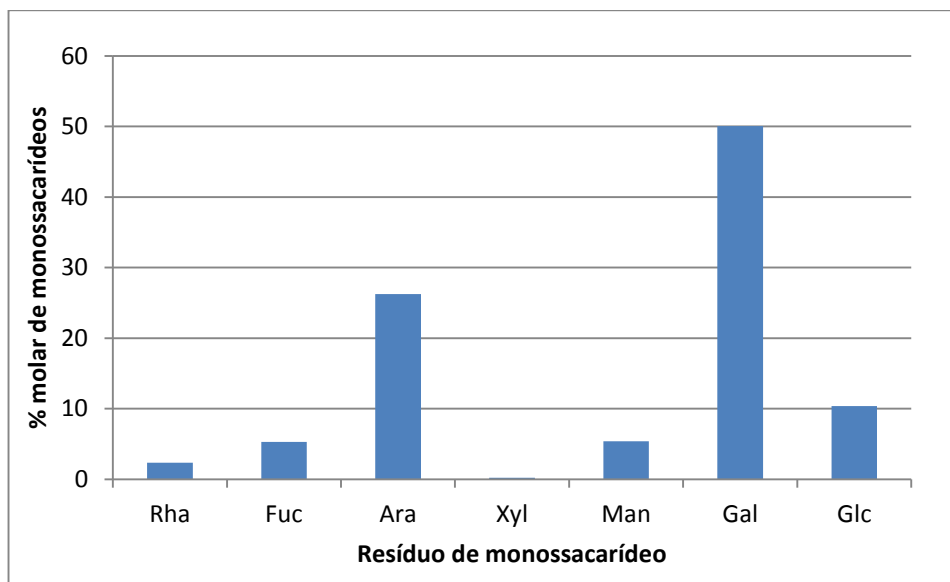


Figura 10: Abundância relativa (% molar) de açúcares no extrato obtido por extração EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1)

### 3.2. ÓLEO DE CAFÉ

De acordo com a literatura, o óleo de café corresponde a aproximadamente 15% (m/m)<sup>13</sup> da composição do resíduo de café. Procedeu-se a um estudo de otimização da extração deste



óleo com base no método de Soxhlet. Foi escolhido o método de Soxhlet por ser um método já bastante utilizado a nível industrial na extração de óleos de diversas matrizes vegetais e com processos já bastante otimizados sendo um método de relativo baixo custo e alta eficiência.<sup>36</sup> O desafio passa pela adaptação e otimização deste método para um novo substrato, neste caso o resíduo de café.

Foram efetuados testes para determinar quais as condições ideais de extração do óleo de café utilizando o método de Soxhlet. Foram efetuados testes para aferir qual o tempo mínimo necessário para extrair a totalidade, ou quase totalidade do óleo do resíduo de café, sabendo que o óleo de café corresponde a aproximadamente 15% da massa do resíduo de café.<sup>13</sup>

Como é possível verificar pela análise à tabela 3, foram efetuadas extrações Soxhlet com 3 tempos de extração (1h, 2h e 4h). Os resultados obtidos indicam que a quantidade extraída em 2h é semelhante à quantidade extraída em 4h, e semelhante à quantidade de óleo presente no resíduo de café. Consideramos portanto que uma extração de 2h utilizando o método de Soxhlet é o suficiente para a extração da totalidade do óleo de café.

**Tabela 3:** Percentagens de extração de óleo de café do resíduo de café utilizando diferente tempos de extração (1h, 2h e 4h) e diferentes tamanhos de partículas do resíduo de café (pó e pastilhas).

Amostra	Tempo de extração/Rendimento		
	1h	2h	4h
<b>Res. Húmido</b>	7,4 ± 0,36%	15,88 ± 0,83%	15,03 ± 0,36%
<b>Res. seco</b>	-	12,84 ± 0,12%	-
<b>2h (pastilhas)</b>	-	14,37 ± 0,28%	-

Foi ainda testado se a percentagem de humidade do resíduo de café tem algum impacto no rendimento de extração do óleo de café. Foi calculada uma percentagem de humidade inicial do resíduo de 61,4% (resíduo húmido). Depois de se proceder à secagem de uma porção de resíduo de café na estufa durante 5h, o mesmo ainda apresentava uma percentagem de humidade de 8%, sendo daqui em diante utilizada a nomenclatura de resíduo seco para este resíduo com 8% de humidade. Foi possível constatar que numa extração utilizando resíduo de café húmido verifica-se um rendimento de extração um pouco superior quando comparado com o resíduo seco. Isto, muito provavelmente deve-se ao facto das partículas de resíduo de café, devido à

presença da água, estejam mais dispersas entre si, permitindo uma passagem muito mais uniforme do solvente pela matriz do resíduo de café devido à existência de um maior espaço intersticial entre partículas de resíduo. Utilizando resíduo seco as partículas vão estar mais compactas entre elas e o solvente tem mais dificuldade em passar pelo resíduo, criando canais preferenciais de passagem de solvente em zonas de menor compactação do resíduo. Esses canais preferenciais serão constantemente utilizados como local de passagem do solvente devido à menor resistência à sua passagem nesses locais, fazendo com que o resíduo não seja uniformemente embebido pelo solvente durante a extração e conseqüentemente diminuindo a quantidade de óleo extraído.

A utilização de resíduo de café húmido, e tendo em consideração o facto de o volume do cartucho de Soxhlet utilizado ser fixo, implica que mais de metade da massa do resíduo colocado no cartucho corresponde a massa de água. Temos então que, considerando um volume arbitrário fixo, em termos de base seca, utilizando resíduo com uma percentagem de humidade de 61,4% implica uma massa, apenas de resíduo, muito inferior à massa de resíduo seco no mesmo cartucho. Concretamente, temos que utilizando 50g de resíduo seco é possível extrair ~6g de óleo enquanto as mesmas 50g de resíduo húmido permite extrair apenas 3,07g de óleo. Torna-se portanto mais vantajoso utilizar resíduo seco nas extrações pois apesar do rendimento ser um pouco baixo do que se verifica quando é usado resíduo húmido, tendo em conta que a capacidade do cartucho é fixa, é possível extrair uma maior quantidade de óleo utilizando resíduo seco. Por outro lado poderíamos aumentar a quantidade de óleo extraído prolongando a extração por mais tempo, de modo a obter rendimentos semelhantes aos verificados com a utilização de resíduo húmido.

Na tentativa de ultrapassar o fenómeno de agregação de partículas de resíduo de café no sistema de Soxhlet verificado a nível industrial aquando da utilização de material com partículas finas,<sup>43</sup> como é o caso do resíduo de café, decidimos transformar o resíduo de café seco (8% de humidade) em pastilhas com o auxílio de uma prensa manual (Figura 11), transformando o resíduo de café num material relativamente resistente à extração Soxhlet e tornando a diferença entre tamanho das partículas de resíduo de café mais baixa por aglomeração das partículas de café em pastilhas de dimensões idênticas.<sup>41</sup> As pastilhas apresentavam uma massa de 1,0 -1,3g e o resíduo de café utilizado para fazer as pastilhas tinha uma percentagem de humidade de 8%

(m/m). Esta percentagem de humidade é importante para permitir que o resíduo de café se mantenha agregado, e por sua vez as pastilhas tenham a consistência necessária para suportar uma extração Soxhlet.



**Figura 11:** Pastilhas de resíduo de café feitas utilizando uma prensa manual no interior de uma montagem Soxhlet.

Foi efetuada uma extração de 2h, tempo anteriormente tido como o mais adequado para a extração, tendo em conta a premissa de minimização do custo do processo para o mínimo indispensável sem afetar a sua eficácia.

Os resultados indicam que em termos de quantidade de óleo extraída não existe grande diferença entre resíduo normal sem estar sob a forma de pastilhas e o resíduo em forma de pastilhas. O rendimento é um pouco inferior no caso das pastilhas de café ( $14,37\% \pm 0,28$ ) por comparação com a utilização de resíduo húmido ( $15,88 \pm 0,83\%$ ), mas em termos de rentabilidade do processo, um possível aumento do tempo de extração, de maneira a extrair mais 1% (m/m) de óleo do resíduo de café, na prática, não se justifica.

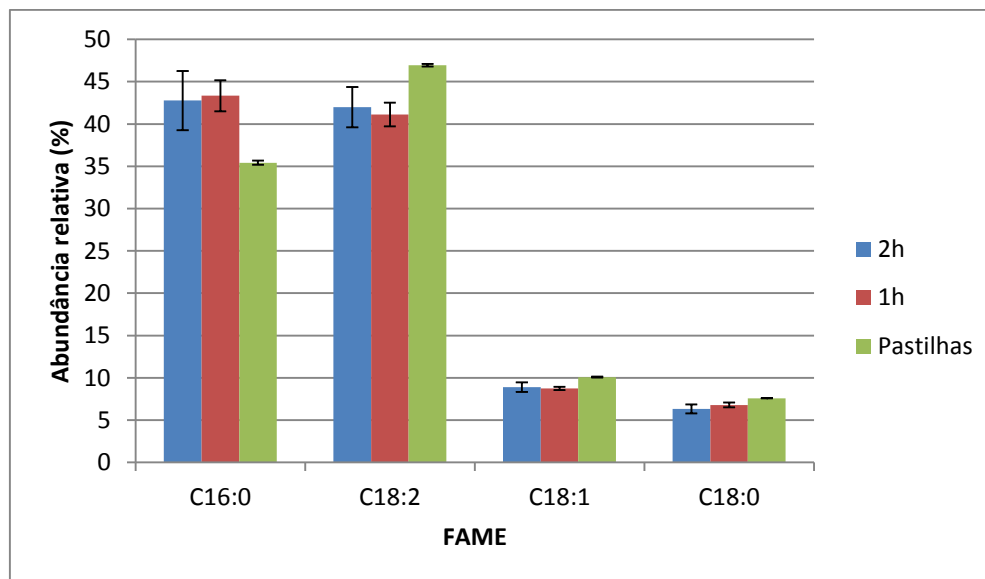
Comparando os rendimentos da extração usando resíduo de café seco em pastilhas e sem ser em pastilhas, verificamos que o rendimento da extração utilizando pastilhas é um pouco superior ao rendimento da extração utilizando resíduo seco sem ser em pastilhas ( $12,84 \pm 0,12\%$ ). A razão para este aumento de rendimento passa pelo facto de o resíduo de café se encontrar mais compacto do que nos ensaios anteriores, deve-se ao maior espaço existente para o solvente, fazendo com que as pastilhas, apesar de mais compactas, estejam continuamente em contacto com o solvente durante o tempo de extração, não havendo assim a criação de canais preferenciais de passagem de solvente como se verificava utilizando resíduo seco. No final da extração, apesar de todas as pastilhas estarem intactas, elas eram muito mais frágeis ao toque havendo algum desgaste nas bordas das mesmas. Este facto indica que o solvente penetrou nas pastilhas por estar em contacto contínuo com as mesmas durante todo o período de extração, contrariando assim a possível dificuldade de penetração do solvente no resíduo devido ao aumento da compactação do mesmo.

De ressaltar que neste trabalho as pastilhas foram feitas com uma pequena prensa manual, mas a nível industrial as prensas utilizadas são muito mais eficientes, aplicando uma pressão muito superior, o que implica em teoria, que a resistência e coesão das pastilhas produzidas por prensas industriais seriam muito superiores ao verificado nos testes efetuados laboratorialmente. Seria ainda assim necessário efetuar um estudo utilizando pastilhas produzidas a nível industrial para verificar se, aumentando ainda mais a coesão das pastilhas, os rendimentos de extração seriam afetados.

### **3.2.1. COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS DE CAFÉ**

Tendo em conta que os TAG são os compostos maioritários, foi feito um estudo à composição de TAG do óleo extraído para tentar perceber se tempos de extração diferentes implicam uma composição em termos de TAG diferente no óleo de café.

A análise à composição do óleo extraído em termos de TAG foi feita tendo em conta os existentes em maior abundância nas amostras analisadas (C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2) (Figura 12).



**Figura 12:** Abundância relativa (% molar) de TAG do óleo de café obtido por diferentes condições de extração (1h e 2h com o resíduo húmido e 2h com o resíduo em pastilhas).

Numa análise preliminar, é possível verificar que em termos de composição dos óleos extraídos existem algumas diferenças, embora o perfil de TAG seja muito semelhante independentemente do tempo de extração e da transformação do resíduo de café em pastilhas, sendo a variação de maior relevo ao nível da percentagem de C18:2. Na extração em que foi utilizado resíduo de café em pastilhas, o óleo resultante apresenta uma maior percentagem de C18:2 (ácido linoleico) e uma menor percentagem de C16:0 (ácido palmítico) em relação às extrações com o resíduo em pó. Tendo em conta que o ácido linoleico é bastante importante para o organismo por entrar na biossíntese de prostaglandinas,<sup>28</sup> o facto de ser extraído em maiores quantidades quando são utilizadas pastilhas de resíduo de café dá origem a um óleo de café com maior potencial comercial.

**Tabela 4:** Análise comparativa da abundância relativa de TAG entre este trabalho e trabalhos anteriores utilizando o mesmo método utilizado neste trabalho e utilizando outros métodos de extração do óleo de café.<sup>38,76</sup>

		<b>FAME</b>			
<b>Método de extração</b>		C16:0 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)
<b>de Melo et al</b>	SCE	37,48	6,02	9,53	44,52
<b>de Melo et al</b>	Soxhlet (n-hexano)	37,37	7,07	8,63	44,67
<b>Calligaris S. et al</b>	CHCl3/MetOH	34,30	6,50	8,50	46,10
<b>Este trabalho</b>	Soxhlet (n-hexano)	35,40	7,60	10,10	46,90

Foi efetuado ainda um estudo comparativo da composição de TAG dos óleos obtidos por diferentes métodos de extração (tabela 4), sendo possível verificar que, tendo em conta os TAG majoritários (C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2), a composição dos óleos é muito semelhante independentemente do método de extração utilizado, o que indica que nenhum dos métodos analisados na literatura tem uma especificidade maior ou menor para um TAG específico.

### **3.3. EXTRAÇÃO DE MATERIAL DE ALTO PESO MOLECULAR (HMWM)**

Foram efetuados vários testes de otimização da extração de material de alto peso molecular (HMWM), sendo o maior enfoque dado aos polissacarídeos passíveis de serem extraídos pelo seu potencial como moléculas bioativas. Foram efetuadas extrações utilizando dois métodos de extração: extrações alcalina com diferentes solventes alcalinos (NaOH e KOH) a diferentes condições de temperatura (80°C e T. amb) e extrações utilizando um solvente ácido (solução de ácido acético) em diferentes concentrações (0,1M, 0,2M e 0,5M) e com o auxílio de micro-ondas (MW).

#### **3.3.1. EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS ALCALINAS (KOH)**

Os resultados obtidos nas extrações sequenciais indicam-nos que a primeira extração alcalina é a mais eficaz, apresentando um rendimento de extração de HMWM de 12,17%. À medida que continuamos a extrair HMWM do resíduo com contínuas extrações sequenciais sob as mesmas condições, o rendimento de extração vai sendo cada vez menor, como podemos

verificar na tabela 5, onde a segunda e terceira extrações apresentaram um rendimento de 8,32% (m/m) e 7,16% (m/m) respetivamente. O decréscimo de rendimento verificado de extração em extração deve-se ao facto de à medida que o HMWM vai sendo extraído, o resíduo remanescente vai ficando empobrecido de HMWM o que significa menos HMWM para extrair, logo, o rendimento vai sendo constantemente menor. Além disso, o HMWM que fica no resíduo após cada extração é material de mais difícil extração, como galactomananas e a celulose que necessitam de condições de extração mais rigorosas.<sup>60</sup> Contabilizando a totalidade das extrações efetuadas, foi possível extrair 27,65% (m/m) de HMWM do resíduo de café.

**Tabela 5:** Rendimentos de extração obtidos na extração sequencial em meio alcalino utilizando KOH tendo em conta o material precipitado e os açúcares presentes nesse material.

	% de precipitado	% de pureza do estrato	% de açúcares extraídos
<b>P1KOH</b>	12,17	19,45 ± 0,16	2,37
<b>P2KOH</b>	8,32	41,51 ± 0,28	3,46
<b>P3KOH</b>	7,16	23,33 ± 0,06	1,67
<b>TOTAL</b>	27,65	-	6,68

### 3.3.1.1. PUREZA E COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS PPÉTOH EM TERMOS DE POLISSACARÍDEOS

Analisando a pureza do extrato, verificamos que estamos na presença de extratos bastante impuros, pois a percentagem de polissacarídeos presentes no extrato é de 19,45 ± 0,16 % (m/m) para o P1KOH, 41,51 ± 0,28% para o P2KOH e 23,33 ± 0,06% para o P3KOH.

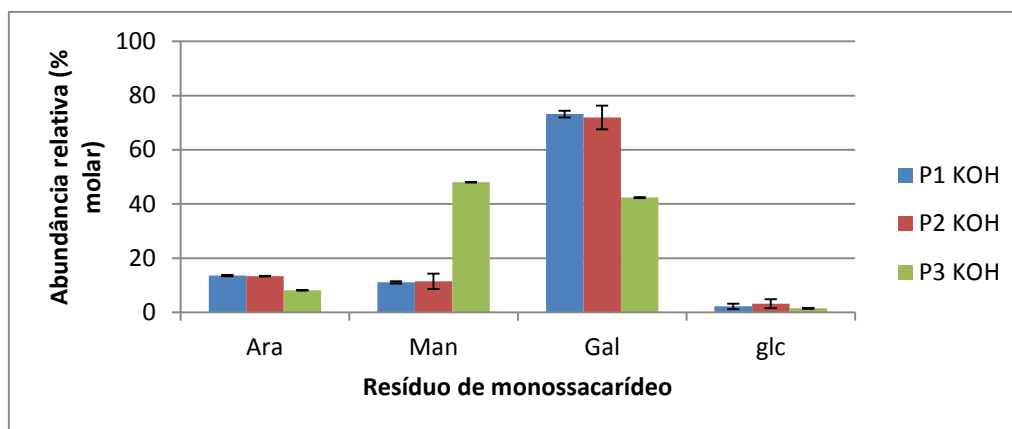
O baixo grau de pureza do extrato P1KOH deve-se ao facto de, como a extração utilizando solventes alcalinos não é específica apenas para extração de polissacarídeos, mas sim para todo o HMWM presente no resíduo (polissacarídeos, proteínas, e compostos castanhos), existe no extrato uma panólia de compostos que foram extraídos nas condições de extração utilizadas. Na segunda extração, como uma grande parte de HMWM mais solúvel que os polissacarídeos foi previamente extraído, existe uma maior percentagem de polissacarídeos do

que de outro HMWM, levando a um aumento de pureza do primeiro extrato (P1KOH) para o segundo (P2KOH). Já na terceira extração, o mesmo não se verifica, pois a percentagem de polissacarídeos no extrato obtido (P3KOH) é menor do que a verificada em P2KOH. Neste caso o que poderá estar a acontecer é que os polissacarídeos que permaneceram no resíduo remanescente da segunda extração são de extração mais difícil, logo, a quantidade de polissacarídeos extraídos é mais baixa por comparação com a quantidade de outras macromoléculas extraídas. A pureza do extrato da terceira extração em termos de polissacarídeos passa assim a ser mais baixa do que o que seria esperado à partida.

Tendo em conta o objetivo primário, que seria a extração de polissacarídeos, o rendimento de extração global obtido ao cabo de 3 extrações sequenciais é relativamente baixo (6,68%), considerando a quantidade de açúcares presente no resíduo de café (65,9% (m/m)) indicando que a utilização de KOH como agente alcalino nas condições de extração utilizadas, não será uma opção muito viável. Simões et al utiliza nas suas extrações concentrações de agente alcalino de 4M á temperatura ambiente, condições de alcalinidade bem superiores às utilizadas neste trabalho. Mesmo com uma temperatura elevada, tentando assim minimizar o efeito da diminuição da concentração de KOH utilizado na extração, não foram obtidos resultados significativos de rendimento de extração. As condições de extração utilizadas neste trabalho, não são drásticas o suficiente para extrair grandes quantidades de HMWM.

Em termos de composição dos extratos obtidos através da extração alcalina sequencial é possível verificar que nas primeiras 2 extrações temos uma composição de açúcares no extrato muito semelhante entre elas considerando os açúcares maioritários presentes na amostra (arabinose (Ara), manose (Man), galactose (Gal) e Glucose (Glc)) (Figura 13).





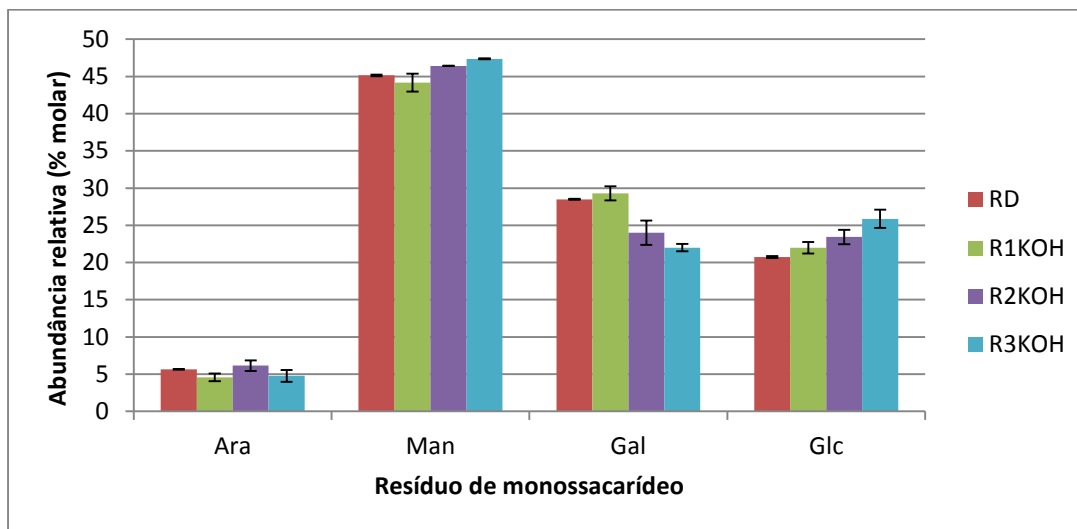
**Figura 13:** Abundância relativa (% molar) de açúcares nos diferentes extratos obtidos por extração sequencial em meio alcalino utilizando KOH. (Legenda: arabinose (Ara), manose (Man), galactose (Gal) e Glucose (Glc).)

O perfil de açúcares verificado nos extratos das 2 primeiras extrações indica-nos que os polissacarídeos extraídos são maioritariamente arabinogalactanas e muito poucas galactomananas (Man/Gal na 1ª e 0,15 e 0,21 na 2ª). Os ~3% correspondentes à percentagem de glucose devem-se a resíduos de glucose presentes no terminal redutor da cadeia principal das galactomananas em ligação  $\beta(1\rightarrow4)$ .<sup>57</sup> Isto vai de encontro ao esperado, dado que as arabinogalactanas são polissacarídeos menos estáveis estruturalmente e portanto, de mais fácil extração, ao invés das galactomananas, que são polissacarídeos mais estáveis e de mais difícil extração.

Na terceira extração, verificamos um perfil de resíduos de monossacarídeos do extrato bastante diferente do verificado nas primeiras 2 extrações. Neste extrato temos uma quantidade de manose bastante superior ao verificado nas 2 primeiras extrações, a quantidade de galactose baixa drasticamente e também a arabinose sofre um decréscimo significativo. Isto indica, ao contrário do que verificamos nas 2 primeiras extrações, que neste extrato temos uma quantidade de galactomananas bastante mais significativa e o rácio Man/Gal calculado (1,13) demonstra-nos isso mesmo, sendo este um rácio muito superior ao verificado nas extrações anteriores.

Pela análise do perfil de açúcares dos extratos das extrações alcalinas com KOH que as galactomananas (polissacarídeo maioritário do resíduo de café) são extraídas em baixas quantidades sob as condições de extração utilizadas.

Foi efetuada uma análise aos resíduos remanescentes das extrações alcalinas utilizando KOH de modo a fazer uma análise comparativa entre o que é extraído e o que permanece no resíduo (Figura 14).



**Figura 14:** Monitorização da abundância relativa (% molar) de açúcares nos resíduos intermediários da extração sequencial em meio alcalino utilizando KOH. (Legenda: arabinose (Ara), manose (Man), galactose (Gal) e Glucose (Glc))

A composição dos resíduos intermediários mantém-se relativamente igual à medida que se efetuam extrações alcalinas sequenciais. Isto indica que apesar de ao longo das extrações o resíduo ficar mais pobre em quantidade absoluta de açúcares, em todas as extrações é retirada a mesma percentagem relativa de cada monossacarídeo. Isto indica que as condições de extração utilizadas não são específicas para nenhum polissacarídeo. O ligeiro aumento na percentagem relativa de manose e o ligeiro decréscimo da percentagem relativa de galactose ao longo das extrações, revela que apesar de ocorrer uma extração relativamente igual em termos de monossacarídeos as arabinogalactanas (maioritariamente compostas por galactose) são extraídas em maior quantidade que as galactomananas (maioritariamente compostas por manose). A percentagem relativa de glucose sofre um pequeno aumento à medida que são efetuadas extrações alcalinas, o que seria de esperar, dado que a celulose (polímero composto por monómeros de glucose), é de difícil extração por ser uma macromolécula muito estável e que portanto, permanece no resíduo excedentário após as extrações efetuadas.

### 3.3.2. EXTRAÇÃO SEQUENCIAIS ALCALINAS (NAOH)

Fazendo duas extrações sequenciais observamos um rendimento global de extração apenas de polissacarídeos de 9,17% (tabela 6). São rendimentos satisfatórios tendo em conta que foram efetuadas apenas 2 extrações utilizando o mesmo resíduo sequencialmente, por oposição às 3 extrações sequenciais utilizando o KOH. Verifica-se um rendimento superior na primeira extração em todos os casos, o que seria de esperar dado que a primeira extração é a que tem um maior impacto, na medida em que quase todo o material de mais fácil extração é extraído primeiro, ficando no resíduo remanescente material relativamente mais difícil de extrair. Isto aplica-se quer analisando a extração de HMWM (% precipitado) quer analisando a extração apenas de açúcares.

**Tabela 6:** Rendimentos de extração obtidos nas extrações sequenciais em meio alcalino utilizando NaOH tendo em conta o material precipitado e os açúcares presentes nesse material.

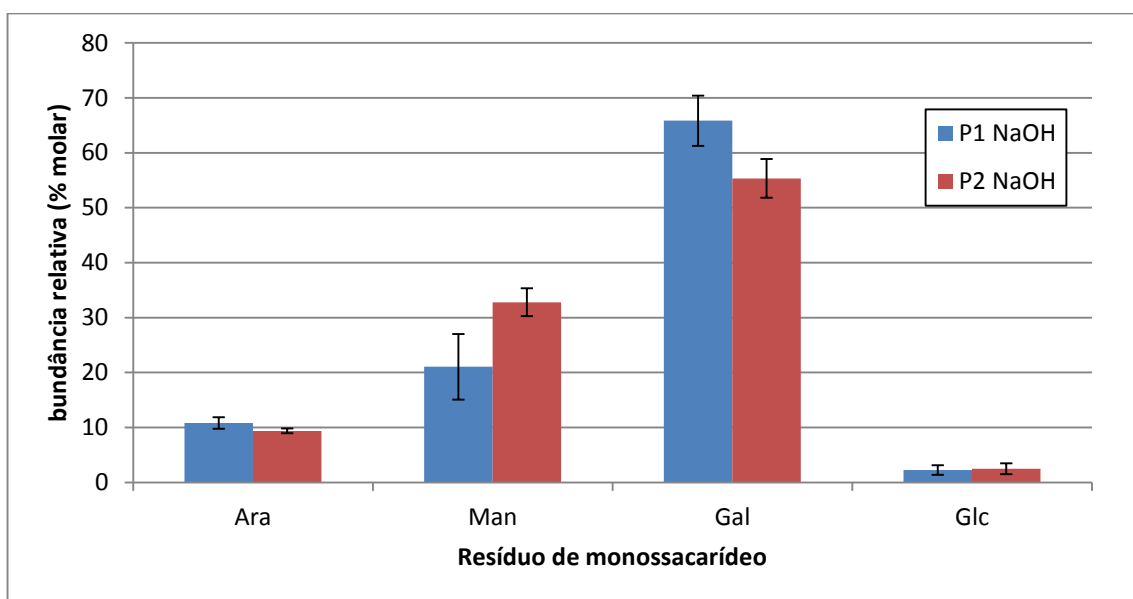
	<b>% precipitado</b>	<b>% açúcares extraídos</b>
<b>P1NaOH</b>	13,67 ± 1,16	5,84 ± 0,40
<b>P2NaOH</b>	5,18 ± 0,14	3,33 ± 0,09
<b>Total</b>	18,85	9,17

É possível verificar pela análise comparativa da tabela 5 (rendimentos de extração utilizando KOH) da tabela 6 que a utilização de NaOH para a extração de HMWM, mais particularmente de polissacarídeos, parece ser vantajosa.

#### 3.3.2.1. COMPOSIÇÃO E PUREZA DOS EXTRATOS PPÉTOH EM TERMOS DE POLISSACARÍDEOS

Analisando o perfil de açúcares obtido para as duas extrações efetuadas em ambiente alcalino utilizando uma solução de NaOH como solvente (Figura 15), verificamos que existe uma pequena diferença entre o perfil de P1NaOH e P2NaOH, sendo de pouca relevância. O extrato da primeira extração revela um perfil de açúcares muito semelhante ao anteriormente verificado em P1KOH e característico da presença, maioritariamente, de arabinogalactanas, facilmente verificado pela elevada quantidade relativa de galactose por comparação com a manose, o que não implica que não tenham sido extraídas também algumas galactomananas,

embora numa quantidade muito mais baixa (rácio Man/Gal de 0,32). Já em P2NaOH já podemos verificar um pequeno aumento na quantidade de manose e decréscimo na quantidade de galactose indicativo do decréscimo da quantidade de arabinogalactanas e aumento da quantidade de galactomananas (rácio Man/Gal de 0,59), indicando que neste extrato existe uma mistura destes dois polissacarídeos mas numa percentagem muito mais equilibrada quando comparado com P1NaOH.



**Figura 15:** Média da abundância relativa (% molar) de açúcares nos extratos obtidos por extração em meio alcalino utilizando NaOH. (Legenda: arabinose (Ara), manose (Man), galactose (Gal) e Glucose (Glc))

Verificamos que apesar do aumento de rendimento de extração verificado nestas extrações por comparação com as extrações com KOH, as condições de extração ainda não são suficientemente drásticas para extrair galactomananas em quantidades razoáveis. Sendo as galactomananas um polissacarídeo com atividade imunoestimuladora comprovada quando acetiladas, seria importante a sua extração de modo, tendo em conta o objetivo de valorização do resíduo de café.

Fazendo uma comparação entre os rendimentos de extração em meio alcalino utilizando soluções de KOH e NaOH (Tabela 7), verificamos uma eficácia de extração claramente superior utilizando NaOH como agente alcalino. O rendimento total de extração apenas de polissacarídeos (não contabilizando outras macromoléculas extraídas) utilizando KOH em 3

extrações sequenciais sob as mesmas condições (1h a 80°C) foi de 6,68% enquanto que com apenas duas extrações utilizando o NaOH como agente alcalino (1ª extração de 1h a 80°C e 2ª extração overnight à temperatura ambiente) foi obtido um rendimento de extração de polissacarídeos de 8,86%. Isto mostra que com menos extrações sequenciais e sendo que numa delas não foi utilizada uma temperatura elevada, a solução de NaOH é claramente mais eficaz na extração de polissacarídeos do resíduo de café.

**Tabela 7:** Tabela comparativa entre rendimentos de extração de açúcares, obtidos utilizando KOH e NaOH como agente alcalinizantes do meio.

	<b>P1KOH</b>	<b>P2KOH</b>	<b>P3KOH</b>	<b>P1NaOH</b>	<b>P2NaOH</b>
<b>% de açúcares extraídos</b>	2,37	3,46	1,67	13,67	5,84
<b>Rendimento total (%)</b>		6,68			9,17

De salientar que não existem réplicas para as extrações KOH, tendo sido apenas realizada uma extração sequencial tripla utilizando o KOH como agente alcalino. Já as extrações sequenciais duplas utilizando NaOH como agente alcalino foram efetuadas em triplicado. Isto pode estar a condicionar os resultados obtidos para os rendimentos da extração alcalina utilizando KOH, portanto a análise comparativa efetuada não é definitiva.

Ainda assim, em nenhum dos casos, as condições de extração foram suficientemente drásticas de modo a extrair a maioria dos polissacarídeos presentes no resíduo de café.

### **3.3.3. RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS (MW)**

Apesar da extração com o auxílio de micro-ondas (MW) ter sido feita em duplicado, ao tratar os dados obtidos foi possível verificar que os mesmos não poderiam ser tratados como réplicas do método. É possível verificar que os valores calculados para a percentagem de precipitado obtido (% ppEtOH) e de percentagem de material que ficou no sobrenadante da precipitação efetuada (% SnEtOH) são bastante discrepantes. A razão proposta para esta discrepância passa, muito provavelmente, pelo facto de o recipiente utilizado para efetuar a extração MW que continha a sonda de monitorização dos parâmetros de temperatura e pressão (MWB) não estar tão bem isolado como o outro recipiente (MWA), levando a que os dois

recipientes não estivessem sob as mesmas condições de pressão e de temperatura durante a extração. Os dados das extrações foram então analisados individualmente.

A análise aos rendimentos de extração foi feita com base em 2 parâmetros, a percentagem de extração, calculada através da diferença entre a massa inicial e a massa final de resíduo, e a percentagem de extrato precipitado após precipitação em etanol, sendo que a diferença entre estes 2 parâmetros dá-nos também a percentagem de HMWM que não precipitou (Tabela 8).

**Tabela 8:** Rendimentos de extração de HMWM utilizando extração assistida com radiação MW.

	% extração	m ppEtOH (g)	% ppEtOH	% pureza do extrato	m Sn EtOH (g)	% SnEtOH
<b>MWA 0,5M</b>	49,09	0,5491	8,36	97,57	2,6736	40,72
<b>MWB 0,5M</b>	54,82	0,1287	1,97	80,4	3,4545	52,85

Analisando os dois parâmetros acima referidos para a extração MW A podemos verificar uma percentagem de extração de 49,09% (m/m) correspondente a uma massa de 3,22g extraída do resíduo de café. Apenas 8,36% (0,5491g) desses 49,09% correspondem a HMWM que precipita em etanol (80% (v/v)), o que significa que 40,72% do HMWM permaneceram no sobrenadante (SnEtOH). Isto é indicativo de que a maior parte do HMWM que é extraído em MW não é passível de ser precipitado. Este facto pode dever-se a vários fatores, desde o tamanho das moléculas extraídas que influenciam a sua solubilidade, o tipo de moléculas extraídas (polissacarídeos, melanoidinas, ácidos clorogénicos).

Na extração por MW B verificamos uma percentagem de extração de 54,82% (m/m) correspondente a 3,58 g de massa extraída do resíduo de café. Apenas 1,97% (0,1287g) desses 54,82% correspondem a HMWM que precipita em etanol (80% (v/v)) e 52,85% corresponde a material que permaneceu no sobrenadante (SnEtOH).

Partindo do princípio que grande parte do material que precipitou corresponde a polissacarídeos, macromoléculas cuja sua grande maioria, dependendo do grau de ramificação e polimerização, precipita quando na presença de um meio com 80% (v/v) de etanol, foi efetuada uma análise de açúcares ao precipitado de modo a aferir o grau de pureza e composição deste extrato, à partida extremamente rico em polissacarídeos.

Comparando as percentagens de precipitado obtidas nesta extração com a anteriormente descrita nas extrações alcalinas com NaOH, verificamos que a extração MW é bastante mais eficaz em termos de massa extraída. Sensivelmente metade da massa do resíduo de café foi extraída através deste método, revelando que a utilização de radiação de MW é uma metodologia que apresenta rendimentos bastante superiores comparativamente com a utilização de reagentes alcalinos.

### **3.3.3.1. PUREZA E COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS ppEtOH EM TERMOS DE POLISSACARÍDEOS**

O grau de pureza calculado do extrato de MWA (tabela 9) foi de  $97,57 \pm 0,24\%$ , o mais alto de entre todas as extrações efetuadas ao longo deste trabalho. Isto indica que, tendo em conta apenas a extração de polissacarídeos, temos um rendimento de extração muito semelhante (8,16% (m/m)) ao rendimento obtido com utilização de solventes alcalinos (5,44% (m/m)), embora uma extração utilizando MW seja bastante vantajosa em relação à extração utilizando solventes alcalinos caso o objetivo final seja extrair apenas polissacarídeos do resíduo de café, dado que é possível obter um extrato com um elevado grau de pureza em polissacarídeos utilizando MW.

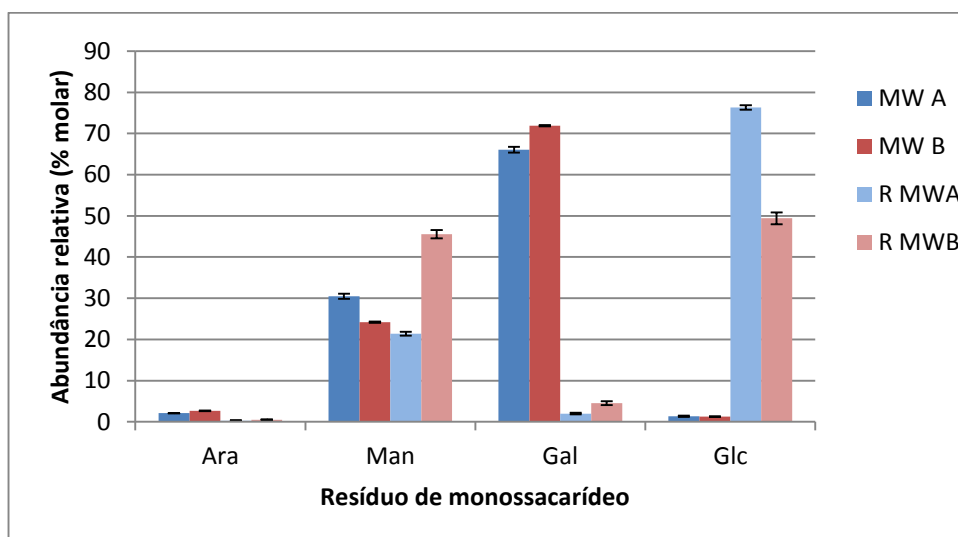
No caso da extração MW B, analisando a percentagem de açúcares presente no extrato obtido por precipitação em etanol (ppEtOH) verificamos que o extrato tem um grau de pureza de  $80,4 \pm 7,8\%$ , um grau de pureza relativamente mais baixo do que o verificado na extração MW A, mas mesmo assim, bastante elevado quando comparado com o grau de pureza dos extratos obtidos por extrações com solvente alcalino. O rendimento de extração apenas de polissacarídeos também é bastante mais baixo do que o verificado na extração MW A (1,58%) o que nos leva a concluir que condições mais extremas de extração com MW dão origem a um extrato muito mais puro e em maior quantidade.

**Tabela 9:** Rendimentos de extração obtidos nas extrações sequenciais em meio alcalino utilizando NaOH tendo em conta o material precipitado e os açúcares presentes nesse material.

	% precipitado	Pureza da amostra	% açúcares extraídos
ppMW A	8,36	97,57 ± 0,24	8,16
ppMW B	1,97	80,4 ± 7,8	1,58

Fazendo uma análise comparativa entre o ppEtOH B e o ppEtOH A podemos verificar, que neste caso temos uma quantidade de galactomananas ligeiramente inferior como podemos ver pela diminuição do rácio man/gal, mas principalmente pela diminuição da percentagem de manose em cerca de 10% e pelo ligeiro aumento da percentagem de arabinose. Este facto também é explicado pelo facto de na extração MW B as condições de extração não serem tão extremas como as condições de extração MW A, pois sabendo que as galactomananas são de extração mais difícil do que as arabinogalactanas, condições mais extremas são necessárias para a extração eficaz das mesmas.

Quanto à abundância relativa de açúcares no extrato, temos perfis relativamente semelhantes aos verificados nas 2 primeiras extrações com KOH (Figura 16).



**Figura 16:** Abundância relativa (% molar) de açúcares dos extrato obtidos por extração assistida com radiação MW e respetivos resíduos remanescentes. (Legenda: arabinose (Ara), manose (Man), galactose (Gal) e Glucose (Glc)).



Os perfis são típicos da presença de uma maior quantidade de arabinogalactanas do que de galactomananas (rácio Man/Gal de 0,46) embora neste caso, a percentagem de galactomananas no extrato pareça ser superior ao fim de uma extração MW do que a verificada nas primeiras 2 extrações com KOH, o que indica que uma extração com o auxílio de MW parece ser um método mais eficaz na extração de galactomananas do que utilizando solventes alcalinos. Quanto ao perfil de açúcares do ppEtOH B, mais uma vez estamos na presença de um perfil é típico de arabinogalactanas com algumas galactomananas (rácio Man/Gal de 0,34).

Analisando os resíduos de café remanescentes das extrações utilizando MW verificamos que realmente foram extraídos bastantes polissacarídeos. O aumento drástico da quantidade de resíduos de glucose no resíduo mostra que a proporção relativa de celulose em relação às arabinogalactanas e galactomananas aumentou bastante. As baixas quantidades de arabinose e de galactose nos resíduos remanescentes indicam que as arabinogalactanas são extraídas na sua quase totalidade enquanto que algumas galactomananas, como podemos ver pelas quantidades de manose, e a celulose permanecem no resíduo por serem de extração mais difícil, principalmente no caso da celulose. Os elevados valores de glucose verificados são indicativos da extração da grande maioria dos polissacarídeos do resíduo de café, particularmente as arabinogalactanas (extraídas quase na totalidade).

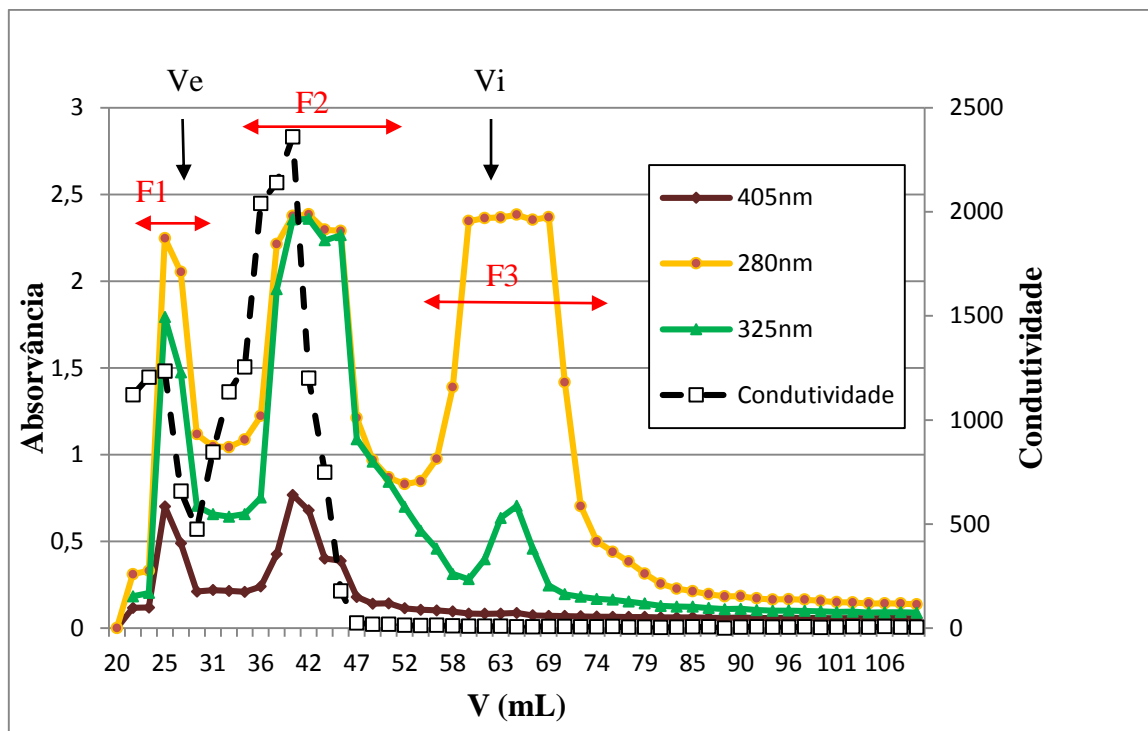
Como é possível verificar pela análise aos rendimentos de extração e percentagem de precipitado obtido, torna-se claro que uma grande percentagem de HMWM foi extraída mas não é passível de ser precipitada numa solução de 80%. Foi efetuada uma tentativa de precipitação com 90% de etanol em solução, mas em vão, pois não ocorreu qualquer tipo de precipitação de material. Isto indica que o sobrenadante é composto por compostos bastante solúveis e em grande quantidade.

Tornou-se então necessário analisar o sobrenadante da precipitação em etanol (SnEtOH) de modo a aferir que tipo de HMWM ficou em solução. Para isso foi utilizada uma coluna de exclusão molecular para tentar separar os compostos presentes em solução de acordo com a sua gama de tamanhos.

Através da calibração da coluna de exclusão observou-se que o volume de exclusão (volume no qual os compostos de tamanho superior são eluídos não entrando na coluna) vai até aproximadamente aos 27mL de eluição. O volume de inclusão (volume no qual os compostos

de tamanhos inferiores são eluídos da coluna) vai até 60mL de eluição. A recolha do SnEtOH MWB eluído na coluna de exclusão molecular foi efetuada tendo em conta que, pela calibração anteriormente efetuada, sabíamos que só iriam eluir compostos de interesse a partir dos 20mL de eluição. Nas eluições efetuadas foi utilizado o sobrenadante resultante da precipitação efetuada ao sobrenadante da extração de MW B (SnEtOH MWB) por ter sido a extração na qual conseguimos precipitar menos material, e este seria portanto um sobrenadante bastante rico em HMWM solúvel.

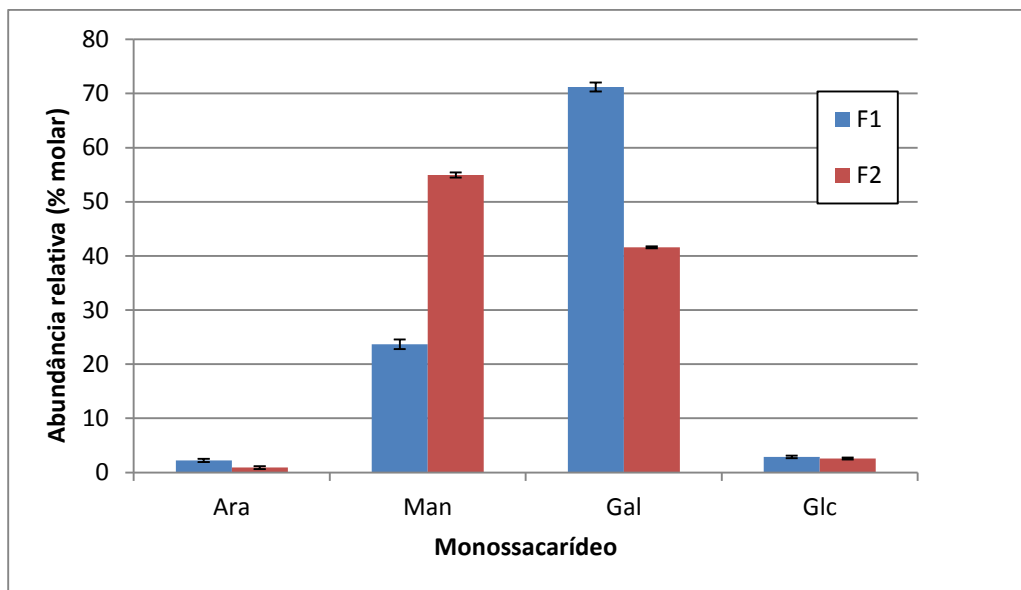
Como podemos verificar pelo gráfico de absorvância a 405nm (castanhos) 280nm (compostos fenólicos) e 325nm (característico dos ácidos clorogénicos), com base no tamanho, foram identificados 3 grupos distintos de moléculas (F1, F2, F3) (Figura 18). A fração F1 eluiu entre os 22mL e os 28mL (volume de exclusão) pelo que podemos dizer que é uma fração composta por moléculas com um peso molecular superior por comparação com F2 e F3. As frações F2 e F3 eluíram entre os 32 – 52mL e 56 – 76mL respetivamente (volume de inclusão) indicando que são frações compostas por moléculas de peso molecular inferior e que entraram na coluna. F1 e F2 apresentam um pico de absorvância a 405nm, comprimento de onda a que as melanoidinas tipicamente absorvem radiação, o que indica que estas frações provavelmente contêm, entre outros compostos, melanoidinas com pesos moleculares distintos na sua composição. Os picos a 280nm (comprimento de onda a que os compostos fenólicos tipicamente absorvem a radiação) e 325nm (comprimento de onda característico da presença de ácido clorogénicos) verificados em F1 e F2 são indicativos da presença de ácidos clorogénicos na sua constituição, sendo que estes compostos que podem entrar na constituição das melanoidinas. A fração F3, devido ao pico de absorvância a 280nm e ao pico a 325nm, é composta maioritariamente por ácidos clorogénicos, compostos fenólicos característicos do resíduo de café e com um peso molecular mais baixo do que macromoléculas como as melanoidinas e os polissacarídeos.



**Figura 17:** Análise espectrofotométrica (280nm, 325nm e 405nm) e de condutividade das alíquotas recolhida após eluição do SnEtOH da extração MW B, na coluna de exclusão molecular. “Ve” significa volume de exclusão e “Vi” significa volume de inclusão.

Tendo em conta que esta análise é feita ao sobrenadante da precipitação em etanol efetuada, é seguro afirmar que estamos na presença de uma solução de moléculas bastante solúveis, e portanto, provavelmente não correspondem a polissacarídeos de cadeia longa e muito ramificados, mas sim, oligossacarídeos de tamanho intermédio/baixo e com uma baixo grau de ramificação.

Pelo perfil de açúcares verificado para esta amostra (Figura 19), podemos ver claramente através das quantidades relativas de arabinose e principalmente de galactose que estamos na presença de fragmentos de arabinogalactanas. O rácio de Man/Gal de 0,3 indica-nos que também existem alguns fragmentos de galactomananas em F1, embora numa quantidade bastante inferior.



**Figura 18:** Abundância relativa (% molar) de açúcares presentes nas frações F1 e F2 recolhidas por eluição do SnEtOH da extração MW B.

A percentagem de açúcares em F1 é de  $14,3 \pm 2,8\%$ , percentagem muito baixa e que nos indica a possibilidade de estarmos na presença de melanoidinas, compostos de alto peso molecular e com uma estrutura molecular extremamente heterogénea formados através de reações de Maillard a partir dos mais variados tipos de moléculas (polissacarídeos, proteínas, ácidos clorogénicos, entre outros). Esta possibilidade é mais forte tendo em conta que a fração F1 absorve radiação a 405nm, característica das melanoidinas.<sup>10</sup>

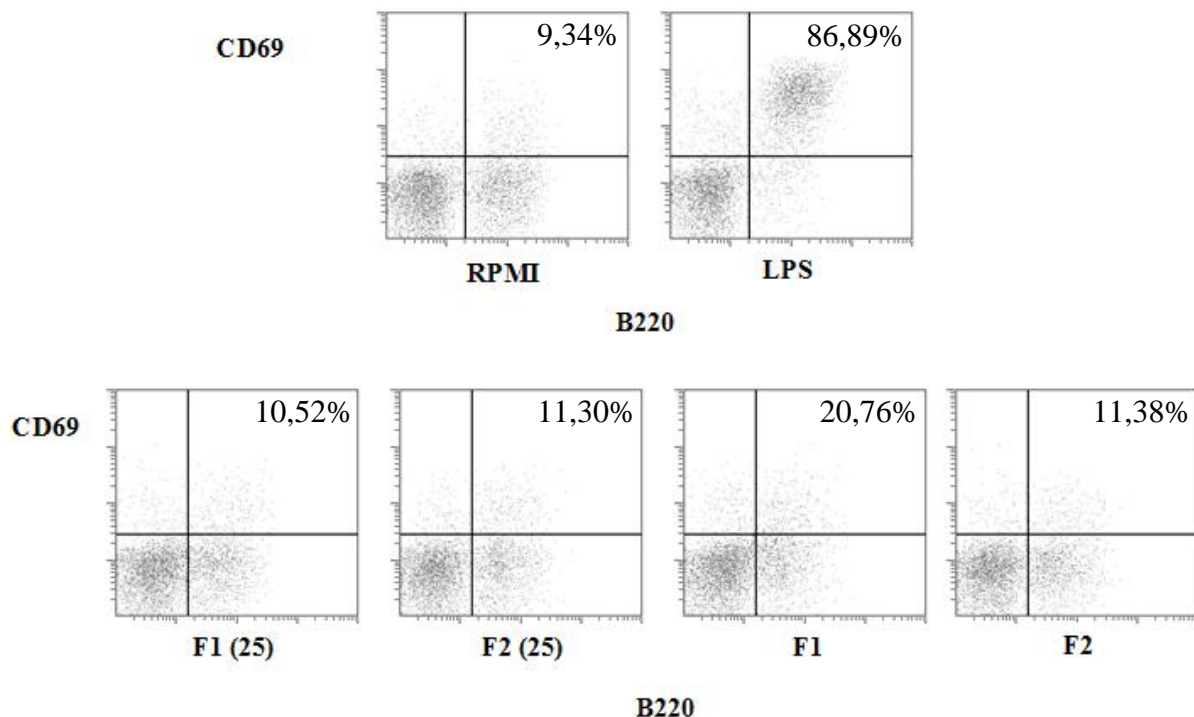
Já para a fração F2, o perfil de açúcares obtidos é bastante diferente do que o verificado em F1. Em F2 vemos uma contribuição muito mais significativa das galactomananas na quantidade de polissacarídeos existentes na fração. O rácio man/gal é de 1,3, valor bastante superior ao verificado em F1 e indicativo da presença em maior quantidade de galactomananas. Ainda assim, a quantidade de galactose indica-nos que existem arabinogalactanas na composição do extrato.

### 3.3.3.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE IMUNOESTIMULADORA DAS AMOSTRAS

Para avaliar o potencial imunoestimulador dos polissacarídeos extraídos por MW em solução de ác.acético foram testadas as amostras F1 e F2 obtidas por eluição na coluna de exclusão molecular. Foram escolhidas estas amostras por apresentarem um perfil de açúcares

típico de arabinogalactanas e galactomananas, respetivamente e por serem amostras extremamente solúveis, não precipitando em solução com 90% de etanol.

Por citometria de fluxo foram analisadas 2 amostras (F1 e F2) e uma diluição em 25% das mesmas (F1 25 e F2 25), e os resultados foram obtidos na forma de citogramas. Na figura 20 estão representados os citogramas amostras analisadas, através dos quais é possível distinguir células B de outras células presentes (eixo das abcissas), e células ativadas de não ativadas (eixo das ordenadas). A percentagem de ativação linfocitária é determinada pela razão de células B ativas (2º quadrante) com o número total de células B (soma do 2º e 4º quadrante). Foi utilizado o meio RPMI como controlo negativo de ativação linfocitária e o meio contendo LPS como controlo positivo (Figura 20).



**Figura 19:** Citogramas obtidos através da análise da atividade imunestimuladora das amostras F1, F2, F1 (25) e F2 (25) por citometria de fluxo.

Como podemos verificar pelos citogramas obtidos, nenhuma das amostras testadas revelaram uma ativação linfocitária relevante. O valor máximo de percentagem de células linfocitárias B ativadas obtido foi 20,76% para a amostra F1 sem qualquer tipo de diluição, valor este que é apenas sensivelmente o dobro da percentagem de ativação obtida para o meio RPMI.

É um valor bastante mais baixo do que seria de esperar, visto que estudos anteriores reportam para o facto de polissacarídeos acetilados apresentarem percentagens de ativação bastante satisfatórias (na ordem dos 80-90% de ativação linfocitária<sup>46</sup>). Como foi discutido anteriormente, estas amostras contêm uma percentagem bastante baixa de açúcares na sua composição, havendo a possibilidade de as melanoidinas serem o principal composto presente nestas amostras. A percentagem de ativação verificada neste ensaio pode portanto estar bastante afetada pelo facto de as amostras serem mais pobres do que seria de esperar em termos de polissacarídeos.

Considerando os resultados negativos de atividade imunoestimuladora, foi estudado o tamanho das moléculas extraídas. Sabendo que polissacarídeos pequenos não apresentam as propriedades biológicas que polissacarídeos maiores têm, em parte devido a impossibilidade de polissacarídeos pequenos formarem uma estrutura 3D, Foram testadas as 2 amostras de maior peso molecular obtidas pela coluna de exclusão molecular (F1 e F2) e também de duas amostras de sobrenadante de duas extrações de MW entretanto efetuadas com uma concentração de ác.acético mais baixa (0,1M e 0,2M).

Como podemos verificar pelos dados da tabela 11, os tamanhos observados para as 4 amostras analisadas são bastante mais pequenos do que seria de esperar. A fração F1 revelou ter compostos com um maior peso molecular médio (3200 Da), um tamanho relativamente pequeno comparativamente com o valor obtido por Passos *et al* para o 1º ciclo de extrações utilizando MW (17400 Da).<sup>60</sup> Para F2 o valor de multidiversidade (PD - indicador da homogeneidade/heterogeneidade dos tamanhos dos compostos presentes na amostra) indica que existe alguma heterogeneidade de tamanhos das moléculas que compõem F2 (quanto mais próximo de 1 for o valor calculado para PD mais homogénea é a amostra em termos do tamanho dos compostos). Já F1 tem um PD de 1, indicando uma homogeneidade de tamanhos bastante elevada, mas os compostos apresentam um peso molecular bastante baixo (1030 Da). Analisando ainda os valores obtidos para SnMW (0,1M) e SnMW (0,2M), 3000 Da (PD - 1,6) e 2600 Da (PD - 1,9) respetivamente, verificamos que uma diminuição da concentração de ác.acético não se traduz num aumento significativo do peso molecular dos compostos constituintes. Olhando para estes dados podemos afirmar que as condições de extração com o auxílio de MW utilizadas neste trabalho promoveram uma hidrólise parcial do HMWM extraído,

reduzindo de sobremaneira o seu tamanho médio e impedindo os polissacarídeos presentes nas amostras de formar uma estrutura 3D estável<sup>64</sup>, afetando o seu potencial imunoestimulador.

**Tabela 10:** Valores do peso molecular médios das moléculas presentes em F1, F2, MW(0,1M) e MW (0,2M) (Mw – peso molecular médio; Mn – média numérica; PD – fator de multidiversidade)

	<b>F 1 MW/ Ác.acético (0,5M)</b>	<b>F 2 MW/ Ác.acético (0,5M)</b>	<b>SnMW/Ác.acético (0,1M)</b>	<b>SnMW/Ác. Acético (0,2M)</b>
<b>Mw (Da)</b>	3200	1030	3000	2600
<b>Mn (Da)</b>	1670	1030	1870	1400
<b>PD (Mw/Mn)</b>	1,9	1	1,6	1,9

## Capítulo IV – Conclusões

O presente trabalho consistiu na otimização das condições de extração de óleo de café e dos polissacarídeos presentes no resíduo de café permitindo uma valorização do mesmo.

Foram efetuadas várias extrações do óleo de café a partir do resíduo de café utilizando a metodologia de Soxhlet utilizando n-hexano como solvente extrator, tendo sido obtido um rendimento máximo de extração para as condições de extração de 2h de extração utilizando resíduo de café com uma percentagem de humidade de 61,4%, tendo sido obtido um rendimento de extração de  $15,88 \pm 0,88\%$ . A extração utilizando o resíduo de café com uma percentagem de humidade de 8% sob a forma de pastilhas, revelou-se como sendo a mais vantajosa para aplicação à escala industrial apesar de não ser a que obtém um rendimento de extração máximo ( $14,37 \pm 0,28\%$ ). A resistência das pastilhas à extração com o mínimo de degradação das mesmas revela-se um fator de extrema importância para transpor o fenómeno de agregação das partículas do resíduo de café sem afetar de sobremaneira os rendimentos de extração. A extração aquosa assistida por radiação MW é uma técnica bastante promissora para a extração deste tipo de material.

Olhando para os rendimentos de extração alcalina, podemos afirmar com grande certeza que o uso de NaOH como agente alcalino é mais vantajoso para a extração de polissacarídeos pois apresentou um rendimento de extração global de polissacarídeos mínima ao cabo de duas extrações consecutivas (1ª durante 1h a 80°C e 2ª “overnight” à temperatura ambiente) de 8,86% enquanto que utilizando KOH, o rendimento observado ao cabo de 3 extrações consecutivas (as 3 durante 1h a 80°C) foi de 6,68%. Olhando para a composição dos extratos obtidos verifica-se que são extraídas maioritariamente arabinogalactanas sendo que quanto mais extrações se façam utilizando o mesmo resíduo, maior é a quantidade de galactomananas extraídas em relação às arabinogalactanas.

Também utilizando NaOH como agente alcalino verifica-se uma maior extração de arabinogalactanas sendo que a 2ª extração consecutiva utilizando o mesmo resíduo já revela uma certa quantidade de galactomananas no extrato obtido.



A extração aquosa assistida por radiação MW do resíduo de café numa solução de ác. acético teve um rendimento de extração bastante superior ao obtido em meio alcalino com NaOH (8,36%). O aumento da temperatura reacional não é o suficiente para compensar a diminuição da concentração de reagente alcalino efetuada de modo a tentar baixar as quantidades de reagentes necessários ao longo do processo, baixando assim os custos de extração. Sendo a extração com utilização de MW um método bastante rápido e ecologicamente limpo, a potencial aplicação deste método à escala industrial é algo que se revela como sendo bastante viável.

Foi ainda analisado a constituição do sobrenadante remanescente da precipitação dos polissacarídeos da extração assistida com MW quanto à quantidade de açúcares presentes no mesmo. Verificou-se, através de uma coluna de exclusão molecular que existiam duas frações de alto peso molecular (F1 e F2) e um fração de menor peso molecular (F3), sendo que F1 e F2 continham açúcares na sua constituição, embora em percentagens muito baixas ( $14,3 \pm 2,8\%$  e  $26,86 \pm 4,1\%$  em F1 e F2 respetivamente). Os polissacarídeos de F1 e F2 revelaram-se parcialmente acetilados, e portanto passíveis de terem atividade imunoestimuladora, o que não se verificou através de testes de ativação linfocitária por citometria de fluxo. A falta de ativação deve-se muito provavelmente pelo relativamente reduzido tamanho dos polissacarídeos extraídos, mais tarde verificado através de uma coluna de permeação em gel, indicando que a presença de ác. acético no meio reacional, apesar de promover a acetilação dos polissacarídeos parece também promover uma hidrólise parcial dos mesmos.

Comparando todos os métodos de extração de HMWM podemos afirmar que a extração utilizando radiação MW foi bastante mais eficaz do que qualquer extração alcalina que tenha sido testada. A redução da concentração de solução alcalina (1M), apesar de baixar de extração comparando com uma extração com uma solução de 4M revelou-se muito pouco eficaz, particularmente utilizando KOH como reagente alcalino.

# Capítulo V – Propostas de Trabalho Futuro

O presente trabalho contribuiu para o estudo das condições de extração necessárias de modo obter óleo de café e polissacarídeos com assinalável rendimento. Embora a otimização da extração do óleo do resíduo de café tenha sido feita com assinalável sucesso, o estudo da sua constituição foi pouco extensivo, pelo que no futuro seria interessante verificar possíveis alterações na composição do óleo de café extraído (principalmente nas quantidades de compostos diterpénicos) que o método otimizado implica, pois a composição do óleo de café irá ter influência no seu valor final, e conseqüentemente no valor comercial potencial do resíduo de café.

Tendo em conta que o método mais eficaz e rápido de extração de polissacarídeos da matriz do resíduo de café foi a utilização de radiação MW, seria importante efetuar um estudo detalhado para otimização das condições de extração. Um estudo energético associado às condições de extração acima mencionadas seria bastante benéfico no sentido em que uma possível aplicação de um processo deste tipo à escala industrial, requer um estudo económico extenso, no qual se insere estudos de consumo energético.

## Capítulo VI – Referências Bibliográficas

- (1) Kondamudi, N., Mohapatra, S. K., and Misra, M. (2008) Spent Coffee Grounds as a Versatile Source of Green Energy. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11757–11760.
- (2) Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Martins, S., and Teixeira, J. a. (2011) Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioprocess Technol.* 4, 661–672.
- (3) Clifford, M. N., and Wilson, K. C. (1985) Coffee: Botany, Biochemistry and production of beans and beverage Reprinted. Springer US.
- (4) Flament, I. (2002) Coffee Flavour Chemistry. Wiley.
- (5) Belitz, H., Grosch, W., and Schieberle, P. (2009) Food Chemistry 4th ed. Springer US.
- (6) Nunes, F., and Reis, A. (2006) Characterization of galactomannan derivatives in roasted coffee beverages. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3428–3439.
- (7) Daglia, M., Papetti, A., Gregotti, C., Berté, F., and Gazzani, G. (2000) In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1449–1454.
- (8) Clifford, M. N. (2000) Review Chlorogenic acids and other cinnamates – nature , occurrence , dietary burden , absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1033–1043.
- (9) Nunes, F. M., Cruz, A. C. S., and Coimbra, M. A. (2012) Insight into the Mechanism of Coffee Melanoidin Formation Using. *J. Agric. Food Chem.* 60, 8710–8719.
- (10) Hofmann, T. (1998) Studies on melanoidin-type colorants generated from the Maillard reaction of protein-bound lysine and furan-2-carboxaldehyde - chemical characterisation of a red coloured domaine. *Zeitschrift fur Leb. und -forsch. A* 206, 251–258.
- (11) Tressl, R., Wondrak, G. T., Garbe, L., and Rewicki, D. (1998) Pentoses and Hexoses as Sources of New Melanoidin-like Maillard Polymers. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1765–1776.
- (12) Nunes, F., and Coimbra, M. (2007) Melanoidins from coffee infusions. Fractionation, chemical characterization, and effect of the degree of roast. *J. Agric. Food Chem.* 55, 3967–3977.
- (13) Cruz, R., Cardoso, M. M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P., Morais, S., and Casal, S. (2012) Espresso coffee residues: A valuable source of unextracted compounds. *J. Agric. Food Chem.* 60, 7777–7784.
- (14) Passos, C. P., and Coimbra, M. A. (2013) Microwave superheated water extraction of polysaccharides from spent coffee grounds. *Carbohydr. Polym.* 94, 626–633.

(15) Lieberman, H. R., Tharion, W. J., Shukitt-Hale, B., Speckman, K. L., and Tulley, R. (2002) Effects of caffeine, sleep loss, and stress on cognitive performance and mood during U.S. Navy SEAL training. Sea-Air-Land. *Psychopharmacology (Berl)*. 164, 250–61.

(16) Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartua, E. (1999) Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 51, 83–133.

(17) Robinson, W. E., Cordeiro, M., Abdel-Malek, S., Jia, Q., Chow, S. A., and Reinecke, M. G. (1996) Dicafeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: Inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase. *Mol. Pharmacol.* 53, 846–855.

(18) Tatefuji, T., Izumi, N., Ohta, T., Arai, S., Ikeda, M., and Kurimoto, M. (1996) Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biol. Pharm. Bull.* 19, 966–970.

(19) Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S., and Namba, T. (1996) Four di-o-cafeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biol. Pharm. Bull.* 1479–1484.

(20) Shearer, J., Farah, A., de Paulis, T., Bracy, D. P., Pencek, R. R., and Graham, T. E. (2003) Quinides of roasted coffee enhance insulin action in conscious rats. *J. Nutr.* 133, 3529–3532.

(21) De Paulis, T., Schmidt, D. E., Bruchey, A. K., Kirby, M. T., McDonald, M. P., and Commers, P. (2002) Dicinnamoylquinides in roasted coffee inhibit the human adenosine transporter. *Eur. J. Pharmacol.* 442, 215–223.

(22) Mantell, C. L. (1975) Solid wastes: origin, collection, processing, and disposal.

(23) Tokimoto, T., Kawasaki, N., Nakamura, T., Akutagawa, J., and Tanada, S. (2005) Removal of lead ions in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass. *J. Colloid Interface Sci.* 281, 56–61.

(24) López-Galilea, I., de Peña, M. P., and Cid, C. (2007) Correlation of selected constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: influence of the brewing procedure. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6110–6117.

(25) Pérez-Martínez, M., Caemmerer, B., de Peña, M., Cid, C., and Kroh, L. (2010) Influence of brewing method and acidity regulators on the antioxidant capacity of coffee brews. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2958–2965.

(26) Couto, R. M., Fernandes, J., da Silva, M. D. R. G., and Simões, P. C. (2009) Supercritical fluid extraction of lipids from spent coffee grounds. *J. Supercrit. Fluids* 51, 159–166.

(27) Calligaris, S., Munari, M., Arrighetti, G., and Barba, L. (2009) Insights into the physicochemical properties of coffee oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 1270–1277.

- 
- (28) Dewick, P. M. (2002) Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach (Lee, P., Aizawa, H., and Gan, L., Eds.) 2nd Editio. John Wiley & Sons, inc.
- (29) Kurzrock, T., and Speer, K. (2007) Diterpenes and Diterpene Esters in Coffee. *Food Rev. Int.* 17, 433–450.
- (30) Huber, W. W., Rossmann, W., Grusch, M., Haslinger, E., Prustomersky, S., Peter-Vorosmarty, B., Parzefall, W., Scharf, G., and Schulte-Hermann, R. (2008) Effects of coffee and its chemopreventive components kahweol and cafestol on cytochrome P450 and sulfotransferase in rat liver. *Food Chem Toxicol* 46, 1230–1238.
- (31) Cardenas, C., Quesada, A. R., and Medina, M. A. (2011) Anti- angiogenic and anti-inflammatory properties of kahweol, a coffee diterpene. *PLoS One* 6, 1–9.
- (32) Kim, J. Y., Kim, D. H., and Jeong, H. G. (2006) Inhibitory effect of the coffee diterpene kahweol on carrageenan-induced inflammation in rats. *Biofactors* 26, 17–28.
- (33) Wang, Y., Pengzhan Liu, S. O., and Zhang, Z. (2007) Preparation of biodiesel from waste cooking oil via two-step catalyzed process. *Energy Convers. Manag.* 48, 184–188.
- (34) Oliveira, L. S., Franca, A. S., Camargos, R. R. S., and Ferraz, V. P. (2008) Coffee oil as a potential feedstock for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 99, 3244–50.
- (35) Caetano, N., Silva, V., and Mata, T. (2012) Valorization of coffee grounds for biodiesel production. *Chem. Engineering Trans.* 26, 267–272.
- (36) Serrato, A. G. (1981) Extraction of oil from soybeans. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58, 157–159.
- (37) Barbosa, H. M. a., de Melo, M. M. R., Coimbra, M. a., Passos, C. P., and Silva, C. M. (2014) Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology. *J. Supercrit. Fluids* 85, 165–172.
- (38) De Melo, M. M. R., Barbosa, H. M. a., Passos, C. P., and Silva, C. M. (2014) Supercritical fluid extraction of spent coffee grounds: Measurement of extraction curves, oil characterization and economic analysis. *J. Supercrit. Fluids* 86, 150–159.
- (39) Harwood, L. M., and Moody, C. J. (1989) Experimental organic chemistry: Principles and Practice Illustrate. Blackwell Scientific.
- (40) Al-Hamamre, Z., Foerster, S., Hartmann, F., Kröger, M., and Kaltschmitt, M. (2012) Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel* 96, 70–76.
- (41) Tang, P., and Puri, V. M. (2004) Methods for Minimizing Segregation: A Review. *Part. Sci. Technol.* 22, 321–337.
-

(42) Roberts, A. W., Sollie, L. A., and de Silva, S. R. (1993) The interaction of bulk solid characteristics and surface parameters in surface or boundary friction measurements. *Tribol. Int* 26, 335–343.

(43) Mosby, J. (1996) Investigations of the segregation of particulate solids with emphasis on the use of segregation testers. PhD Thesis. Telemark College.

(44) Venables, H. J., and I, W. J. (2001) Powder mixing. *Drug Dev. Ind. Pharm* 27, 599–612.

(45) Illy, A., and Viani, R. (1995) Espresso Coffee: The Chemistry of Quality, in *Academic Press, London*.

(46) Simões, J., Madureira, P., Nunes, F. M., Domingues, M. D. R., Vilanova, M., and Coimbra, M. a. (2009) Immunostimulatory properties of coffee mannans. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 1036–1043.

(47) Nosál'ová, G., Prisenžňáková, L., Paulovičová, E., Capek, P., Matulová, M., Navarini, L., and Liverani, F. S. (2011) Antitussive and immunomodulating activities of instant coffee arabinogalactan-protein. *Int. J. Biol. Macromol.* 49, 493–497.

(48) Sutherland, P. W., Hallett, I. C., MacRae, E., Fischer, M., and Redgwell, R. J. (2004) Cytochemistry and immunolocalisation of polysaccharides and proteoglycans in the endosperm of green Arabica coffee beans. *Protoplasma* 223, 203–211.

(49) Gniechwitz, D., and Reichardt, N. (2007) Dietary fiber from coffee beverage: degradation by human fecal microbiota. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6989–6996.

(50) Reichardt, N., Gniechwitz, D., Steinhart, H., Bunzel, M., and Blaut, M. (2009) Characterization of high molecular weight coffee fractions and their fermentation by human intestinal microbiota. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 287–299.

(51) Sun, W., Sun, D., Wei, Y., Liu, S., and Zhang, S. (2007) Oil-in-water emulsions stabilized by hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose: Adsorption and thickening effect. *J. Colloid Interface Sci.* 311, 228–236.

(52) Redgwell, R. J., Trovato, V., Curti, D., and Fischer, M. (2002) Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arabica coffee beans. *Carbohydr. Res.* 337, 421–431.

(53) Redgwell, R. J., Schmitt, C., Beaulieu, M., and Curti, D. (2005) Hydrocolloids from coffee: physicochemical and functional properties of an arabinogalactan–protein fraction from green beans. *Food Hydrocoll.* 19, 1005–1015.

(54) Nunes, F. M., Reis, A., Silva, A. M. S., Domingues, M. R. M., and Coimbra, M. a. (2008) Rhamnoarabinosyl and rhamnoarabinoarabinosyl side chains as structural features of coffee arabinogalactans. *Phytochemistry* 69, 1573–1585.

- (55) Fischer, M., Reimann, S., Trovato, V., and Redgwell, R. (2001) Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. *Carbohydr. Res.* 330, 93–101.
- (56) Chow, J. T., and Williamson, D. (2005) Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of Aloe vera L. *Carbohydr. Res.* 340, 1131–1142.
- (57) Nunes, F. M., Domingues, M. R., and Coimbra, M. A. (2005) Arabinosyl and glucosyl residues as structural features of acetylated galactomannans from green and roasted coffee infusions. *Carbohydr. Res.* 340, 1689–98.
- (58) Matulová, M., Capek, P., Kaneko, S., Navarini, L., and Liverani, F. S. (2011) Structure of arabinogalactan oligosaccharides derived from arabinogalactan-protein of Coffea arabica instant coffee powder. *Carbohydr. Res.* 346, 1029–1036.
- (59) Capek, P., Matulová, M., Navarini, L., and Suggi-Liverani, F. (2010) Structural features of an arabinogalactan-protein isolated from instant coffee powder of Coffea arabica beans. *Carbohydr. Polym.* 80, 180–185.
- (60) Passos, C. P., Moreira, A. S. P., Domingues, M. R. M., Evtuguin, D. V., and Coimbra, M. a. (2014) Sequential microwave superheated water extraction of mannans from spent coffee grounds. *Carbohydr. Polym.* 103, 333–338.
- (61) Adam, D. (2003) Out of the kitchen. *Nature*.
- (62) Stimple, M., Proksch, A., Wagner, H., and Lohman-Mathes, M. . (1984) Macrophage Activation and Induction of Macrophage Cytotoxicity by purified Polysaccharide Fractions from the Plant Echinacea purpurea. *Infect. Immun.* 845–849.
- (63) Hussein, M. M. ., Helmy, W. ., and Salem, H. M. (1998) Biological activities of some galactomannans and their sulphated derivates. *Phytochemistry* 48, 479–484.
- (64) Paulsen, B. (2002) Biologically active polysaccharides as possible lead compounds. *Phytochem. Rev.* 1, 379–387.
- (65) Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pillai, S. (2009) Cellular and Molecular Immunology (Rebecca, G., Ed.) 6th ed. Saunders Elsevier.
- (66) Chow, J. T. ., Williamson, D. ., Yates, K. ., and Gous, W. . (2005) Chemical characterization of the immunomodulation polysaccharide of Aloe vera L. *Carbohydr. Polym.* 340, 1131–1142.
- (67) Swanson, K., and Grieshop, C. (2002) Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and. *J. Nutr. Immunol.* 980–989.
- (68) Yamada, H. (1994) Pectin polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. *Carbohydr. Polym.* 25, 269–275.

(69) Habibi, Y., Chanzy, H., & Vignon, M. R. (2006) TEMPO-mediated surface oxidation of cellulose whiskers. *Cellulose* 13, 679–687.

(70) (2008) Bioetanol de cana-de-açúcar. Energia para o desenvolvimento sustentável.

(71) Yuan, Z., Zhang, J., Jiang, A., Lv, W., Wang, Y., Geng, H., Wang, J., and Qin, M. (2015) Fabrication of cellulose self-assemblies and high-strength ordered cellulose films. *Carbohydr. Polym.* 117, 414–421.

(72) Selvendran, R. R., March, J. F., and Ring, S. G. (1979) Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. *Anal. Biochem.* 96, 282–292.

(73) Mendes, J. a. S., Xavier, A. M. R. B., Evtuguin, D. V., and Lopes, L. P. C. (2013) Integrated utilization of grape skins from white grape pomaces. *Ind. Crops Prod.* 49, 286–291.

(74) Waldhauser, S. S. M., and Baumann, T. W. (1996) Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. *Phytochemistry* 42, 985–996.

(75) Cardoso, S. M., Silva, A. M. S., and Coimbra, M. a. (2002) Structural characterisation of the olive pomace pectic polysaccharide arabinan side chains. *Carbohydr. Res.* 337, 917–924.

(76) Obruca, S., Petrik, S., Benesova, P., Svoboda, Z., Eremka, L., and Marova, I. (2014) Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5883–5890.