

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**BRUNO HENRIQUE CZELUSNIAK TORRES**

**DEGRADAÇÃO DE CAFEÍNA POR LACASE DE *Trametes villosa***

**CURITIBA**

**2021**

**BRUNO HENRIQUE CZELUSNIAK TORRES**

**DEGRADAÇÃO DE CAFEÍNA POR LACASE DE *Trametes villosa***

**CAFFEINE DEGRADATION BY *Trametes villosa* LACCASE**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental, do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental – PPGCTA – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk.

Coorientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Rocha Martins.

**CURITIBA**

**2021**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná Campus  
Curitiba**



---

BRUNO HENRIQUE CZELUSNIAK TORRES

**DEGRADAÇÃO DE CAFEÍNA POR LACASE DE TRAMETES VILLOSA**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Ciência E Tecnologia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias E Processos Ambientais.

Data de aprovação: 11 de Novembro de 2021

Prof Charles Windson Isidoro Haminiuk, Doutorado – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Cristiane Vieira Helm, Doutorado – Embrapa

Prof.a Lucia Regina Rocha Martins, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Marlene Soares, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 11/11/2021.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus avós, Aloisio e Francisca Czelusniak que me apoiaram e me incentivaram desde o início da vida e são o motivo deste título, amo vocês.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk, Profa. Dra. Lúcia Regina Rocha Martins e Profa. Dra Giselle Maria Maciel pelo conhecimento adquirido e por acreditarem no meu potencial.

Aos amigos e colegas do laboratório de Biotecnologia e do LAMEAA. Aline, Débora, Nigella, Dayane, Marcelo, Luana, Rafaela, Isabela, Tatiani, Tatiane, Camila e Raquel pela troca de experiências e aprendizado.

Agradeço a Deus Pela fé e por ter me guiado neste caminho.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental (PPGCTA) pelos recursos a mim disponibilizados e pela excelente estrutura.

Por fim, agradeço de coração por todos que participaram dessa trajetória e colaboraram com este trabalho.

## RESUMO

TORRES, B. H. C. **Degradação de cafeína por lacase de *Trametes villosa***. 2021. 80 f. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2021.

O Brasil é o maior exportador de café no mercado mundial e ocupa a segunda posição entre os países consumidores da bebida, o que corresponde a um terço da produção mundial de café, o que o coloca como maior produtor mundial há mais de 150 anos. A cafeína, principal metilxantina encontrada no café, é responsável por efeitos estimulantes do sistema nervoso central, e também por efeitos adversos como refluxo, aumento da pressão arterial, osteoporose, dores musculares, dentre outros. Devido aos efeitos negativos, há um aumento do consumo de café descafeinado, estabelecendo o desenvolvimento de diversos métodos para remoção deste composto. O método convencional utilizado pela maioria das indústrias envolve o uso de solventes, como diclorometano que afeta as características sensoriais do produto, além de ser danoso ao meio ambiente. O uso de enzimas no processo de descafeinização apresenta uma alternativa viável por ser um processo natural, no qual se emprega enzimas de alta atividade, estabilidade e com possibilidade de recuperação. Neste contexto, a lacase, enzima amplamente encontrada na natureza, produzida via fungos, bactérias e plantas, catalisa a oxidação ou a redução de diversos compostos, como a cafeína. Neste trabalho foi avaliada a extração da cafeína nos grãos verdes de café utilizando água como solvente extrator. Com base no modelo estatístico Box-Behken avaliou o processo com três variáveis, utilizando a razão soluto/solvente, tempo, temperatura e como resposta a concentração de cafeína em mg/g. Através do ponto ótimo obtido nos extratos para cafeína ( $37,07 \pm 1,94$  mg/g) foram realizadas análises de compostos fenólicos totais ( $36,72 \pm 3,84$  mg EAG/g) e flavonoides totais ( $9,36 \pm 0,8$  mg ECAT /g) antes da extração da cafeína. Após a otimização, a degradação enzimática da cafeína foi estudada no qual foi desenvolvido um planejamento fatorial com duas variáveis independentes: concentração de mediador (Ácido 4-hidroxibenzoico) e pH. A lacase produzida pelo fungo *Trametes villosa* e a lacase comercial obtiveram rendimentos de degradação de 100 % sob condições semelhantes. A lacase bruta apresentou vantagens econômicas devido ao alto custo da lacase comercial, porém, o processo de degradação mais lento foi observado. Através da cinética de degradação foi possível observar que a lacase comercial em pH 7,0 e concentração de 2 mM de HBA tem capacidade de degradar a cafeína em 30 minutos de reação.

**Palavras-chave:** Degradação enzimática; compostos bioativos; cafeína.

## ABSTRACT

TORRES, B. H. C. **Caffeine degradation by *Trametes villosa* laccase**. 2021. 80 f. Master Thesis (Master in Environmental Science and Technology) – Federal University of Technology - Paraná. Curitiba, 2021.

Brazil is the largest coffee exporter in the world market and ranks second among the countries that consume the drink, corresponding to one-third of its coffee production, which places it as the world's largest producer for over 150 years. Caffeine, the main methylxanthine found in coffee, is responsible for stimulating the central nervous system and for adverse effects such as reflux, increased blood pressure, osteoporosis, and muscle pain. Due to the adverse effects, there is an increase in the consumption of decaffeinated coffee, establishing the development of several methods to remove this compound. The conventional method used by most industries involves using solvents such as dichloromethane, which affects the product's sensory characteristics and is harmful to the environment. The use of enzymes in the decaffeination process presents a viable alternative. It is a natural process in which enzymes with high activity, stability, and the possibility of recovery are used. In this context, laccase, an enzyme widely found in nature, produced via fungi, bacteria, and plants, catalyzes the oxidation or reduction of several compounds, such as caffeine. In this work, the extraction of caffeine in green coffee beans using water as an extracting solvent was evaluated. Based on the Box-Behnken statistical model, the process was evaluated with three variables, using the solute/solvent ratio, time, temperature, and as a response, the caffeine concentration in mg/g. Through the optimum point obtained in the extracts for caffeine ( $37.07 \pm 1.94$  mg/g), analyzes were performed on total phenolic compounds ( $36.72 \pm 3.84$  mg EAG/g) and total flavonoids ( $9.36 \pm 0,8$  mg ECAT/g) before caffeine extraction. After optimization, the enzymatic degradation of caffeine was studied in which a factorial design with two independent variables was developed: mediator concentration (4-hydroxybenzoic acid) and pH. The laccase produced by the fungus *Trametes villosa* and the commercial laccase obtained 100% degradation yields under similar conditions. Raw laccase presented economic advantages due to the high cost of commercial laccase. However, a slight degradation process was observed. Through the degradation kinetics, it was possible to observe that the commercial laccase at pH 7.0 and 2 mM of HBA concentration can degrade caffeine in 30 minutes of reaction.

**Keywords:** Enzymatic degradation; bioactive compounds; caffeine.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exportações de café no mês de julho. ....	17
Figura 2- Produtividade de café arábica no Brasil.....	18
Figura 3- Produtividade de café conilon no Brasil. ....	18
Figura 4- Estrutura química da cafeína. ....	22
Figura 5- Efeitos negativos da cafeína no corpo humano devido ao excesso e uso moderado a longo prazo. ....	24
Figura 6- Processos que ocorrem nas vias de síntese da planta (A) e na degradação da cafeína no corpo humano (B). ....	25
Figura 7- Os polifenóis mais abundantes no café. ....	26
Figura 8- Estrutura Química da trigonelina (A), Ácido Nicotínico (B).....	27
Figura 9- Processamento do café e diferentes métodos convencionais de descafeinação nos grãos verdes aplicados na indústria. ....	29
Figura 10- Etapas para obtenção do extrato de café verde, aplicação da lacase e quantificação em CLAE. ....	34
Figura 11- Ação da enzima lacase na degradação da cafeína com a interação de mediador natural e sintético. ....	40
Figura 12- Cinética de degradação da cafeína.....	40
Figura 13- Linearidade dos valores experimentais com os preditivos para extração de cafeína de grãos verdes de café. ....	47
Figura 14- Gráfico de Pareto dos efeitos e interações das condições de tempo, temperatura e soluto/solvente. ....	48
Figura 15- Gráfico de Contorno apresentando os efeitos da interação entre as variáveis X1 (soluto/solvente) e X2 (tempo). ....	49
Figura 16- Perfil dos valores de resposta e desejabilidade para as variáveis dependentes.....	49
Figura 17- Linearidade do método; curva de calibração, equação da reta e R <sup>2</sup> . ....	51
Figura 18- Cromatograma de Identificação do tempo de retenção da cafeína em diferentes concentrações com metanol/ácido fosfórico 0,1% 65:35 em 272 nm. ....	52
Figura 19- Valores preditos e observados em resposta de rendimento a degradação de cafeína.....	55
Figura 20- Diagrama de Pareto para degradação da cafeína. ....	55
Figura 21- Gráfico de contorno e a variáveis independentes. ....	57

Figura 22- Gráfico de superfície e resposta para relação de degradação da cafeína. .....	58
Figura 23- Relação da concentração de mediador com a degradação da cafeína. ..	59
Figura 24- Gráfico de desejabilidade em função das variáveis de controle. ....	60
Figura 25- Esquema reacional dos ensaios LAC 4 e LAC 3, sua caracterização e eficiência de degradação. ....	61
Figura 26- Relação da concentração de mediador com a degradação da cafeína. ..	62
Figura 27- Efeito do pH na degradação de cafeína sob diferentes meios reacionais no teste piloto. ....	62
Figura 28- Cinética de degradação da cafeína.....	64
Figura 29- Performance dos experimentos frente a cinética realizada em um período de 5 horas. ....	65
Figura 30-Cromatogramas e tempo de retenção da cafeína (11 min) dos ensaios realizados na cinética de degradação. ....	66



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características sensoriais do café; todo sabor do café está relacionado aos sentidos, principalmente o paladar e o olfato, geralmente ambos funcionam em conjunto quando se trata de degustar o café. ....	19
Tabela 2- Classificação do tipo de café em relação a quantidade de defeitos. ....	20
Tabela 3- Métodos de análise adotados para verificar o teor de cafeína entre diferentes tipos de café em regiões diversificadas. ....	23
Tabela 4- Composição dos nutrientes e reagentes utilizados como base neste experimento. ....	35
Tabela 5- Planejamento fatorial Box-Behnken (3/1/15). ....	38
Tabela 6- Modelo dos experimentos preliminares aplicadas para degradação da cafeína. ....	41
Tabela 7- Planejamento fatorial (2/1/9). ....	42
Tabela 8- Tempos de degradação avaliados em relação aos ensaios que apresentaram degradação em um período de 24 horas. ....	42
Tabela 9- Otimização da extração de cafeína de grãos de café verde. ....	45
Tabela 10- Análise de variância (ANOVA) do delineamento Box-Behnken. ....	46
Tabela 11- Resultados das áreas dos cromatogramas obtidas através de diferentes concentrações de padrões por CLAE. ....	51
Tabela 12- Desvio padrão, limite de detecção e quantificação. ....	52
Tabela 13- Percentual de degradação de cafeína mediante processos enzimáticos realizados no estudo piloto. ....	53
Tabela 14- Taxa de degradação avaliada através do planejamento fatorial. ....	54
Tabela 15- Análise de variância (ANOVA) do delineamento fatorial. ....	54
Tabela 16- Influência do pH na degradação de variados compostos recalcitrantes por lacase. ....	63
Tabela 17- Degradação de compostos recalcitrantes pela enzima lacase. ....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ABTS	Ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazole-6-sulfonato
AE	Acetato de etila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDA	Batata dextrose ágar
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CQA	Ácido cafeoilquínico
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
D	Fator de diluição
DAQBi	Departamento Acadêmico de Química e Biologia
DBB	Planejamento box-behnken
DCM	Diclorometano
EAG	Equivalente de ácido gálico
ECAT	Equivalente de catequina
ET	Equivalente de Trolox
F	Fator de atividade enzimática
FQA	ácidos feruloilquínicos
HBA	Ácido 4-hidroxibenzoico
ICO	Organização Internacional do Café
LAMEAA	Laboratório de Multiusuários de Equipamentos e Análises Ambientais
MnSO <sub>4</sub>	Sulfato de manganês
MS	Matéria seca
NMT	N-metiltransferase
SAM	S-adenosilmetionina
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UV/VIS	Espectroscopia ultravioleta/visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Café.....</b>	<b>16</b>
3.1.1	A produção do café .....	16
3.1.2	A composição do café .....	18
3.1.3	Classificação do café.....	20
<b>3.2</b>	<b>Compostos bioativos .....</b>	<b>20</b>
3.2.1	Cafeína.....	22
3.2.2	Ácidos Clorogênicos.....	25
3.2.3	Trigonelina.....	26
<b>3.3</b>	<b>Processo de descafeinação .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4</b>	<b>Lacase .....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Reagentes, Meios e Nutrientes.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Obtenção do Fungo <i>Trametes villosa</i> e condições de Cultivo.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparo do Meio de Cultura Líquido.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4</b>	<b>Obtenção do Extrato Enzimático e Determinação da Atividade de Lacases.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5</b>	<b>Otimização da extração de cafeína dos grãos verdes de café .....</b>	<b>37</b>
<b>4.6</b>	<b>Determinação de compostos fenólicos totais .....</b>	<b>38</b>
<b>4.7</b>	<b>Determinação de Flavonoides Totais .....</b>	<b>39</b>
<b>4.8</b>	<b>Degradação da Cafeína por Lacase .....</b>	<b>39</b>
<b>4.9</b>	<b>Cinética de degradação .....</b>	<b>42</b>
<b>4.10</b>	<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</b>	<b>42</b>
<b>4.11</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Otimização da extração de cafeína de grãos verdes de café .....</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>Quantificação de Flavonoides Totais e Compostos Fenólicos Totais.....</b>	<b>49</b>

<b>5.3</b>	<b>Otimização dos Procedimentos Analíticos para Determinação de Cafeína.....</b>	<b>51</b>
<b>5.4</b>	<b>Degradação de Cafeína Padrão.....</b>	<b>52</b>
5.4.1	Influência de Solventes Orgânicos .....	56
5.4.2	Influência do Mediador Ácido 4-hidroxibenzoico (HBA) e do pH.....	57
<b>5.5</b>	<b>Cinética de Degradação da Cafeína.....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>68</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O café está entre as bebidas mais consumidas mundialmente. Este produto é fundamental para a economia de países como o Brasil que apresentou produção de 58 milhões de sacas em 2018, o que representa 36% da produção mundial (ICO, 2018). Diversos compostos como metilxantinas, diterpenos, compostos fenólicos podem ser encontrados no café, o que resultam em diferentes atividades biológicas.

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina), principal metilxantina do café, atua no sistema nervoso central, sendo responsável pelas características estimulantes da bebida (LUDWIG *et al.*, 2014; NAJAFI; HAMID; AFSHIN, 2003). Entretanto, o excesso de cafeína no organismo pode apresentar efeitos negativos, como mudanças agudas na pressão arterial (TURNBULL *et al.*, 2017), alteração de alguns fatores que influenciam na saúde cardiovascular (ALMEIDA; PEREIRA; MOREIRA, 2013) e evidências epidemiológicas relacionadas ao câncer (ARAB, 2010). Além disso, a cafeína e os diterpenos podem gerar outros efeitos negativos à saúde, tais como o aumento da fração lipídica e modificar a função endotelial (GODOS *et al.*, 2014).

Devidos aos efeitos negativos gerados pela ingestão excessiva de cafeína há um aumento do consumo de café descafeinado, preconizando o desenvolvimento de diversos métodos para remoção deste alcaloide (RAMALAKSHMI; RAGHAVAN, 1999). Entre os procedimentos convencionais de descafeinação se destacam os seguintes solventes: água, acetato de etila, CO<sub>2</sub> supercrítico ou líquido e cloreto de metileno (ICO, 2009). Entretanto, a remoção de compostos por solventes orgânicos vem sendo substituída por solventes menos agressivos ao meio ambiente. Além disso, esses solventes podem extrair compostos que são interessantes para as características sensoriais do café, o que pode influenciar na qualidade do produto.

No ponto de vista ecológico, fungos basidiomicetos como o *Trametes villosa* desempenham uma importante função na produção de enzimas lignolíticas como a lacase (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioxigene-redutase), obtendo-se um conjunto de enzimas pertencentes à família das *multicopper blue* oxidases. Essas enzimas apresentam como função catalisar a oxidação ou a redução de diversos compostos, incluindo a cafeína. O meio de degradação de compostos recalcitrantes realizada por fungos da podridão branca compreende as enzimas do grupo fenoloxidasas, como a lignina peroxidases (LiPss), manganês peroxidase (MnPs) e lacases. Cada fungo apresenta uma diferente habilidade de degradação desses compostos em razão de

propriedades individuais qualitativas e quantitativas de suas enzimas (KAMIDA *et al.*, 2005).

Deste modo, novas técnicas de descafeinação são necessárias visando o meio ambiente, saúde humana e custo de aplicação do processo. O objetivo desta pesquisa foi aplicar a lacase na degradação de cafeína como um eficiente biocatalisador através de um método simples e eficaz. Variáveis como temperatura, tempo de reação, pH, agitação e concentração do mediador sobre a atividade enzimática foram estudados. A estabilidade operacional e os parâmetros cinéticos também foram avaliados visando as melhores condições para degradar a cafeína.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de degradação da cafeína através da enzima lacase.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar as melhores condições para extração de compostos bioativos do café;
- Otimizar a extração da cafeína dos grãos verdes de café através do planejamento fatorial Box-Behnken;
- Avaliar a concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides totais após a extração da cafeína;
- Produzir as lacases através do cultivo do fungo *Trametes villosa*;
- Determinar as melhores condições cromatográficas para análise do perfil e concentrações de cafeína;
- Otimizar a degradação da cafeína por meio de delineamento fatorial.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

#### 3.1 Café

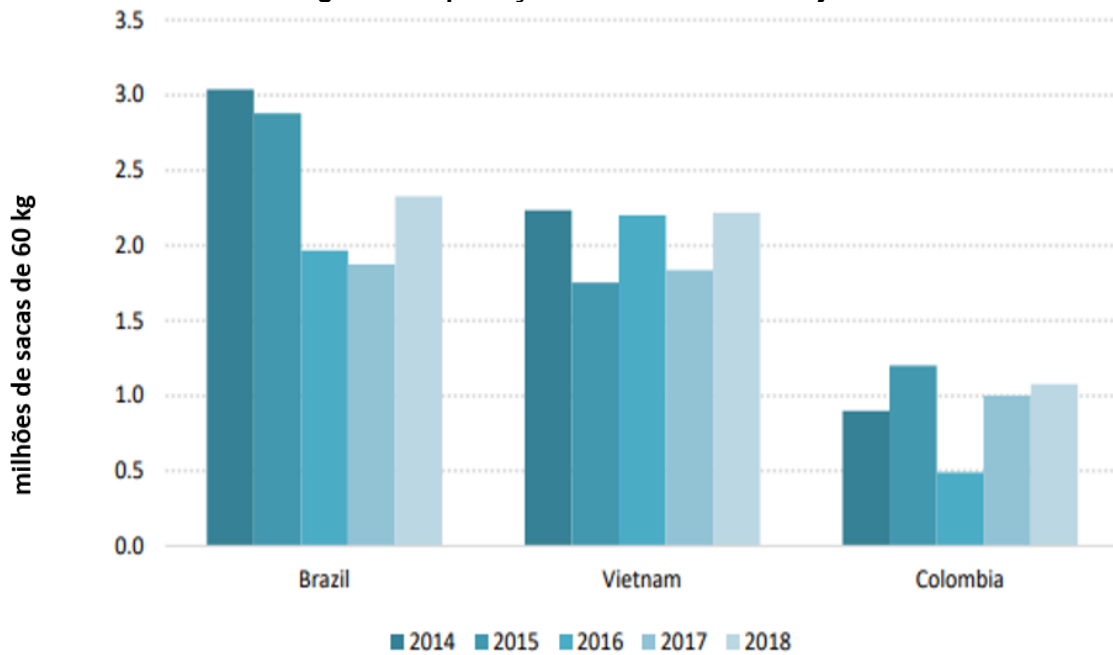
##### 3.1.1 A produção do café

Em todas as partes do mundo o consumo de café está crescendo anualmente, onde há investimentos governamentais e privados em pesquisas sobre este fruto, tendo como objetivo melhorar a qualidade das sementes e bebidas, bem como a ampliação do mercado e surgimento de novas cafeterias (EUROMONITOR INTERNATIONAL, 2015). De acordo com a Organização Internacional do Café (ICO), os maiores produtores e exportadores mundiais do café são o Brasil, em primeiro lugar, com 58 milhões de sacas, compreendendo 36% do total produzido; seguido do Vietnã, segundo lugar, com 29,5 milhões de sacas, com 18% da produção global; Colômbia, em terceiro, com 14 milhões de sacas, sendo 9% da produção mundial; Indonésia, quarto, com 12 milhões de sacas, com 8% da produção mundial e Honduras na sequência com 8,3 milhões de sacas, apresentando cerca de 5% da produção mundial (ICO, 2018).

O Brasil aumentou suas exportações em 24,2% em julho de 2018, passando a 2,33 milhões de sacas. Os 10 primeiros meses de 2017 e 2018 cerca de 4% a menos foram exportados pelo Brasil do que períodos de outubro de 2016 a julho de 2017. Devido à greve nacional de caminhoneiros que ocorreu em maio de 2018, o total exportado neste mês foi muito menor do que em anos anteriores. Porém houve uma recuperação nos meses seguintes, atingindo 4,9 milhões de sacas, que corresponde a 19,9% acima que 2017 e 10,3% acima que 2016. O Vietnã aumentou em 20,7% suas exportações de julho de 2017 até julho de 2018. O progresso das exportações do Vietnã está relacionado ao aumento da produção estimado em 15,5% para 29,5 milhões de sacas em 2017/18. Por sua vez, a Colômbia teve um crescimento de 7,5% em julho de 2018, chegando a 1,08 milhão de sacas, porém o total exportado pelo país no período de outubro de 2017 a julho de 2018 foi 5,4 % menor (ICO, 2018). A Figura 1 apresenta os maiores exportadores mundiais de café no mês de julho entre os anos de 2014 e 2018.



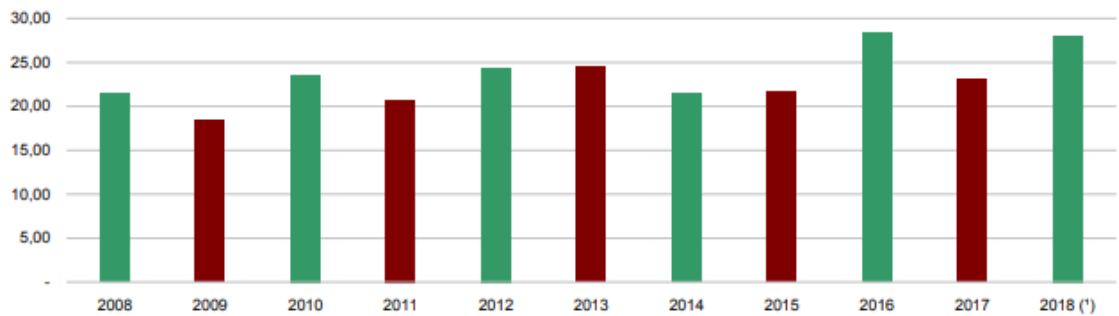
**Figura 1- Exportações de café no mês de julho.**



Fonte: ICO (2018).

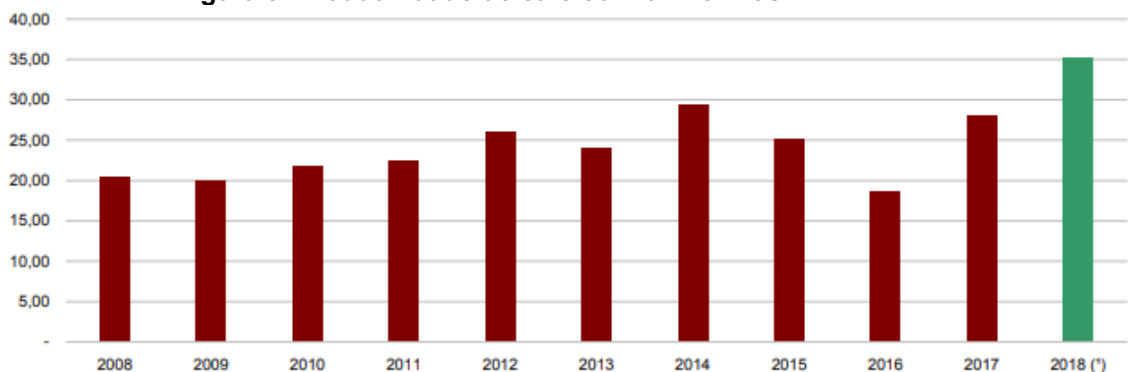
Em relação à produção de café no Brasil, a classificação dos 6 maiores estados produtores em 2018, em ordem decrescente Minas Gerais (30,7 milhões de sacas, 53% da produção), Espírito Santo em segundo (12,81 milhões de sacas, 22% da produção); São Paulo (6,07 milhões de sacas, 10% da produção), Bahia (4,50 milhões de sacas, 8%), Rondônia (2,19 milhões de sacas, 4%) e Paraná (1,05 milhões de sacas, 2% da produção) foram os principais estados produtores de café em 2018 (ICO, 2018).

A produtividade total para o ano de 2018 (Figuras 2 e 3) está prevista com um aumento entre 28,41 e 30,54 sacas por hectare, o que representa um acréscimo de 17,7% a 26,5% comparado com a safra anterior. A espécie arábica é mais afetada pelo ciclo bienal, característica natural causada pelo esgotamento da planta, sendo que no ano negativo ela se recupera para melhorar a produção do próximo ano. Em alguns estados ocorrem algumas exceções, como o Paraná, onde o inverno rigoroso de 2013 inverteu seu ciclo bienal (CONAB, 2018).

**Figura 2- Produtividade de café arábica no Brasil.**

Fonte: CONAB (2018).

A espécie conilon é mais resistente a pragas, suporta temperaturas mais elevadas e deficiência hídrica. Além disso, apresenta maior produtividade (Figura 3).

**Figura 3- Produtividade de café conilon no Brasil.**

Fonte: CONAB (2018).

A alta produtividade de café no Brasil implica no maior consumo da bebida. O café normalmente consumido como uma bebida quente ou gelada, sendo muito apreciado por seu sabor e aroma. Essas bebidas apresentam propriedades interessantes devido a sua composição. Esses aspectos serão abordados nos próximos tópicos.

### 3.1.2 A composição do café

Os compostos bioativos encontrados no café são os principais responsáveis por determinadas características da bebida. A Tabela 1 apresenta as principais características sensoriais do café descritas pela literatura, bem como os compostos relacionados a tais atributos.

**Tabela 1- Características sensoriais do café; todo sabor do café está relacionado aos sentidos, principalmente o paladar e o olfato, geralmente ambos funcionam em conjunto quando se trata de degustar o café.**

<b>Compostos</b>	<b>Característica sensorial</b>	<b>Referência</b>
Ácido Clorogênico	Adstringência, amargor e acidez.	FARAH, 2012; SALVA; LIMA, 2007.
Cafeína	Amargor	MARTINEZ <i>et al.</i> , 2014; ESTEBAN-DÍEZ; GONZÁLEZ-SÁIZ, 2004;
Carboidratos	Corpo, amargor, espuma	BELCHIOR <i>et al.</i> , 2017; PIAZZA; GIGLI; BULBARELLO, 2008;
Lipídios	Corpo, amargor, aroma, espuma	ESTEBAN-DÍEZ; GONZÁLEZ-SÁIZ, 2004; MARQUETTI, 2014; PIAZZA; GIGLI; BULBARELLO, 2008; IVAMOTO <i>et al.</i> , 2017;
Proteína	Corpo, espuma	ESTEBAN-DÍEZ; GONZÁLEZ-SÁIZ, 2004; PIAZZA; GIGLI; BULBARELLO, 2008;
Trigonelina	Amargor, aroma	FARAH, 2012; MONTEIRO; TRUGO, 2005;

**Fonte: Autoria própria (2021).**

Estudos sobre o consumo do café e estresse oxidativo têm referido que o consumo regular do café está relacionado com aumento dos níveis de glutathione e a melhoria da proteção contra danos no DNA (MARTINI *et al.*, 2016). Outros estudos relacionados ao café têm demonstrado efeitos benéficos como a redução dos riscos de desenvolvimento de derrame e certos tipos de câncer, redução do risco de Parkinson e demência e o aumento na concentração e memória devido à grande variedade de compostos protetores presente nos grãos de café (SAGON; AARP, 2013). Pode-se relacionar o aroma do café à composição química das sementes (Tabela 1). Durante o processo de torrefação ocorrem várias modificações químicas nesses compostos, provocando uma grande diversidade de compostos voláteis. Contudo, existem condições que podem afetar a composição química das sementes, como o solo, clima, espécies e cultivares de café, tipo de mistura, processamento pós-colheita, tipo de torrefação e armazenamento (TOLEDO *et al.*, 2016).

### 3.1.3 Classificação do café

A classificação do café ocorre uma etapa antes do processo de torrefação, onde são avaliados diferentes parâmetros de qualidade, incluindo impurezas, tamanho, cor, aroma e sabor. Esta etapa é realizada por meio da classificação do produto, que acontece antes do armazenamento do café (THOMAZIELLO, 2014).

A classificação do café ocorre com critérios em três diferentes categorias: tipo ou quantidade de defeitos, características da qualidade do produto e pelo tipo de bebida que apresenta (THOMAZIELLO, 2014).

**Tabela 2- Classificação do tipo de café em relação a quantidade de defeitos.**

<b>Tipo de café</b>	<b>Quantidade de defeitos (300g)</b>
Café tipo 2	4
Café tipo 3	5 a 12
Café tipo 4	13 a 26
Café tipo 5	27 a 46
Café tipo 6	47 a 86
Café tipo 7	87 a 160
Café tipo 8	341 a 360

**Fonte: Aatoria própria (2021).**

A classificação quanto ao tipo de café é feita com uma amostra de 300 g, onde, são atribuídos valores de 2 a 8 de acordo com a Tabela 2. Os números indicam a quantidade de defeitos presentes na amostra, onde será classificado conforme este valor. Os tipos 2 e 3 apresentam melhor qualidade, já os tipos 6, 7 e 8 são de qualidade inferior. É necessário realizar um fracionamento e uma composta das sacas para depois misturar essas frações e a partir delas coletar a amostra de 300 g para a classificação do tipo de café (THOMAZIELLO, 2014).

## 3.2 Compostos bioativos

Compostos bioativos são compostos que apresentam atividade biológica em um organismo vivo, tecido ou célula. Dentre eles, se destacam os compostos fenólicos, os quais são encontrados nas plantas, uma vez que são metabólitos secundários produzidos frente a adversidades como clima, qualidade do solo, excesso de radiação ultravioleta, etc. Dessa forma, estes compostos estão presentes em alimentos e bebidas de origem vegetal, tais como chá preto, vinho tinto maturado,

café, cacau (CROZIER; JAGANATH; CLIFFOR, 2009), nozes, frutas cítricas, romã, vinho tinto, uva e mirtilo (DEL RIO et al., 2013).

Em aspectos semelhantes sobre o café na saúde a capacidade antioxidante e o alto consumo são relacionados com maior frequência. No café, os compostos bioativos são representados por compostos antioxidantes, que incluem compostos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos cafeico, ferúlico, cumarico e clorogênico), compostos aromáticos, melanoidinas (produzidas pela reação de Maillard) e a cafeína (LIMA et al., 2010; PASTORIZA; RUFÍAN-HENARES, 2014).

Os compostos fenólicos apresentam características antioxidantes, que refletem na sua capacidade de reduzir a atividade de radicais livres. Os radicais livres estão presentes no organismo desempenhando importantes processos metabólicos. Diversos fatores como estresse, excesso de alimentos industrializados, exposição à poluição, consumo de nicotina contribuem com o aumento da quantidade de radicais livres no organismo. Entretanto, o excesso desses compostos afeta o sistema biológico por meio de reações como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao material genético. Deste modo, os radicais livres estão associados a doenças como câncer, aterosclerose, diabetes, cardiovasculares e degenerativas como o Alzheimer (XAVIER, 2017).

A partir do café verde, café torrado e café solúvel é possível realizar a extração de compostos fenólicos de diferentes classes. Os processos de extração mais comumente utilizados incluem a extração sólido-líquida contínua (Soxhlet) ou a descontínua através do uso de solventes orgânicos, dentre eles etanol, metanol, isopropanol ou acetona. Apesar do uso de solventes para extração de compostos fenólicos ser bastante utilizado, os compostos químicos presentes podem provocar algumas desvantagens, nas quais a redução ou perda de certos compostos ativos em virtude de processos que acontecem como a ionização, hidrólise ou oxidação no decorrer da extração (UPADHYAY; RAMALAKSHMI; RAO, 2012).

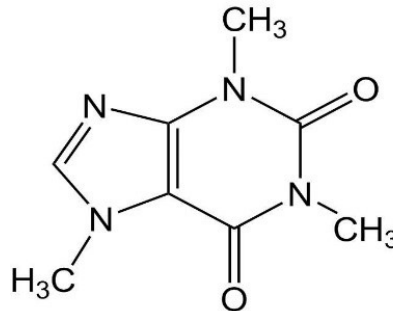
Mussato et al. (2011) trabalharam com a extração de compostos fenólicos antioxidantes de grãos de café utilizando a técnica sólido-líquido e como solvente orgânico o metanol. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram ser um método eficiente na extração de compostos fenólicos antioxidantes, porém a extração de flavonóides, compostos fenólicos totais e ácidos clorogênicos foram acometidos pela concentração de metanol, relação solvente/sólido e tempo de extração utilizado. Apesar de o metanol ser amplamente utilizado nesses processos, a sua característica

tóxica levanta questões importantes, principalmente quando objetivo final dos compostos extraídos utilizando o metanol é o emprego em alimentos e indústrias farmacêuticas.

### 3.2.1 Cafeína

A cafeína (1,3,7N-trimetilxantina) (Figura 4) é um alcaloide de purina com uma vasta ocorrência em diversas plantas, tais como: café, chá, mate, nozes de cola, cacau e guaraná (BORTOLINI et al., 2019; LUDWIG et al., 2014; NAJAFI; HAMID; AFSHIN, 2003). De acordo com Raut et al. (2013) a cafeína apresenta ação quimioprotetora nas plantas, agindo como inseticida, inibidor de fungos e bactérias. Em bebidas como café, chá e erva mate, a cafeína está relacionada ao sabor amargo. A cafeína atua no sistema nervoso central e tem, portanto, propriedades estimulantes, sendo absorvida de maneira muito rápida, em aproximadamente 60 minutos após seu consumo (LANG et al., 2013).

**Figura 4- Estrutura química da cafeína.**



**Fonte: Farah (2012).**

As quantidades de cafeína entre as espécies de café variam, como exemplo *C. canephora* (1,5 – 2,5 g/100 da matéria seca (MS) em sementes verdes) e *C. arabica* (0,9–1,3 g/100 da MS em sementes) devido às condições genéticas e ambientais (FARAH, 2012). Além disso, efeitos como altitude, sombra e processamento pós-colheita influenciam a quantidade de cafeína e outros compostos bioquímicos na qualidade de grãos verdes de café arábica (WORKU et al., 2018). A Tabela 3 apresenta diferentes formas de verificar o teor de cafeína em diferentes amostras.

**Tabela 3- Métodos de análise adotados para verificar o teor de cafeína entre diferentes tipos de café em regiões diversificadas.**

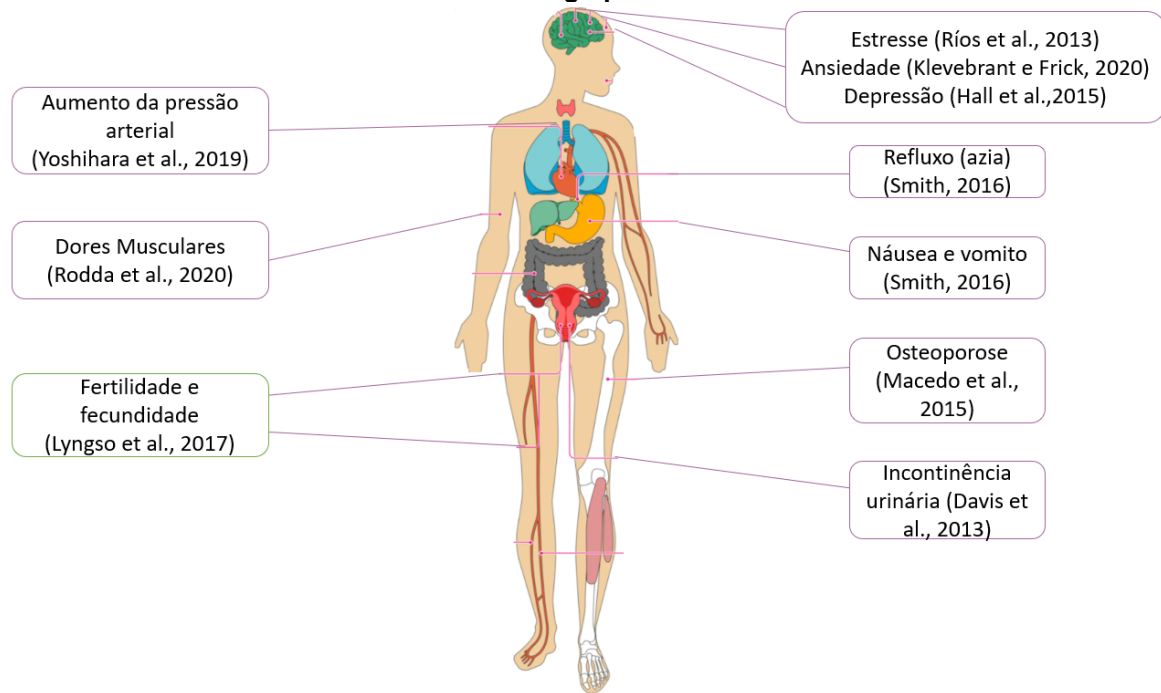
Espécies	Pais de origem	Método de extração	Amostra	Cafeína (mg/g)	Literatura
Robusta	Vietnam	Infusão	Grãos verdes	74,3	(Jeszka-Skowron <i>et al.</i> , 2016)
Robusta	Indonésia	Infusão	Grãos verdes	81,7	(Jeszka-Skowron <i>et al.</i> , 2016)
Arábica	Brasil	Infusão	Grãos verdes	36,2	(Jeszka-Skowron <i>et al.</i> , 2016)
Arábica	Laos	Infusão	Grãos verdes	38,5	(Jeszka-Skowron <i>et al.</i> , 2016)
Arábica	China	Infusão	Grãos verdes	34,1	(Jeszka-Skowron <i>et al.</i> , 2016)
Arábica	Etiópia	Clorofórmio	Grãos verdes	35,6	(Asfew; Dekebo, 2019)
Arábica	Brazil	Metanol/água (70:30 v/v)	Grãos verdes	12,74	(De Luca <i>et al.</i> , 2018)
Arábica	Costa Rica	Metanol/água (70:30 v/v)	Grãos verdes	44,69	(De Luca <i>et al.</i> , 2018)
Arábica	Kenya	Metanol/água (70:30 v/v)	Grãos verdes	25,52	(De Luca <i>et al.</i> , 2018)
Arábica	México	Metanol/água (70:30 v/v)	Grãos verdes	36,91	(De Luca <i>et al.</i> , 2018)
Robusta	Vietnam	Metanol/água (70:30 v/v)	Grãos verdes	61,53	(De Luca <i>et al.</i> , 2018)
Robusta	Índia	Infusão	Café em pó	23,2	(Macheiner <i>et al.</i> , 2019)
Arábica	Brasil	Infusão	Café em pó	13,2	(Macheiner <i>et al.</i> , 2019)
Arábica	Guatemala	Infusão	Grãos verdes	14,2	(Macheiner <i>et al.</i> , 2019)

**Fonte: Autoria própria (2021).**

O consumo da cafeína apresenta muitos benefícios, como mencionado anteriormente. Porém, estudos relacionados a sintomas menos conhecidos indicam que ela pode apresentar efeitos negativos (Figura 5) para pessoas com pressão alta, diabetes e osteoporose. A cafeína também pode interagir mal com certos medicamentos comuns, agravando alguns sintomas como insônia, ansiedade e azia. A maioria dos especialistas em saúde indica um consumo máximo diário de cafeína

de 300 mg, sendo considerada uma dose segura e moderada para o dia a dia (SAGON; AARP, 2013).

**Figura 5- Efeitos negativos da cafeína no corpo humano devido ao excesso e uso moderado a longo prazo.**

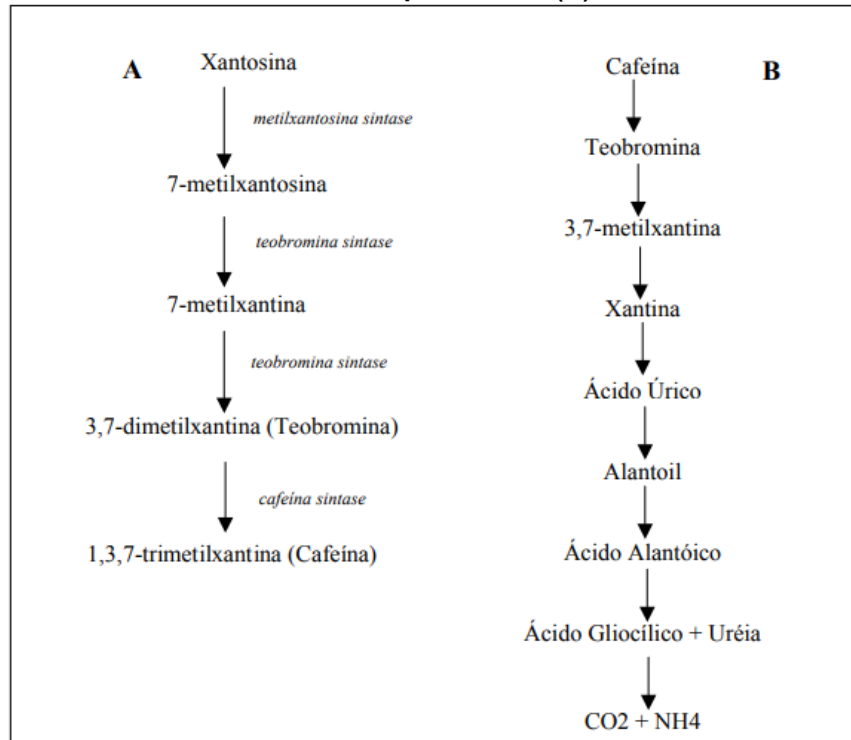


Fonte: Autoria própria (2021).

A biossíntese da cafeína apresenta três vias possíveis, a começar da xantina ou xantosina (HUANG et al., 2016). Na espécie *C. arabica*, a principal via começa com a xantosina (nucleosídeo xantina) sofrendo três N metilações ordenadas nas posições 7, 3 e 1. A metilação da xantosina 7 ocorre através da N-metiltransferase (NMT) dependente da S-adenosilmetionina (SAM) que é um cofator enzimático ao mesmo tempo que a metilação nas posições 3 e 1 podem ser catalisadas por uma única proteína com dupla atividade ou por enzimas individuais. A biossíntese pode ser explicada pela Figura 6. A participação de uma ou duas enzimas nas últimas reações depende de diversas condições, tais como: tecido, desenvolvimento e ambiente, de maneira independente a metilação -3 resultarão na formação de teobromina, este alcaloide precede a da cafeína (DENOEUDE et al., 2014; JIN et al., 2014; MIZUNO et al., 2003).



**Figura 6- Processos que ocorrem nas vias de síntese da planta (A) e na degradação da cafeína no corpo humano (B).**



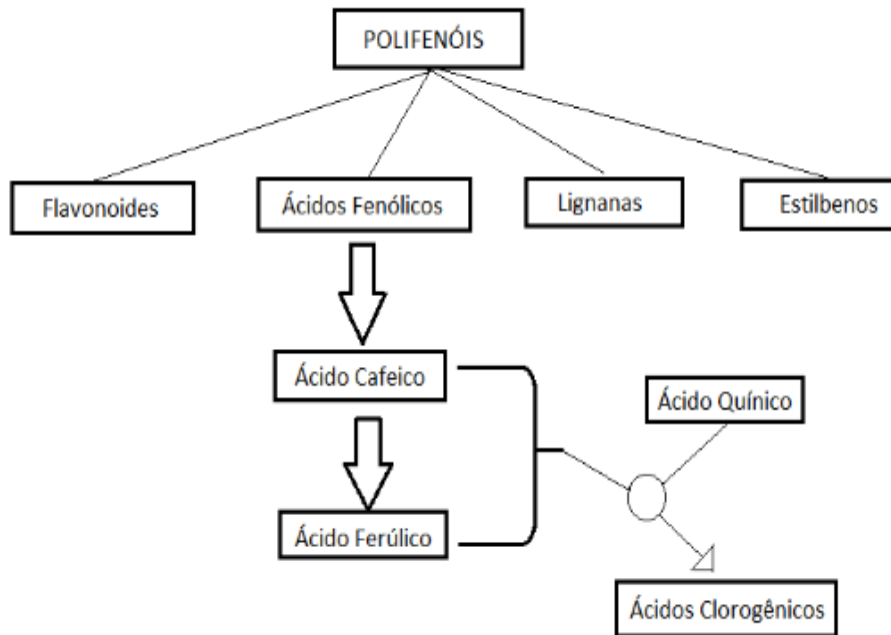
Fonte: Oliveira (2007).

### 3.2.2 Ácidos Clorogênicos

O ácido clorogênico integra um grupo de ésteres constituídos de ácidos transcinâmicos, dentre eles o ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido quinico são os principais (Figura 7). Outros compostos, incluindo os ácidos cafeoilquínicos (CQA) e os ácidos feruloilquínicos (FQA), nos quais podem ser identificados em diversas formas isoméricas, são formas resultantes de ácidos clorogênicos. O principal isômero e mais frequentemente encontrado no ácido clorogênico é o ácido 5-O-cafeoilquínico (CANO-MARQUINA; TARÍN; CANO, 2013).

Os compostos fenólicos mais abundantes no café são os ácidos fenólicos. O principal ácido fenólico do café é o ácido cafeico, que por sua vez, não apresenta relação com a cafeína. O ácido cafeico pode ser convertido em ácido ferúlico, outro tipo de ácido fenólico pela intervenção da enzima catecol-O-metiltransferase (COMT). Nas duas situações os compostos são capazes de gerar uma ligação éster juntamente com ácido quinico e formar um isômero de maneira aleatória presente na família dos ácidos clorogênicos (CANO-MARQUINA; TARÍN; CANO, 2013).

Figura 7- Os polifenóis mais abundantes no café.



Fonte: Cano-Marquina; Tarín; Cano (2013).

Os ácidos clorogênicos dentre os compostos fenólicos são os mais abundantes no café, caracterizando 98% de seu conteúdo fenólico total, onde os restantes 2% são compostos de alquilmetoxifenóis, alquilfenóis, metoxifenóis e outros como pirogalol, catecol e fenol (TRESSERRA-RIMBAU et al., 2014).

Garambone e Rosa (2007), em estudos relacionados aos benefícios do ácido clorogênico, obtiveram em todos os testes realizados *in vitro* resultados promissores indicando o ácido clorogênico como um potente antioxidante.

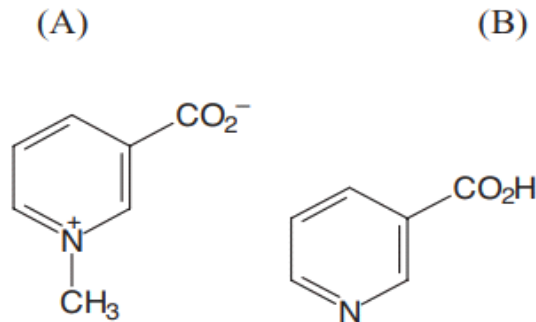
Yan et al. (2017) estudaram os efeitos do ácido clorogênico sobre o carcinoma hepatocelular e obtiveram como resultado a quimioproteção e a prevenção do avanço do carcinoma. O ácido clorogênico é importante na dieta humana, pois de acordo com estudos epidemiológicos realizados reduz o risco de algumas doenças crônicas e o câncer.

### 3.2.3 Trigonelina

A trigonelina é um alcalóide com fórmula  $C_7H_7NO_2$  (Figura 8A), procedente da metilação enzimática do ácido nicotínico. No café, este alcaloide colabora para com o sabor amargo da bebida. Durante o processo de torrefação ocorre a desmetilação da trigonelina, produzindo o ácido nicotínico (Vitamina B3). Durante o processo de

torrefação, aproximadamente 60% da trigonelina inicial degrada-se, desde modo ocorrerá a formação de dióxido de carbono, água e a formação de compostos aromáticos, como pirróis e piridinas responsáveis pelo aroma (FARAH, 2012).

**Figura 8- Estrutura Química da trigonelina (A), Ácido Nicotínico (B).**



Fonte: Farah (2012).

Vignoli et al. (2014), no estudo do processo de torrefação e seus efeitos nos compostos bioativos, observaram níveis de trigonelina que variaram de 3,3 a 1,4/100 g para espécie arábica e de 2,2 a 0,2 g/100 g para robusta. Estes níveis de trigonelina tiveram uma redução de cerca de 90% após o processo de torrefação.

Farah et al. (2006), na avaliação entre qualidade do copo e atributos químicos do café brasileiro, observaram que quando a qualidade dos grãos verdes era ruim, os níveis de trigonelina reduziram de 1,34 g/100 g MS a 0,96 g/100 g MS. Alves et al. (2007) estudaram a composição química de cafés torrados do cerrado e do Sul de Minas Gerais e verificaram a diminuição do teor de trigonelina com perda da qualidade do café, independentemente da região obtida.

### 3.3 Processo de descafeinação

De acordo com a resolução RDC nº277, de 02 de setembro de 2005, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece que o produto considerado descafeinado deve apresentar o valor máximo permitido para cafeína de 0,1% (g/100g) e caso seja um descafeinado solúvel, o valor máximo poderá chegar até 0,3 (g/100g) (BRASIL, 2005).

Devidos aos efeitos negativos gerados pela cafeína sobre a saúde, houve um aumento do consumo de café descafeinado, estabelecendo o desenvolvimento de

diversos métodos para remoção deste alcalóide. O processo de descafeinação ocorre nos grãos verdes inteiros antes da etapa de torrefação (LIMA et al., 2010).

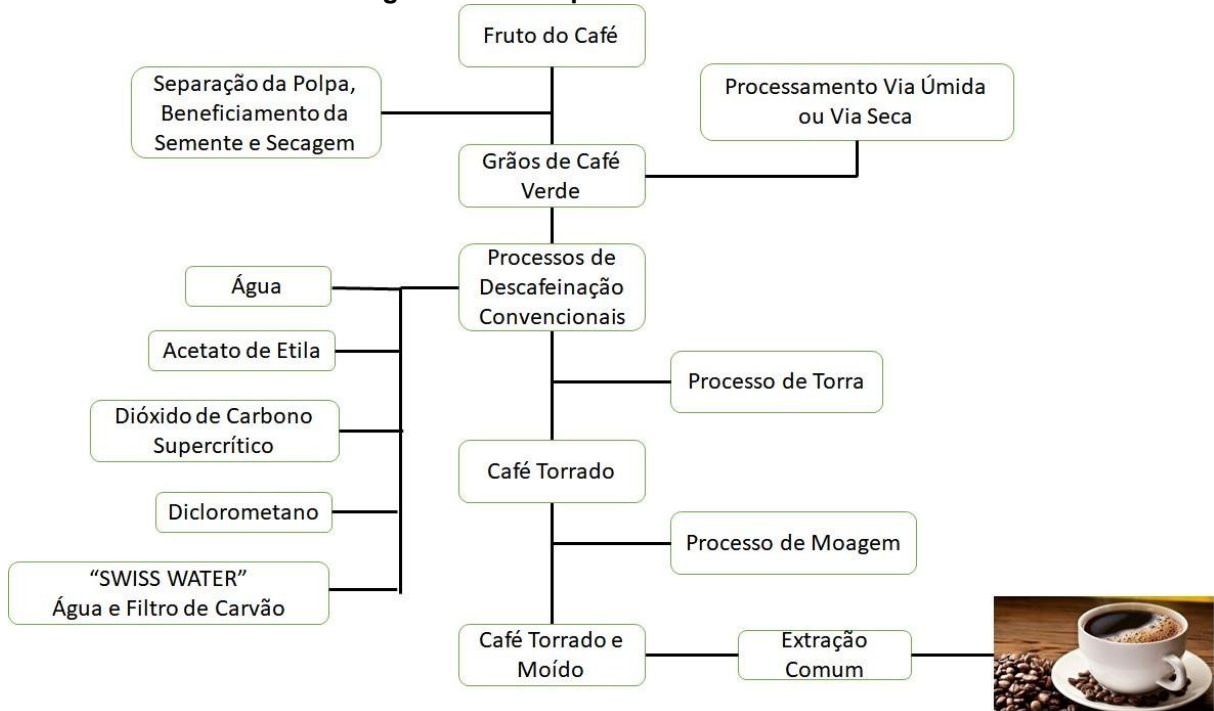
O núcleo de pesquisa orientado a problemas – SP (NPOP-IAC) é voltada ao desenvolvimento de cultivares arábica sem a cafeína. Este estudo apresenta um método alternativo que através da edição genômica obter uma cultivar sem ou com níveis baixos de cafeína. O método proposto consiste no silenciamento do gene responsável pela síntese da cafeína nas plantas. Este conhecimento será aplicado em variedades comerciais que já contém qualidades agrônomicas e industriais interessantes (FILHO, 2021).

Em setores da indústria os grãos de café são submetidos a processos de descafeinação, sendo diferenciados em quatro procedimentos, geralmente de acordo com o solvente usado para extração da cafeína (água, acetato de etila, CO<sub>2</sub> supercrítico ou líquido e cloreto de metileno). Entre as etapas básicas (Figura 9), são descritos quatro meios de processamento, os quais incluem: aumento do volume dos grãos de café verde em água ou vapor para disponibilizar a cafeína para extração, processo de extração da cafeína dos grãos, utilização de vapor para remoção de todos os resíduos de solventes dos grãos (se aplicados) ou recuperação dos adsorventes (se aplicados) e a reintegração da sua quantidade normal de umidade através da secagem dos grãos de café descafeinado (ICO, 2009).

Para o processo de extração da cafeína ser bem eficaz, o controle das condições operacionais deve ser rigoroso, dentre elas a pressão, temperatura e tempo, que se fundamentam em mecanismos da etapa de transferência física. Em razão da diferença de concentração, a transferência da cafeína acontece por difusão, da estrutura celular para o solvente, que contorna o grão até o momento que a concentração da cafeína é a mesma dentro e fora do mesmo (ICO, 2009).

Dentre os quatro métodos utilizados para descafeinação, o que diferencia é a seleção da substância para extração. Método hídrico: Durante a imersão do café verde em água, a cafeína presente é dissolvida e removida. Com este processo é possível que haja grande perda da parcela do caráter aromático do café. Com finalidade de resolver este problema, o líquido é saturado juntamente com os elementos hidrossolúveis do café. Seguidamente, é utilizado carbono ativado ou outros adsorventes para remoção da cafeína, que a mantém para posteriormente o extrato já sem a cafeína pode ser reciclado (ICO, 2009).

**Figura 9- Processamento do café e diferentes métodos convencionais de descafeinação nos grãos verdes aplicados na indústria.**



Fonte: Autoria própria (2021).

Método do acetato de etila (AE): no decurso da descafeinação, utiliza-se uma combinação de água e acetato de etila. É realizado o AE circular em torno dos grãos embebidos em água em um recipiente destinado à extração da cafeína. Desse modo é escoado do recipiente a mistura contendo água, acetato de etila e cafeína. Assim repetidamente esta fase ocorre, até o momento em que a quantidade residual de cafeína tenha atingido ou esteja abaixo do nível máximo autorizado por lei de 0,1% (ICO, 2009).

Método do dióxido de carbono supercrítico e método do dióxido de carbono líquido: o dióxido de carbono é um composto de alta pureza, podendo ser encontrado no ar e na água. Em determinados estados, o CO<sub>2</sub> possibilita a extração seletiva de cafeína, não afetando a maior parte dos demais componentes do grão. A utilização do CO<sub>2</sub> em condição supercrítica (a meio de seus estados líquido e gasoso) solicita uma pressão alta (até 250 atmosferas). Para que este processo seja financeiramente possível há necessidade de uma produção em larga escala. Também é viável a utilização de CO<sub>2</sub> líquido na extração da cafeína, porém há necessidade de pressões e temperaturas menores e requer mais tempo para realizar a extração (ICO, 2009).

Método do cloreto de metileno (i. e. Diclorometano - DCM): neste método, a cafeína é extraída de maneira seletiva e apresenta um ponto de fervura baixo. O

processo decorrente no recipiente faz com que o DCM contorne em volta dos grãos embebidos na água para retirar a cafeína. Esta etapa se repete muitas vezes, até a quantidade residual de cafeína tenha atingido ou encontre-se abaixo do teor máximo permitido por lei de 0,1% (ICO, 2009).

Abraão et al. (2008) na análise de compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida, observaram a influência que o processo de descafeinação acomete a qualidade sensorial do café; a utilização do diclorometano e etapas como torração alteram a concentração dos compostos bioativos e o único composto que permanece estável durante as etapas de processamento é a cafeína.

Toci, Farah e Trugo (2006) avaliaram que o diclorometano aplicado no processo de descafeinação afeta a composição química das espécies *C. arabica* e *C. canephora*. Outros compostos como sacarose e ácidos clorogênicos (ácido 5-cafeoilquínico) também foram reduzidos. O composto que sofreu maior impacto da descafeinação foi o teor de proteínas. Todas estas alterações causam modificações nas características sensoriais da bebida e em termos fisiológicos.

Diversos estudos relatam a degradação da cafeína por microrganismos (IBRAHIM et al., 2014; SUMMERS et al., 2015; THATHOLA et al., 2021; SHANMUGAM et al., 2021; NANJUNDAIAH et al., 2017; GOKULAKRISHNAN, et al., 2005) porém nenhum relata uma enzima com capacidade de degradação deste composto. Diante disso, as características da enzima lacase se mostram promissoras na degradação de compostos recalcitrantes, bem como no desenvolvimento e estudos de metodologias aplicadas à descafeinação do café.

### **3.4 Lacase**

A aplicação industrial utilizando enzimas tem sido de grande importância nos últimos anos. As enzimas devido à sua alta eficiência, alta seletividade e reações ambientalmente benignas têm chamado muita atenção para o tratamento ou a remoção de poluentes ambientais e industriais (VISWANATH et al., 2014).

Enzimas como a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacases fúngicas englobam as principais classes que foram analisadas para a remoção de compostos fenólicos tóxicos de efluentes industriais e a degradação de xenobióticos resistentes. Contudo, diversos relatórios acerca de melhorias na produção dessas

enzimas foram publicados recentemente, como mudança nas condições de crescimento, utilização de substratos e indutores de crescimento de menor preço (resíduos agrícolas e alimentares) e a descoberta de novas cepas de fungos (VISWANATH et al., 2014).

Na natureza as lacases são enzimas produzidas por plantas, fungos, bactérias e insetos (WANG et al., 2015). Estes biocatalisadores são diferenciados nos diversos organismos, porém todas elas catalisam processos de polimerização e despolimerização (RIVA, 2006).

A primeira lacase foi relatada em 1883 em uma árvore da espécie *Rhus vernicifera*, a laca japonesa cujo nome lacase foi derivada; deste modo a enzima foi caracterizada como um metal contendo oxidase (BERTRAND, 1985).

Um ponto em destaque das lacases se refere à possibilidade de melhorar as taxas de oxidação de poluentes e amplificar a gama de compostos oxidáveis por intermédio de mediadores redox. São substratos de baixa massa molecular de lacase onde são oxidados enzimaticamente para produção de radicais orgânicos, das quais posteriormente oxidam compostos adicionais de uma maneira abiótica (JAHANGIRI et al., 2017).

A imobilização de enzimas é um processo de muito interesse na área de biotecnologia industrial, a elaboração otimizada desses biocatalisadores torna possível sua aplicação a operações de processo contínuo, facilitando a intensificação da técnica. A utilização destes biocatalisadores possibilita recuperação e reutilização, fornecendo uma atividade contínua do reator, sendo uma condição importante para aplicações industriais devido à custos do processo (DEMARCHE et al., 2012).

Contudo, devido à falta de disponibilidade comercial, o uso de isoformas de lacase foi ignorado mesmo apresentando uma ampla variedade de campos. Algumas propostas de aplicações industriais para lacases são relacionadas à indústria de celulose e papel, aplicações têxteis, síntese orgânica e aplicações ambientais, alimentícias, farmacêuticas e nanobiotecnológicas (KUNAMNENI et al., 2008). Na área biotecnológica muitas aplicações resultaram na necessidade de amplificar o espectro de organismos positivos para lacase e utilizar seu potencial de produção de lacase (MACIEL; SILVA; RIBEIRO, 2010).

Devido à necessidade de estabilidade operacional em longo prazo e pela dificuldade em reaproveitar a lacase o emprego industrial da lacase ainda é limitado,

sendo necessária a melhoria das propriedades da enzima, que poderia ser parcialmente resolvido pelo estudo das diversas isoformas (VRSANSKÁ et al., 2017).

As lacases apresentam diversos usos nas indústrias de alimentos, celulose, papel, têxteis, farmacêutica nanobiotecnologia, bem como nas áreas de nanobiotecnologia, síntese orgânica, ambiental. As lacases também são muito utilizadas para imobilização e desenvolvimento de projetos eficientes, de baixo impacto e de baixo custo (KUNAMNENI et al., 2008). A utilização das lacases para aperfeiçoar os parâmetros sensoriais dos produtos alimentícios se amplia aos sistemas de diagnóstico, porém não se limitam aos processos de tratamento. Com base na lacase diversos biossensores amperométricos para verificação do conteúdo de polifenóis em produtos alimentícios foram desenvolvidos, integrando o vinho, cerveja e chá (OSMA; TOCA HERRERA; RODRIGUEZ-COUTO, 2010). Comercialmente, as lacases foram utilizadas para remoção do polímero de lignina estrutural de tecidos de madeira (deslignificar), gerar etanol e diferenciar entre morfina e codeína. Estudos intensos foram realizados nos últimos anos, devido à grande variedade de lacases, seu emprego e suas propriedades interessantes (VISWANATH et al., 2014).

Os fungos da decomposição da madeira chamados de fungos da podridão branca pertencem à classe dos basidiomicetos, os quais são os mais frequentes e eficientes na síntese de enzimas exocelulares, que degradam a lignina, como a lacase. Alguns basidiomicetos podem constituir enzimas ligninolíticas no seu metabolismo secundário, deste modo se tem a necessidade de identificar estes microrganismos e criar estratégias para uma alta produção (ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009).

Os fungos pertencentes à classe dos basidiomicetos podem se reproduzir de duas maneiras: sexuada (esporos) ou assexuada (crescimento vegetativo). Quando a massa micelial está em formação é possível observar em microscópio hifas septadas, bem desenvolvidas, as quais constituem o micélio. Grandes partes dos basidiomicetos em seu desenvolvimento decorrem de três fases miceliais, gerando o micélio primário, secundário e terciário (RAMPINELLI, 2016).

Ling et al. (2015) avaliaram a atividade da lacase extracelular na capacidade de descoloração de corantes da podridão branca do fungo *Trametes sp* e ressaltaram a alta eficiência da produção de lacase com ótimos níveis de rendimento em curtos



períodos de tempo, destacando a importância dessas características para aplicações industrial, ambiental e comercial.

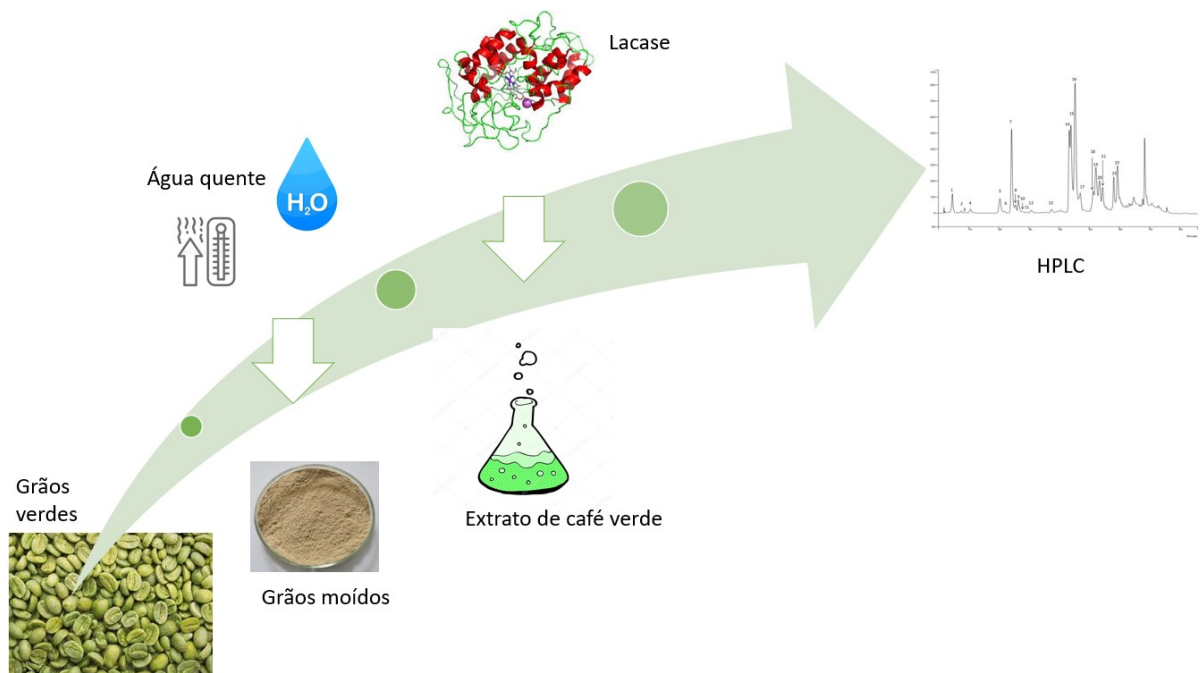
O fungo *Trametes versicolor* pertence à família dos fungos lignolíticos, geralmente encontrado em madeira. Este fungo se localiza na maior parte de países tropicais, apresentando uma extensa distribuição, sendo a espécie mais frequentemente encontrada (ZAMPIERI, 2006).

Durante o crescimento e o tratamento nutricional dos fungos, como exemplo as fontes de nitrogênio ou carbono, é capaz de influenciar o perfil da isoforma da lacase, de modo a prejudicar a produtividade. Uma característica importante se refere ao perfil da lacase e suas concentrações, pois as distintas isoformas apresentam propriedades catalíticas particulares (BERTRAND et al., 2015).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado nos Laboratórios de Biotecnologia, Microbiologia, e Laboratório de Multiusuários de Equipamentos e Análises Ambientais (LAMEAA) do Departamento de Química e Biologia (DAQBi) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). A Figura 10 apresenta as principais etapas realizadas, onde os grãos de café verde foram triturados e padronizados entre 100 e 65 mesh (0,149 mm – 0,212 mm). Os grãos moídos foram submetidos a ensaios de extração a quente, usando água como solvente. Enzimas lacases foram usadas para avaliar a degradação da cafeína da matriz, a qual foi monitorada por meio de análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

**Figura 10- Etapas para obtenção do extrato de café verde, aplicação da lacase e quantificação em CLAE.**



Fonte: Autoria própria (2021).

### 4.1 Reagentes, Meios e Nutrientes

Os reagentes, meios e nutrientes utilizados na pesquisa são descritos na Tabela 4.

Tabela 4- Composição dos nutrientes e reagentes utilizados como base neste experimento.

Item 5.2	Item 5.3	Item 5.4	Item 5.5	Item 5.6	Item 5.7	Item 5.8	Itens 5.9 e 6.0
Batata dextrose ágar (BDA)	Dextrose (Kasvi)	Acetato de sódio (Dinâmica)	Acetonitrila (Honeywell)	Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich)	Nitrito de sódio (Dinâmica)	Trolox (Sigma-Aldrich)	Cafeína (Sigma-Aldrich)
	Peptona (Synth)	ABTS (Sigma-Aldrich)	Metanol (Honeywell)	Carbonato de cálcio (Dinâmica)	Cloreto de alumínio (Synth)	DPPH (Sigma-Aldrich)	Acetato de sódio (Dinâmica)
	Sulfato de manganês (Synth)			Ácido gálico (Sigma-Aldrich)	Catequina (Sigma-Aldrich)	Álcool etílico (Dinâmica)	Metanol (Honeywell)
	Sulfato de cobre (Synth)				Hidróxido de sódio (Synth)		Ácido fosfórico (Sigma-Aldrich)
	Carbonato de sódio (Synth)						

Fonte: Autoria própria (2021).

## 4.2 Obtenção do Fungo *Trametes villosa* e condições de Cultivo

O fungo *Trametes villosa* utilizado para produção de lacase foi gentilmente cedido pelo laboratório de Microbiologia da UTFPR (*Campus Ecoville*) e mantido em ágar batata dextrose até o momento de sua utilização, com repiques a cada 30 dias.

Para seu cultivo foi utilizado Batata dextrose ágar (BDA). O meio de cultura foi previamente autoclavado a 120 °C por 20 minutos, posteriormente o meio foi distribuído em placas de petri e em seguida conservado sob refrigeração a 4 °C. Posteriormente o fungo foi repicado para o meio BDA e transferido para uma estufa a 28 °C, por um período de 7 dias e armazenado sob refrigeração a 4 °C.

## 4.3 Preparo do Meio de Cultura Líquido

Em erlenmeyers contendo 50 mL de água deionizada foi adicionado 0,5 g da casca de arroz, 0,5 g de dextrose como fontes de carbono, 0,4 g de peptona como fonte de nitrogênio, 3 mL de sulfato de manganês (MnSO<sub>4</sub>) e 3 mL de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>). Após a adição dos nutrientes o meio líquido foi autoclavado a 120 °C por 15 minutos (PENARIOL et al., 2008, modificado). Para realizar a transferência do fungo do meio batata-dextrose-ágar (BDA) para o meio líquido, foram utilizados tubos de ensaio com diâmetro em torno de 14 mm para cortar o micélio fúngico. Com o auxílio de palitos de madeira, três discos foram transferidos para cada meio líquido, de modo que o micélio ficasse voltado para parte de cima do meio. Finalmente, o crescimento fúngico ocorreu em estufa a 28 °C por 7 dias.

## 4.4 Obtenção do Extrato Enzimático e Determinação da Atividade de Lacases

Após os sete dias, o meio de cultura líquido foi submetido ao processo de filtração para obtenção do extrato. Foram utilizados papel filtro quantitativo (C40 125 mm) para retenção de resíduos sólidos e o extrato enzimático foi congelado até o momento de sua utilização.

Para determinação da atividade enzimática foram utilizados tubos de ensaios. As leituras foram conduzidas em triplicata, onde se adicionou nos tubos 1,7 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5, 100 microlitros do extrato bruto (diluição 1:150) e 200 microlitros de ABTS. Em seguida, as amostras foram aquecidas em banho maria

por 5 minutos a 40 °C. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (UV-VIS digital microprocessado, modelo UV-M51, marca Bel Photonics) a 420 nm. Para o branco foi substituído o extrato bruto por água destilada, o cálculo para atividade enzimática foi realizado de acordo com a Equação 1:

$$\text{Atividade enzimática} = \text{Abs} \times F \times D \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, Abs é a absorvância, F é o fator de atividade enzimática (0,111 U/ml ou 111 U/L) e D o fator de diluição da amostra (HOU et al., 2004).

#### 4.5 Otimização da extração de cafeína dos grãos verdes de café

Os grãos foram selecionados, triturados em multiprocessador (Cadence), e tamisados entre 100 e 65 mesh (0,149 mm – 0,212 mm). As amostras foram congeladas a  $-22 \pm 1^\circ\text{C}$  até o momento da extração da cafeína.

As condições de extração foram otimizadas, de acordo com Bruns, Scarmino e Barros Neto (1995), por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) e regressão linear múltipla, a qual apresenta uma equação polinomial de segunda ordem (Equação 2), sendo y a resposta predita,  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  e  $\beta_{ij}$  os coeficientes de regressão intercepto, linear, quadrático e interação de termos e  $x_i$  e  $x_{ij}$ , as variáveis independentes.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_{ii} + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_{ij} \quad (\text{Equação 2})$$

As variáveis independentes utilizadas foram:  $x_1$ : concentração de solvente,  $x_2$ : tempo e  $x_3$ : temperatura (Tabela 5).

**Tabela 5- Planejamento fatorial Box-Behnken (3/1/15).**

Experimento	Soluto/Solvente	Tempo	Temperatura
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	0	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
-1	20	5	78
0	10	10	88
1	5	15	98

Fonte: Aatoria própria (2021).

Após a obtenção dos extratos, eles foram submetidos a uma técnica de precipitação visando obter uma amostra límpida, sem partículas. Foram adicionados em eppendorf 500  $\mu$ L do extrato e 500  $\mu$ L de uma solução metanol:acetoneitrila (80:20, vol/vol). Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10000 x g para neutralizar e esterificar a solução, formando um precipitado o qual foi descartado (MARSZALEK *et al.*, 2019). Após a centrifugação os extratos foram diluídos em água (1:1000) e a cafeína foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme descrito na seção 4.10.

#### 4.6 Determinação de compostos fenólicos totais

A determinação da concentração de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965), com modificações. Em tubos de ensaio foram adicionados de maneira ordenada 2,2 mL de água deionizada, 0,045 mL de amostra e 0,150 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Em seguida os tubos foram agitados em vortex por 30 segundos e adicionados 0,600 mL de carbonato de cálcio (20%). As amostras foram agitadas novamente e conservadas no escuro por 1 hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (UV-VIS digital microprocessado, modelo UV-M51, marca Bel Photonics) em comprimento de onda a

765 nm. Para construção da curva padrão ( $y = 0,0014 x + 0,0425$ ;  $R^2 = 0,9939$ ) foi utilizado o ácido gálico, sendo os resultados apresentados em mg de ácido gálico equivalente por litro de extrato (mg EAG/L).

#### 4.7 Determinação de Flavonoides Totais

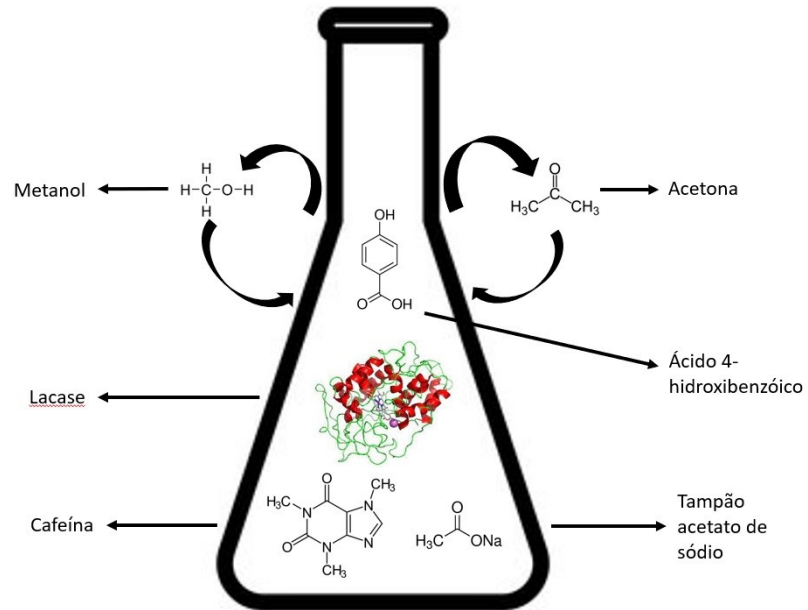
Os flavonoides totais foram quantificados de acordo com a metodologia descrita por Zhishen *et al.* (1999). Em tubos de ensaio foram adicionados 250  $\mu$ L de extrato de café verde, 1525  $\mu$ L de água deionizada, 75  $\mu$ L da solução de nitrito de sódio (5%) e agitados em vortex. Após 5 minutos, foram adicionados 150  $\mu$ L de cloreto de alumínio (10%) e agitados em vortex novamente. Por fim foi adicionado 500  $\mu$ L de hidróxido de sódio 1 mol/L e agitados em vortex. A absorbância foi determinada em 510 nm em espectrofotômetro (UV-VIS digital microprocessado, modelo UV-M51, marca Bel Photonics). A catequina foi utilizada para construção da curva padrão ( $y = 0,0032 x + 0,0201$ ;  $R^2 = 0,9903$ ) e os resultados foram expressos em miligrama de catequina equivalente por litro de extrato (mg ECAT/L).

#### 4.8 Degradação da Cafeína por Lacase

Estudos preliminares foram realizados para posterior aplicação de um planejamento fatorial com base nos dados obtidos. Para realizar os ensaios de degradação da cafeína, foi preparado uma solução estoque de cafeína de 1000 ppm.

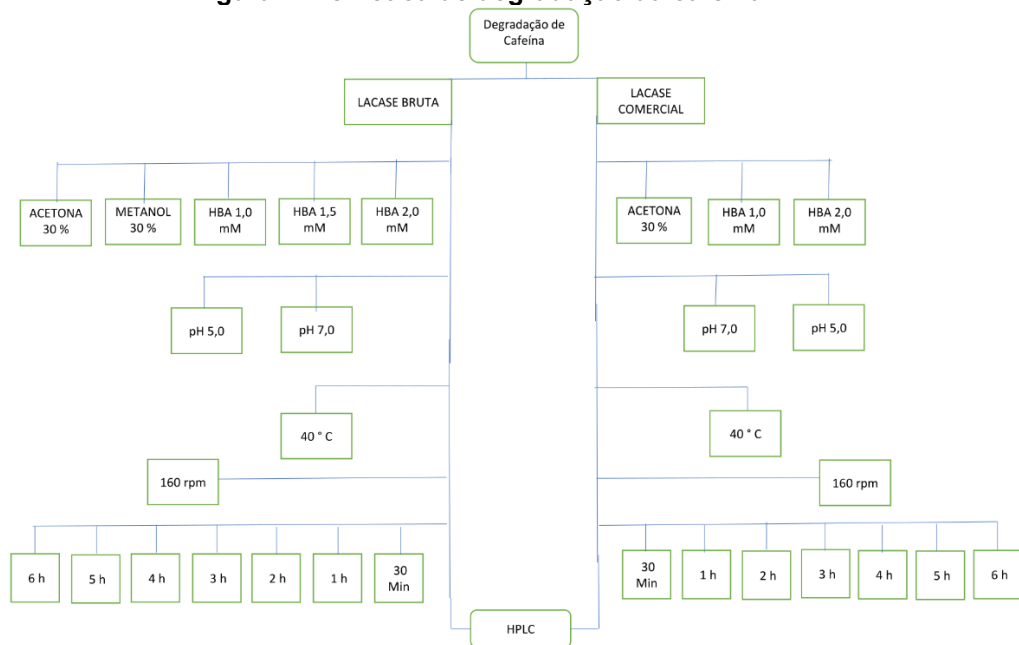
As reações foram realizadas em erlenmeyer de 25 mL, onde os seguintes reagentes e soluções foram adicionadas: acetato de sódio 50 mM pH 5,0, 6,0 e 7,0, ácido 4-hidroxibenzóico (1, 1,5 e 2,0 mM), acetona e metanol (Figura 11). Concentrações de lacase comercial ( $\cong 7000$  U/L), lacase bruta ( $\cong 14000$  U/L).

**Figura 11- Ação da enzima lacase na degradação da cafeína com a interação de mediador natural e sintético.**



Fonte: Autoria própria (2021).

**Figura 12- Cinética de degradação da cafeína.**



Fonte: Autoria própria (2021).



**Tabela 6- Modelo dos experimentos preliminares aplicadas para degradação da cafeína.**

ID	LB	LC	Acetona (30%)	Metanol (30%)	HBA (1,0 mM)	HBA (1,5 mM)	HBA (2,0 mM)	pH 5	pH 7
LAC1	X								X
LAC2	X				X				X
LAC3		X							X
LAC4		X					X		X
LAC5		X			X			X	
LAC6		X	X		X				X
LAC7		X	X		X			X	
LAC8		X						X	
LAC9	X		X		X				X
LAC10	X		X		X			X	
LAC11	X							X	
LAC12	X				X			X	
LAC13	X			X				X	
LAC14	X				X			X	
LAC15	X				X			X	
LAC16	X			X	X			X	
LAC17	X			X	X				
LAC18	X			X	X			X	
LAC19	X				X				
LAC20	X				X			X	
LAC21	X					X			X
LAC22	X					X		x	
LAC23	X						X	X	
LAC24	X							X	

**Fonte: Autoria própria (2021).**

O planejamento fatorial  $2^2$  (total de 9 experimentos) foi elaborado para avaliar a eficiência da enzima lacase na degradação da cafeína. As variáveis independentes utilizadas foram:  $x_1$ : concentração do mediador ácido 4-hidroxibenzoico (HBA) e  $x_2$ : pH (Tabela 7). A escolha das variáveis e seus respectivos níveis foram escolhidas através de estudo preliminares realizado na etapa anterior.

**Tabela 7- Planejamento fatorial (2/1/9).**

Experimento	HBA (mM)	pH
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	1
4	0	-1
5	0	0
6	0	1
7	1	-1
8	1	0
9	1	1
-1	1,0	5
0	1,5	6
1	2,0	7

Fonte: Autoria própria (2021).

#### 4.9 Cinética de degradação

A cinética de degradação da cafeína foi realizada com base nos resultados obtidos na etapa 4.8.

**Tabela 8- Tempos de degradação avaliados em relação aos ensaios que apresentaram degradação em um período de 24 horas.**

Reações Degradativas	Tempo
	30 Min
Experimento 4	1 Hora
Experimento 6	2 Horas
Experimento 7	3 Horas
Experimento 9	4 Horas
	5 Horas

Fonte: Autoria própria (2021).

As amostras foram preparadas em duplicatas e as condições de cada experimento não foram alteradas.

#### 4.10 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises para cafeína, como validação e quantificação foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (Prominence®, Shimadzu), constituído por uma bomba quaternária LC-20AT, degaseificador DGU-20A, amostrador automático SIL-20A (volume de injeção de 50 µL), detector de arranjo de diodos SPD-M20A (200 a 400 nm) utilizando coluna com

fase estacionária octadecilsilica YMC Inc, USA (YMC-Pack ODS-AQ AQ 12S05-1546WT 150 x 4,6 mm I. D. S- 5  $\mu\text{m}$ , 12  $\eta\text{m}$ . n° 041580141 W) no modo reverso de eluição. A fase móvel utilizada foi composta de metanol e ácido fosfórico 0,1% (65:35) com força suficiente para promover a eluição do analito. A análise e processamento de dados foram adquiridos através do software LC Solutions.

O desenvolvimento para validar o método cromatográfico se deu através do preparo de uma solução estoque de cafeína a 1000 ppm onde foi diluída a 1 ppm visando determinar as melhores condições na fase móvel, proporções dos solventes, volume de injeção e melhor tempo de retenção para a amostra.

A curva de calibração foi preparada através da diluição da solução estoque, variando de 1 a 25 ppm. A partir da curva de calibração determinou-se os parâmetros linearidade, limites de detecção e quantificação.

Para avaliar a concentração de cafeína nos extratos obtidos 1 mL de cada extrato foi adicionado juntamente com 1 mL de metanol:acetoneitrila (80:20, v/v) e submetidos a centrifugação (1000 x g) por 10 minutos (MARSZALEK *et al.*, 2019). Após a centrifugação o sobrenadante foi recuperado e diluído em água ultrapura (1:1000).

Para avaliar a degradação da cafeína, as amostras foram centrifugadas (1000 x g) por 10 minutos. Deste modo o sobrenadante foi recuperado e quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

#### **4.11 Análise Estatística**

A ferramenta de análise para ajuste dos modelos matemáticos foi o software Statistica 7.0. O planejamento experimental aplicado foi o Box-Behnken (DBB). Os dados são relatados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). A significância estatística das variáveis avaliadas na equação de regressão foi verificada por meio do teste ANOVA ( $p \leq 0,05$ ). A condição ótima simultânea de todas as variáveis foi determinada por meio da função desejável de acordo com Derringer e Suich (1980). A adequação e a qualidade de ajuste dos modelos foram avaliadas por meio do p-valor (*lack of fit*), coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e seu  $R^2$  ajustado. Os valores experimentais de cada variável resposta foram determinados e comparados com as respostas previstas para avaliar o poder de predição do modelo utilizado.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Otimização da extração de cafeína de grãos verdes de café

Os experimentos para obtenção dos extratos dos grãos verdes de café foram baseados na metodologia de superfície de resposta através do planejamento Box-Behnken (DBB), no qual cada fator expresso foi estudado em três níveis (+1, 0 e -1) com três réplicas no ponto central, totalizando 15 ensaios.

Os processos de extração usuais envolvem a aplicação de solventes orgânicos que podem ocasionar um efeito negativo ao meio ambiente, dependendo da quantidade e aplicação (OLIVEIRA et al., 2017). Neste estudo foi utilizado somente água como solvente extrator, com base em sua polaridade que facilita a extração da cafeína (OLIVEIRA et al., 2019) e objetivando a minimização dos impactos ambientais. Os solventes polares promovem extratos ricos em compostos de média e alta polaridade (CHASSAGNEZ et al., 1997). Oliveira et al. (2019) avaliaram seis solventes com polaridades diferentes para extrair compostos bioativos dos grãos de café verde e observaram que a polaridade do solvente, a matriz vegetal e a duração do processo são significativas nos processos de extração. Após a extração, a solução aquosa obtida apresentou turbidez, o que pode estar relacionada à presença de polissacarídeos, proteínas coloidais e outros compostos coloidais contidos nos grãos de café (SALINAS-VARGAS; CAÑIZARES-MACÍAS, 2014). Para a remoção de tais compostos foi utilizada uma solução de metanol:acetonitrila (20:80 v/v). Estes compostos podem afetar tanto a eficiência da coluna como a detecção (VOGEL, 1981).

A concentração de cafeína obtida em cada ensaio está apresentada na Tabela 9. A concentração de cafeína em grãos verdes mostrou valores variados, resultando em concentrações entre 6,68 e 37,07 mg/g, estando esses valores encontrados de acordo com a literatura. A variação na quantidade de cafeína pode ocorrer devido a fatores ambientais, tipos de amostragem, tamanho de moagem, temperatura de extração, volume de extração e outros (MACHEINER et al., 2019).

**Tabela 9- Otimização da extração de cafeína de grãos de café verde.**

Extratos	Cafeína (mg/g)
1	6,68 <sup>h</sup> ± 0,01
2	10,51 <sup>g</sup> ± 0,01
3	22,24 <sup>de</sup> ± 1,80
4	11,83 <sup>fg</sup> ± 0,10
5	19,34 <sup>ef</sup> ± 1,73
6	20,42 <sup>e</sup> ± 2,20
7	18,88 <sup>ef</sup> ± 0,21
8	11,69 <sup>g</sup> ± 0,17
9	32,35 <sup>abc</sup> ± 2,90
10	29,95 <sup>bc</sup> ± 0,07
11	36,55 <sup>ab</sup> ± 2,70
12	37,07 <sup>a</sup> ± 1,94
13	28,63 <sup>cd</sup> ± 1,97
14	33,92 <sup>abc</sup> ± 1,07
15	33,50 <sup>ab</sup> ± 2,46

Nota: Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias ( $p \leq 0,05$ ).

Fonte: Autoria própria (2021).

Jeszka-Skowron et al. (2020) determinaram por CLAE a concentração de cafeína aplicando diferentes tipos café, onde a maior concentração de cafeína foi de 25,6 mg/g utilizando 1 g de grão verde moído da espécie robusta (Uganda), 100 mL de água destilada (94 °C) e filtrada em filtro de seringa de politetrafluoroetileno de 0,45 µm.

Asfew e Dekebo (2019) avaliaram a concentração de cafeína de grãos verdes da variedade arábica. Os grãos passaram pelo processo de torrefação, foram moídos e peneirados a 250 µm. O método consistiu em 2,5 g de pó da amostra com adição de 50 mL de água fervida. Quando determinado por HPLC, a maior concentração de cafeína encontrada pelos autores foi de 35,67 mg/g.

De Luca et al. (2018) quantificaram cafeína e ácido clorogênico em grãos verdes de café nas variedades robusta e arábica de diversos países. Foi utilizado 0,2 g de café e uma solução metanol/água (70:30 v/v) e sua caracterização por HPLC revelou concentrações de cafeína de 7,31 - 44,69 mg/g para arábica e 16,60 - 61,53 mg/g para robusta.

Através da análise de variância (ANOVA) foi possível observar os efeitos das variáveis sobre a resposta de concentração (mg/g). Quando os valores de p- são menores ( $p \leq 0,05$ ) as condições aplicadas ao modelo foram significativas, respectivamente. Já valores superiores de p ( $p \geq 0,05$ ) indicaram que o modelo aplicado não apresentou significância (DAHMOUNE et al., 2015). Através da Tabela 10, se observa que pelo menos uma das variáveis de extração pode elucidar

a variação dos resultados obtidos nos ensaios de acordo com o valor F significativo para soluto/solvente.

**Tabela 10- Análise de variância (ANOVA) do delineamento Box-Behnken.**

ANOVA: Cafeína (mg/g); R<sup>2</sup>= 94753; R<sup>2</sup> Ajustado= 85308

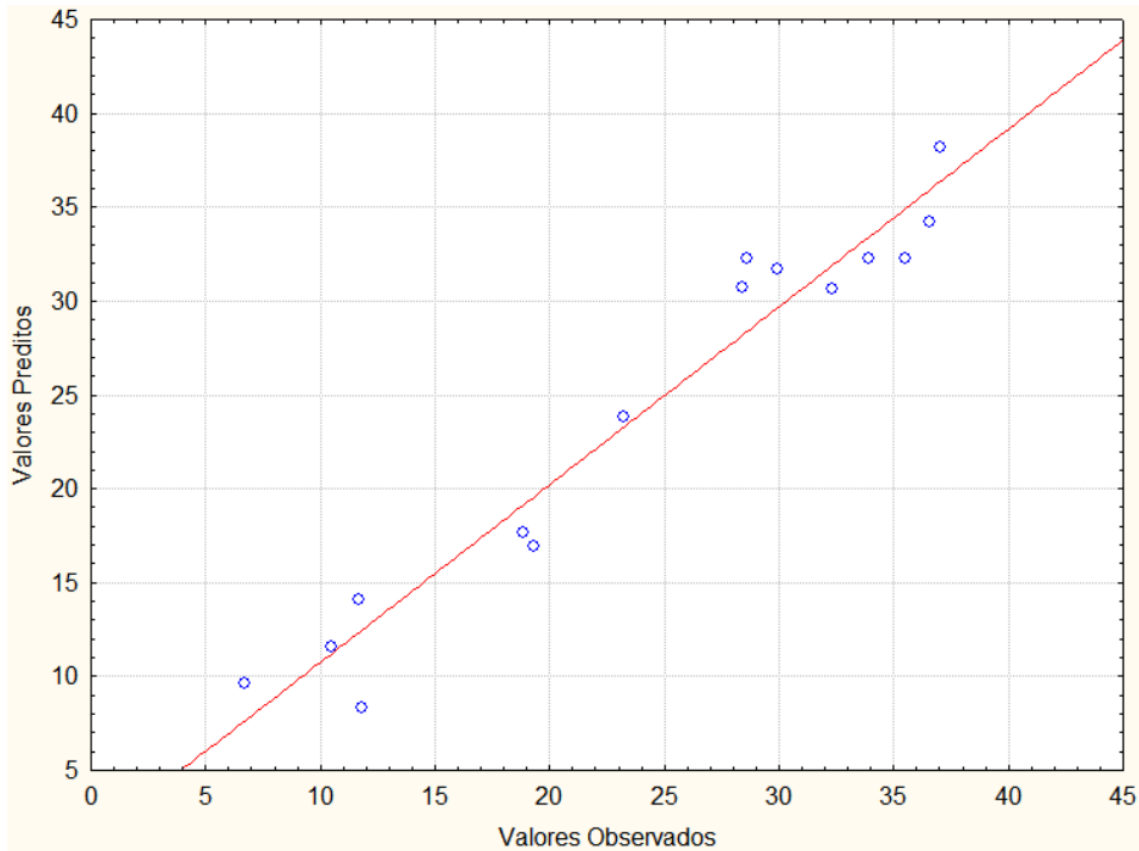
	SS	Df	MS	F	P
(1)Temperatura ° C(L)	29,26	1	29,26	2,25	0,27
Temperatura ° C(Q)	3,25	1	3,25	0,25	0,66
(2)Tempo (min)(L)	56,64	1	56,64	4,36	0,17
Tempo (min)(Q)	0,61	1	0,61	0,04	0,84
<b>(3)Solutos/Solventes(L)</b>	<b>69,99</b>	<b>1</b>	<b>69,99</b>	<b>5,38</b>	<b>0,14</b>
Solutos/Solventes(Q)	1141,12	1	1141,12	87,86	0,01
1L by 2L	2,13	1	2,13	0,16	0,72
1L by 3L	7,80	1	7,80	0,60	0,51
2L by 3L	81,25	1	81,25	6,25	0,12
Falta de Ajuste	54,46	3	18,15	1,39	0,44
Erro Puro	25,97	2	12,98		
Total SS	1532,98	14			

Fonte: Autoria própria (2021).

O valor do  $R^2$  (coeficiente de determinação) foi de 0,94753 o que aponta que pelo menos 94,7% das variações poderiam ser explicadas pelo modelo ajustado (solutos/solventes). O coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  próximo de 1) descrito revelou correlação entre os valores experimentais e previstos (Figura 13).

Na Figura 13, observa-se que todos os pontos se situam próximos e ao longo de uma reta. Isso demonstra a veracidade que os componentes de erro do modelo aplicado cumprem uma distribuição regular para a resposta de rendimento.

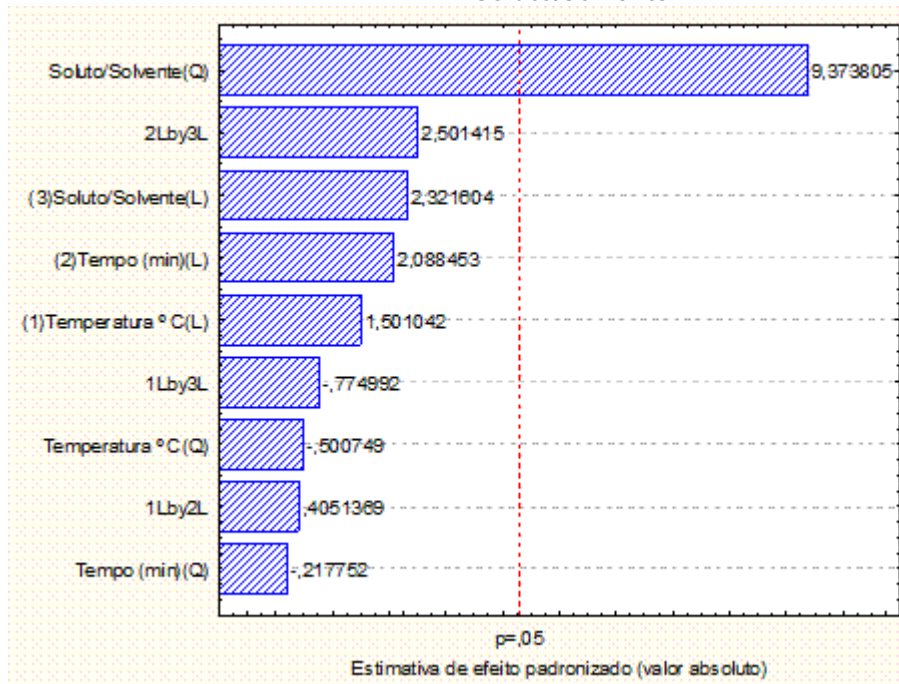
**Figura 13- Linearidade dos valores experimentais com os preditivos para extração de cafeína de grãos verdes de café.**



Fonte: Autoria própria (2021).

O gráfico de Pareto permite analisar os efeitos padronizados (razão dos efeitos estimados e desvio padrão) onde as variáveis atuam na resposta avaliada. Através da linha vertical vermelha que corta os efeitos, observa-se que não houve diferença significativa para as variáveis tempo e temperatura ( $p \geq 0,05$ ). Para avaliação de resposta, somente os efeitos localizados a direita dessa reta ( $p < 0,05$ ). Das três variáveis independentes estudadas, soluto/solvente ( $X_1$ ), tempo ( $X_2$ ) e temperatura ( $X_3$ ), somente a razão soluto/solvente apresentou diferença significativa (Figura 14).

**Figura 14- Gráfico de Pareto dos efeitos e interações das condições de tempo, temperatura e soluto/solvente.**



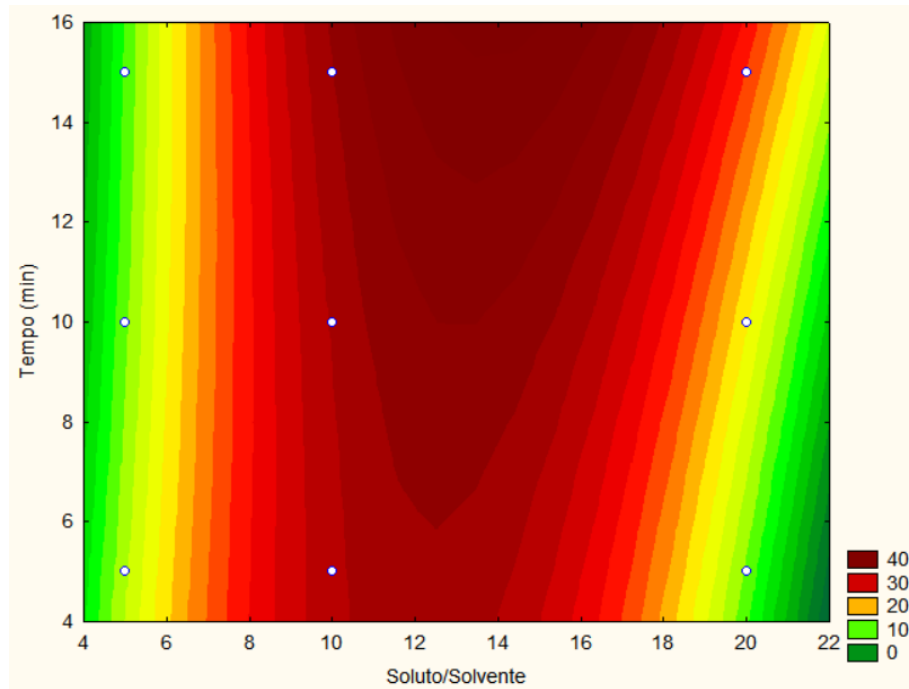
Fonte: Autoria própria (2021).

O gráfico de contorno é apresentado na Figura 15 em função das variáveis codificadas. Este gráfico fornece melhor visibilidade do ponto ótimo de trabalho para o rendimento de cafeína (mg/g) em grãos verdes de café. É possível observar que o melhor ponto de extração da cafeína foi alcançado na região na qual o soluto/solvente é de 1:10 e o tempo de 15 minutos.

Através da função de desejabilidade (Figura 16) foi possível observar os níveis de fatores que são capazes de gerar a resposta mais desejável com base nos fatores dependentes. Através da linha vermelha vertical do gráfico é possível observar os valores ideais.

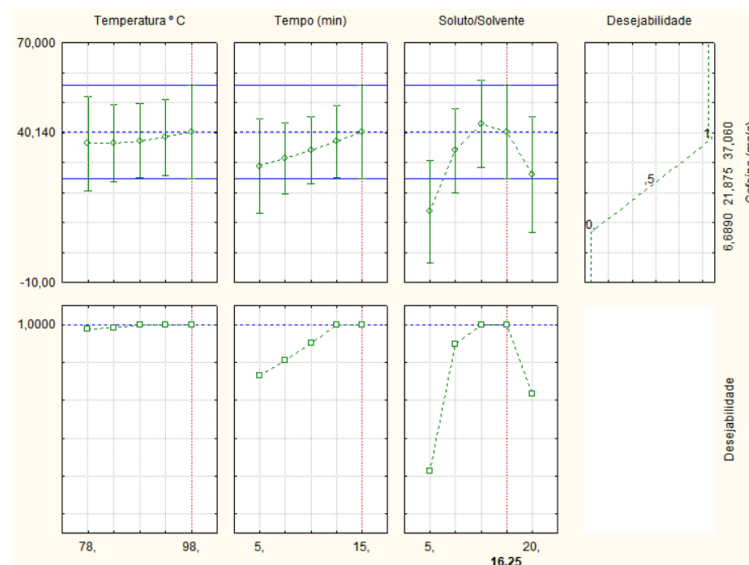


Figura 15- Gráfico de Contorno apresentando os efeitos da interação entre as variáveis X1 (soluto/solvente) e X2 (tempo).



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 16- Perfil dos valores de resposta e desejabilidade para as variáveis dependentes.



Fonte: Autoria própria (2021).

## 5.2 Quantificação de Flavonoides Totais e Compostos Fenólicos Totais

A concentração de flavonoides e compostos fenólicos totais foram determinados utilizando o ponto ótimo obtido através do design de experimentos Box-

Behnken. O extrato apresentou uma concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides totais de  $36,72 \pm 3,84$  mg EAG/ g e  $9,36 \pm 0,8$  mg/g ECAT, respectivamente. Os resultados obtidos são variáveis, pois a formação de tais compostos depende de condições de crescimento da planta, localização, luz, drenagem, temperatura e processamento dos grãos (FARAH et al., 2006).

Concentrações superiores foram relatados por Getachew e Chun (2016) onde valores médios para compostos fenólicos e flavonoides totais foram de 120,4 a 144,4 mg EAG/g e 15 a 43 mg ECAT/g em grãos verdes de arábica e robusta de diferentes regiões. Khuwjitjaru et al. (2014) avaliaram a cinética de degradação alguns compostos fenólicos em água subcrítica e atividade de eliminação radical de seus produtos de degradação e observaram que ocorreu uma redução dos valores com o aumento da temperatura, ou seja, a partir de  $100^\circ\text{C}$  os compostos podem ser afetados. Esta temperatura é semelhante ao ponto ótimo deste experimento para extração da cafeína ( $98^\circ\text{C}$ ); o que pode ter implicado em um rendimento menor para compostos fenólicos totais e flavonoides. Resultado semelhante foi relatado por Ramón-Gonçalves et al. (2019) os quais extraíram e quantificaram os compostos bioativos de amostras de café moído. Neste estudo uma temperatura de extração similar a este estudo de  $95^\circ\text{C}$  foi utilizada e obteve-se valores médios de compostos fenólicos totais entre de 9 a 29 mg EAG/g.

Os compostos fenólicos que estão presentes nos extratos estão associados a outras biomoléculas que incluem proteínas, carboidratos, clorofila, lipídeos, terpenos e outros compostos orgânicos. Outro fator importante é a solubilidade dos compostos fenólicos que dependem do comprimento da cadeia carbônica e dos grupos hidroxila (AJILA et al., 2011). Yilmas e Toledo (2006) obtiveram como melhor solvente extrator misturas de água/acetona e água/etanol na extração de compostos fenólicos do que um único solvente.

A temperatura não influenciou na extração da cafeína, porém, considerando os compostos fenólicos totais e flavonoides temperaturas mais baixas resultam em maiores concentrações. O solvente (água) aplicado nas extrações não possibilitou uma grande extração de compostos fenólicos totais e flavonoides totais devido a grande quantidade de outros compostos como proteínas e lipídeos dificultando a interação da matriz e solvente. García e Bianchi (2015) utilizaram diferentes solventes (acetona, metanol, etanol e água) para extração de compostos fenólicos da casca de café. O extrato aquoso apresentou menores rendimentos para fenólicos totais.

Tran et al. (2020) obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo avaliando a polpa úmida de café robusta, quando aplicado secagem a vácuo o melhor resultado foi obtido com uma concentração de 14,4 mg EAG/ g.

### 5.3 Otimização dos Procedimentos Analíticos para Determinação de Cafeína

A construção da curva analítica da cafeína foi realizada em triplicata através de amostras padrões grau analítico com concentrações de 1,0 mg/L a 25 mg/L (Tabela 11).

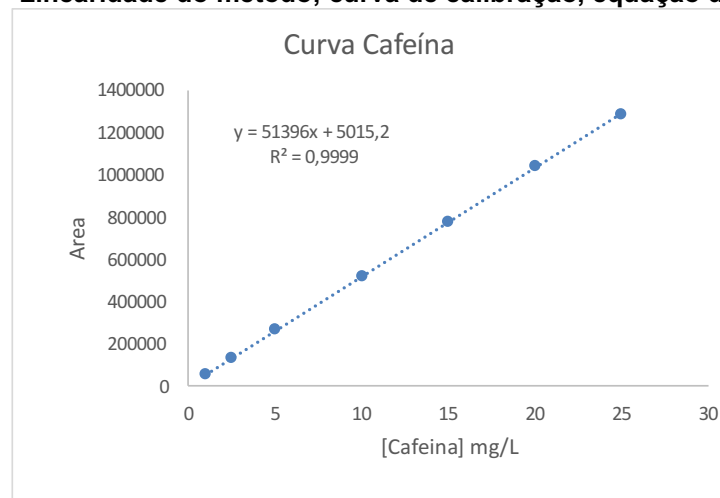
**Tabela 11- Resultados das áreas dos cromatogramas obtidas através de diferentes concentrações de padrões por CLAE.**

	Concentração (ppm ou mg/L)						
	1,0	2,5	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0
1º Área	52370	133725	249663	518932	775717	1041091	1274423
2º Área	49996	134853	285335	525811	768122	1042256	1289562
3º Área	53294	132263	265660	511444	779090	1032388	1292975

Fonte: Autoria própria (2021).

Segundo a resolução 899/03 da ANVISA a linearidade de um método através da regressão linear, o valor mínimo do  $R^2$  precisa ser de 0,99, deste modo a curva analítica se estabelece de acordo com a norma (Figura 17).

**Figura 17- Linearidade do método; curva de calibração, equação da reta e  $R^2$ .**



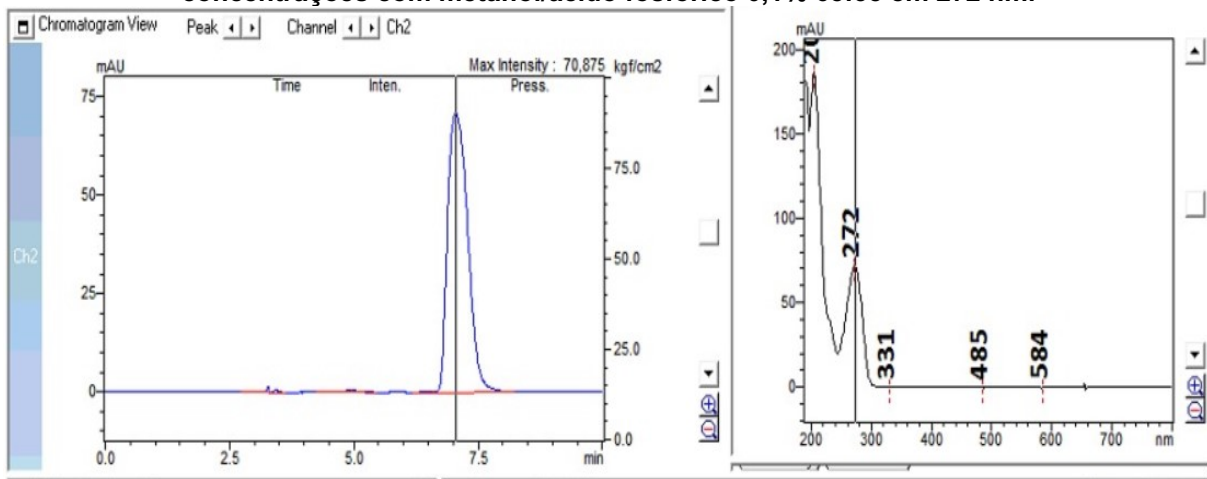
Fonte: Autoria própria (2021).

**Tabela 12- Desvio padrão, limite de detecção e quantificação.**

$y = ax + b$	$R^2 = 0,99$	Desvio
a	51396	196,78
b	5015,2	2765,1
limite de detecção	1,81	
limite de quantificação	5,51	

Fonte: Autoria própria (2021).

Fundamentado pelas injeções dos padrões objetivando a elaboração da curva analítica foi possível observar o tempo de retenção que ficou em torno de 6,9 minutos como observado na figura 18.

**Figura 18- Cromatograma de Identificação do tempo de retenção da cafeína em diferentes concentrações com metanol/ácido fosfórico 0,1% 65:35 em 272 nm.**

Fonte: Autoria própria (2021).

Mediante as condições da fase móvel utilizada com metanol e ácido fosfórico 0,1% 65:35, v/v e comprimento de onda a 272 nm o tempo de retenção ficou estabelecido em 6,9 minutos. As condições do experimento estabelecidas foram satisfatórias para avaliar a degradação da cafeína através da enzima lacase.

#### 5.4 Degradação de Cafeína Padrão

As variáveis de degradação foram descritas na Tabela 13. A temperatura (40° C), e agitação (160 rpm) foram pré-estabelecidos devido à otimização realizada em estudos anteriores (ANITA et al., 2020; LI et al., 2020; ZEEB et al., 2014).

Para o sistema lacase/mediador oxidar compostos orgânicos com eficiência, fatores como, tipo de mediador, substrato alvo, sistema tampão e pH da reação são muito importantes (NETO, 2012).

**Tabela 13- Percentual de degradação de cafeína mediante processos enzimáticos realizados no estudo piloto.**

<b>ID</b>	<b>Degradação (%)</b>
LAC 1	0,00
LAC 2	0,00
LAC 3	99,39
LAC 4	100,00
LAC 5	0,00
LAC 6	0,00
LAC 7	0,00
LAC 8	8,81
LAC 9	0,00
LAC 10	0,00
LAC 11	0,00
LAC 12	0,00
LAC 13	0,00
LAC 14	0,00
LAC 15	0,00
LAC 16	0,00
LAC 17	0,00
LAC 18	0,00
LAC 19	0,00
LAC 20	0,00
LAC 21	13,00
LAC 22	6,39
LAC 23	100,00
LAC 24	0,00

**Fonte: Autoria própria (2021).**

Os experimentos para avaliar a degradação da cafeína foram baseados na metodologia de superfície de resposta através do planejamento fatorial no qual cada fator expresso foi estudado com três níveis (+1, 0 e -1) totalizando 9 ensaios.

A taxa de degradação de cafeína obtida em cada ensaio está apresentada na Tabela 14. Os valores de degradação variaram de 6,39% a 100%.

Tabela 14- Taxa de degradação avaliada através do planejamento fatorial.

Experimento	Degradação (%)
1	0,0
2	0,0
3	0,0
4	6,39
5	2,0
6	13,0
7	100
8	35,0
9	100

Fonte: Autoria própria (2021).

Tabela 15- Análise de variância (ANOVA) do delineamento fatorial.

ANOVA: % de degradação;  $R^2 = 0,87999$ ;  $R^2$  Ajustado = 0,75998

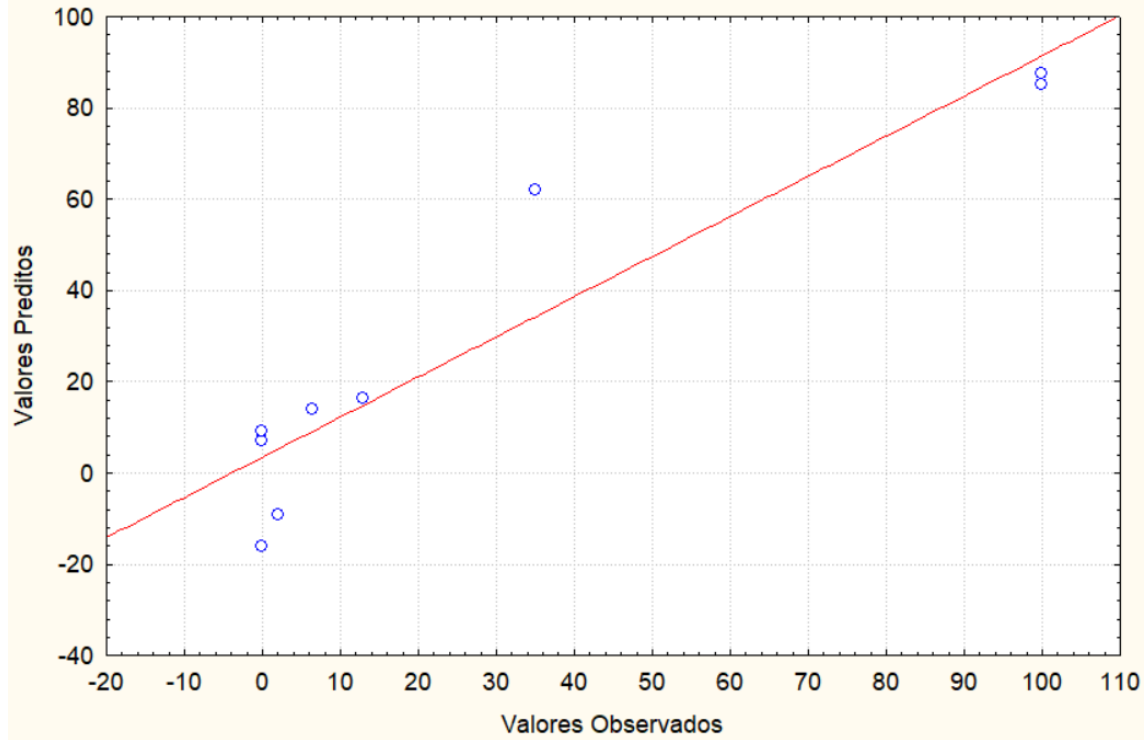
	SS	Df	MS	F	P
(1) HBA (L + Q)	11256,86	2	5628,431	13,27180	0,017151
(2) pH (L + Q)	1181,63	2	590,815	1,39314	0,347422
Erro	1696,36	4	424,090		
TOTAL SS	14134,85	8			

Fonte: Autoria própria (2021).

Por meio da análise de variância (ANOVA) e das variáveis aplicadas foi possível concluir que houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) (DAHMOUNE et al., 2015). O valor F observado foi alto comparando as duas variáveis, isso representa se houve diferença geral entre as médias, quanto maior o valor de F mais significativo o valor de p para ANOVA.

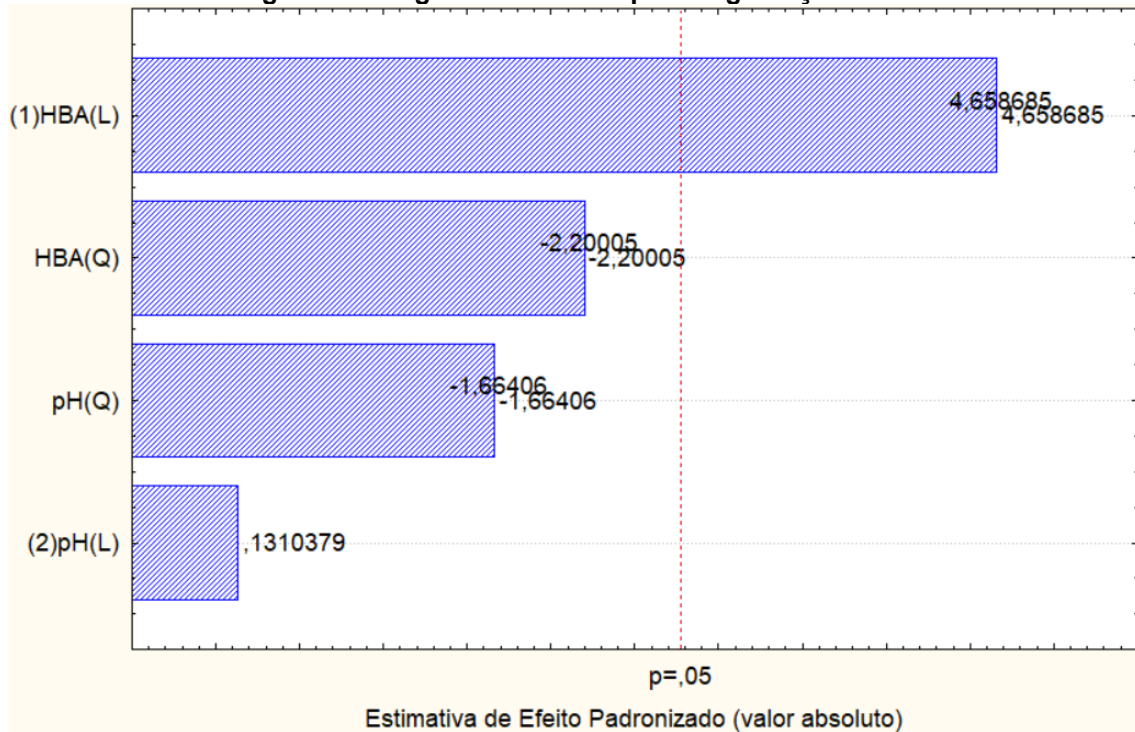
O valor do  $R^2$  (coeficiente de determinação) foi de 0,87999 o que aponta que pelo menos 87,9% da variação total de y é explicada pela reta de regressão. Verifica-se que 12,1% da variação total de y não é explicada. A Figura 19 permite avaliar a dispersão de pontos ao longo de uma reta, a variação intensa de alguns resultados explica a distribuição irregular para resposta de rendimento.

Figura 19- Valores preditos e observados em resposta de rendimento a degradação de cafeína.



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 20- Diagrama de Pareto para degradação da cafeína.



Fonte: Autoria própria (2021).

Como avaliado na ANOVA, o gráfico de Pareto também apresentou diferença significativa. Para avaliação de resposta, somente os efeitos localizados a direita da linha vertical vermelha (HBA) foram significativos ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4.1 Influência de Solventes Orgânicos

As lacases possuem tolerância direcionada a solventes orgânicos e são catalisadores robustos com abrangente aplicação em biotecnologia (WU et al., 2019). Os solventes orgânicos podem alterar de forma considerável a atividade e estabilidade da enzima (OGINO et al., 1999).

Os ensaios de degradação da cafeína que continham solventes orgânicos (acetona, metanol) foram parte do teste piloto e não apresentaram influência na estabilidade e ou aumento do potencial redox da lacase. O fundamento para os solventes orgânicos utilizados neste trabalho não terem apresentado efeito de sistema mediador sobre a lacase está relacionada ao pH, pois solventes orgânicos afetam o mesmo, dificultando a dissociação de substratos com a enzima, podendo afetar sua isoforma. Estudo semelhante realizado por Rodakiewicz-Nowak (2007) relatou que os solventes orgânicos reduzem de maneira rápida a taxa de reação da enzima, porém, não reduz nos primeiros 30 minutos de reação. Os solventes afetam todo sistema reacional, como a solvatação das moléculas, termodinâmica e as proteínas. O mesmo autor Rodakiewicz-Nowak (2000) em estudo anterior envolvendo o efeito de solventes miscíveis em água sob a atividade de lacase notou que o metanol não afetou  $V_{max}$  em uma ampla concentração desse mesmo solvente, sendo considerado como inibidor competitivo fraco de lacase.

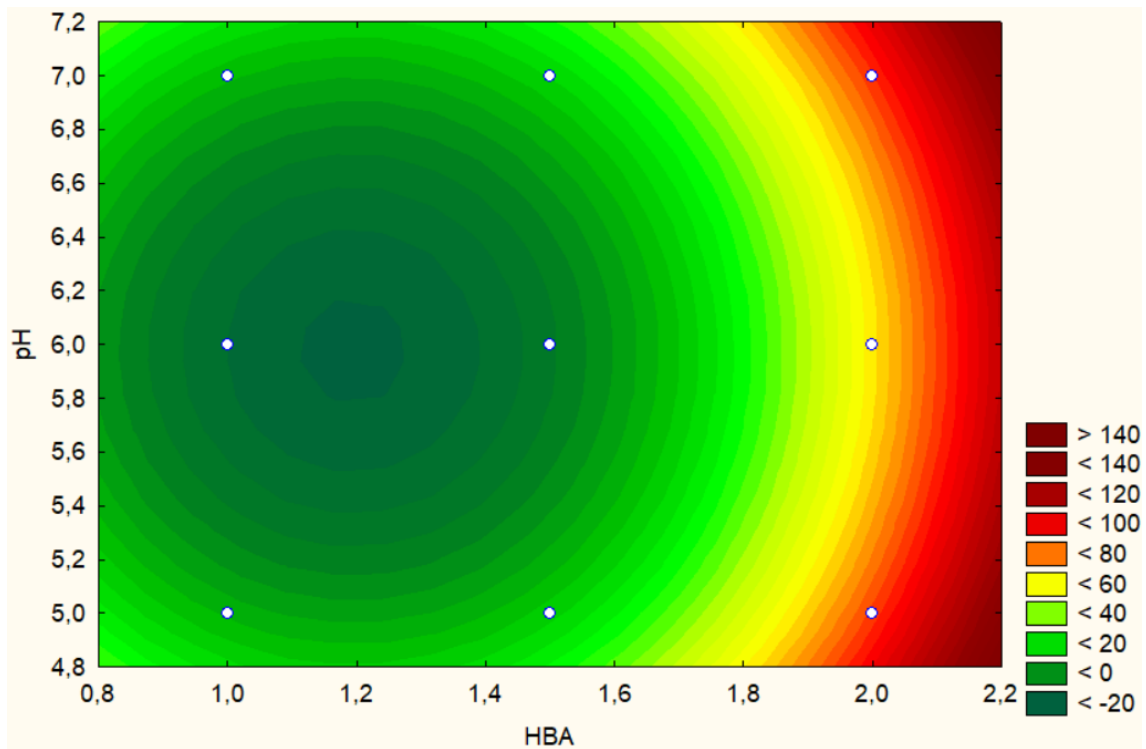
Wu et al. (2019) avaliaram o aumento da atividade da lacase com solventes orgânicos e observaram que diversas lacases fúngicas ascomicetos (*M. thermophila* e *Thielavia* sp.) e basidiomicetos (*T. versicolor*, *A. bisporus*, *P. ostreatus*, *P. cinnabarinus*, *Cerrena unicolor* e *C. gallica*) apresentaram na presença de etanol, acetona e acetonitrila atividades enzimáticas reduzidas e limitadas. Pacheco e Soares (2014) analisaram a eficácia da enzima lacase na biodegradação de efluentes e obtiverem frente a teste de estabilidade sob diferentes solventes um baixo rendimento. A acetona foi o solvente que ocasionou maior desativação da enzima, para concentração acima de 30% a enzima de fato foi desnaturada.



#### 5.4.2 Influência do Mediador Ácido 4-hidroxibenzóico (HBA) e do pH

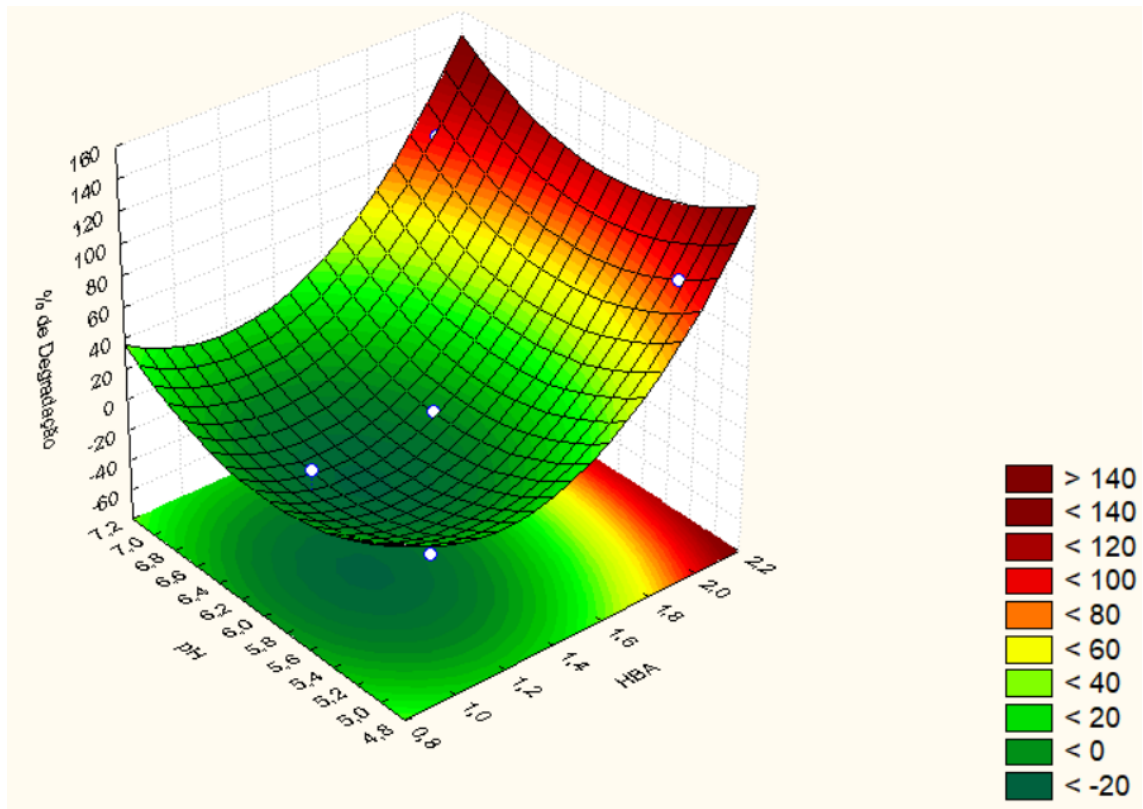
O sistema de mediador em conjunto com a lacase possibilita uma reação mais rápida porque seu potencial redox é ampliado podendo atuar em um maior gama de substratos (KUES et al., 2007). No limiar, os ensaios que continham em seu meio reacional 1mM de HBA não apresentaram nenhuma eficiência de degradação da cafeína. Resultados opostos foram descritos por Lloret et al. (2010) que analisaram a degradação de anti-inflamatórios e estrogênios por lacase, sob outra expectativa obteve remoção de 80% de diclofenaco quando a concentração de mediador foi elevada de 0,5 para 1,0 mM. Ashe et al. (2016) investigaram os impactos dos tipos de mediadores na degradação de poluentes por lacase, o composto oxibenzona foi completamente removido pelos mediadores ácido violúrico e hidroxibenzotriazol na concentração de 1 mM.

Figura 21- Gráfico de contorno e a variáveis independentes.



Fonte: Autoria própria (2021).

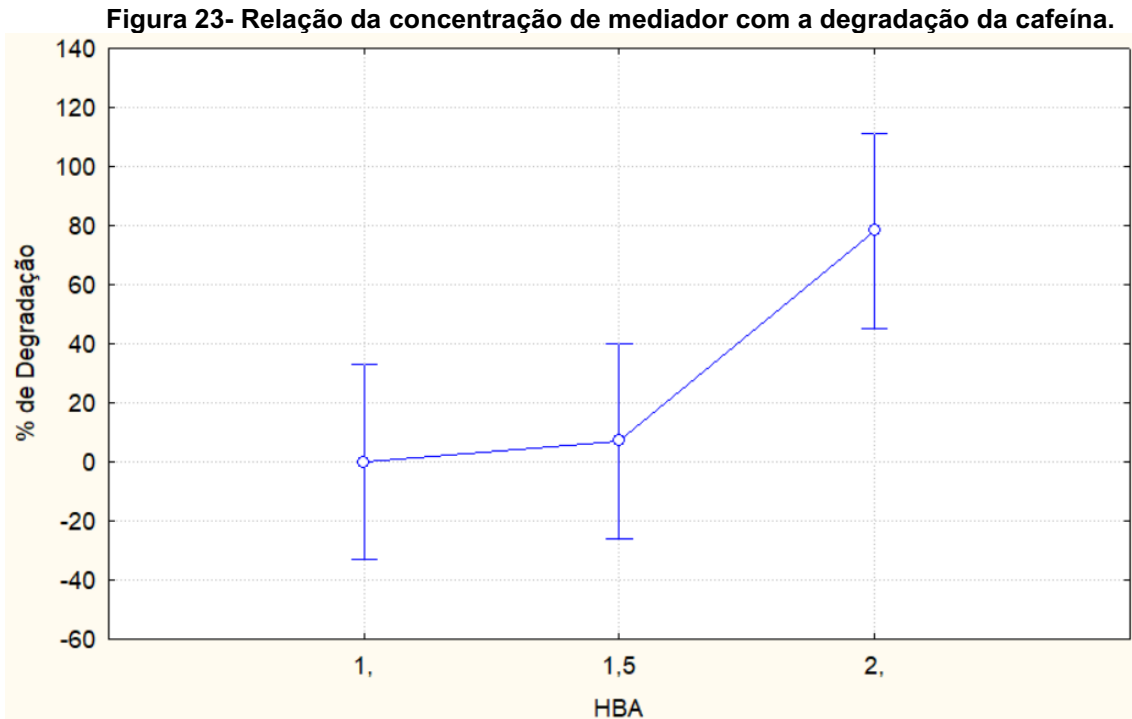
Figura 22- Gráfico de superfície e resposta para relação de degradação da cafeína.



Fonte: Autoria própria (2021).

As Figuras 21 e 22 representam a relação entre a variável dependente (degradação da cafeína) e as variáveis independentes (pH e HBA). O gráfico de superfície de resposta e o gráfico de contorno indicam que a eficiência de degradação da cafeína aumentou quando a concentração de mediador enzimático foi aumentada para 2,0 mM e o pH da reação em 5,0 e 7,0. Bankole et al. (2021) estudaram o impacto de mediadores redox na degradação de olsalazina. Quando a concentração do mediador hidroxibenzotriazol foi aumentada de 0,5 para 2,0 mM ocorreu sua degradação por completo, porém, quando a concentração foi superior a 2,0 mM não foi registrada nenhuma melhora substancial na atividade de degradação.

Neste estudo quando a concentração de HBA foi intensificado (experimento 7 e 9) para 2,0 mM apresentou uma eficiência de 100% de acordo com a Figura 23. Resultados semelhantes foram obtidos por Mizuno et al. (2009) na degradação de isobutilparabeno e o n-butilparabeno, onde, obteve 95% de degradação com 4 horas de tratamento sob influência do mediador hidroxibenzotriazol na concentração de 2 mM. Sarker et al. (2020) obtiveram 100% de degradação do fungicida 3,5 dicloroanilina com lacase e seu mediador catecol em uma concentração de 2,0 mM.

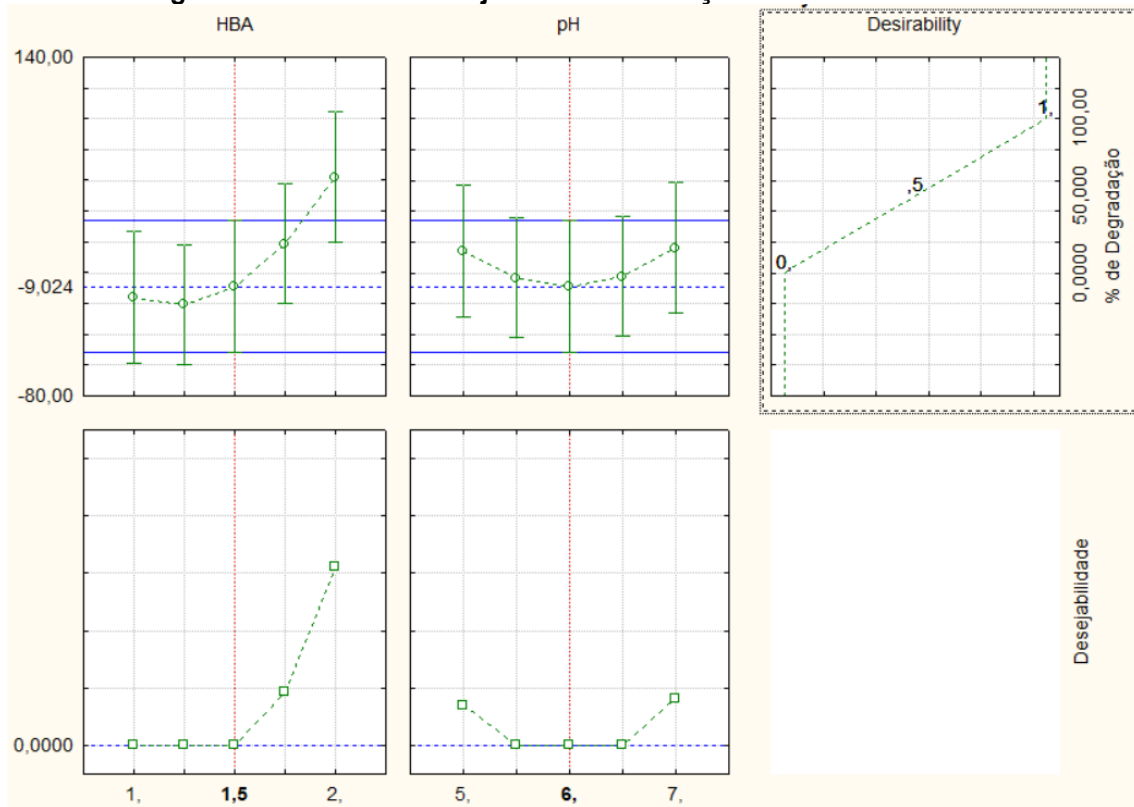


Fonte: Autoria própria (2021).

Feltrin et al. (2018) avaliaram métodos analíticos para degradar tricoteceno A e B, foi identificado que a aplicação de concentrações mais altas de mediador implicou em um declínio na taxa de degradação do substrato. Na ausência de mediador não foi notado degradação. Uhnáková et al. (2008) analisaram a biodegradação de diversos compostos aromáticos por lacase provenientes de *Trametes versicolor* e verificaram que a degradação de todos os compostos foi superior com a adição de mediador enzimático (ABTS). Este mediador foi praticamente consumido onde foi observado a formação de um produto para cada caso. Estudo similar realizado por Koschorreck et al. (2008) indicou a importância de mediadores enzimáticos na degradação de compostos aromáticos obtendo atividades superiores à 85° C e pH de 4,2 e 7,0.

Kirsch et al. (2015) em estudo semelhante avaliou o consumo de oxigênio de sistemas mediadores de lacase (LMS) e observaram que o HBA em combinação com tampão e lacase era o mediador com menor eficiência. Em contrapartida, quando ocorreu a combinação de tampão, lacase, HBA e fibras foi notado uma efetividade crescente.

**Figura 24- Gráfico de desejabilidade em função das variáveis de controle.**



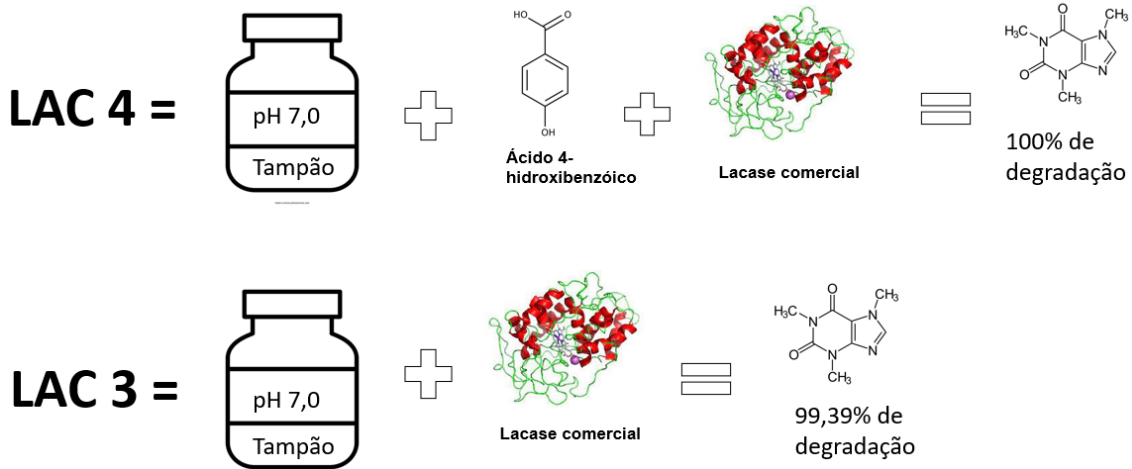
Fonte: Autoria própria (2021).

De acordo com Bruns et al. (1995) para determinar os níveis dos fatores que irão produzir o conjunto de resposta adequado existem várias oportunidades e isto varia em função do problema avaliado. O gráfico de desejabilidade (Figura 24) indica o comportamento de desejabilidade em função das variáveis de controle. A linha tracejada vermelha indica um valor de referência e a curvatura da variável independente mostra a interferência da mesma na variável de resposta. É possível observar que a curva em relação a variável HBA ficou mais inclinada em relação a linha de referência, demonstrando maior interferência no processo.

O pH é um fator fundamental para eficiência da lacase, sua variação pode modificar a afinidade e especificidade com o substrato, onde para lacase o pH ótimo se situa entre 3 e 7 (BATISTA, 2009).

Os ensaios pilotos LAC 3 e LAC 4 apresentaram atividade de degradação de 99,39% e 100% em pH 7,0, respectivamente, de acordo com a Figura 25.

**Figura 25- Esquema reacional dos ensaios LAC 4 e LAC 3, sua caracterização e eficiência de degradação.**

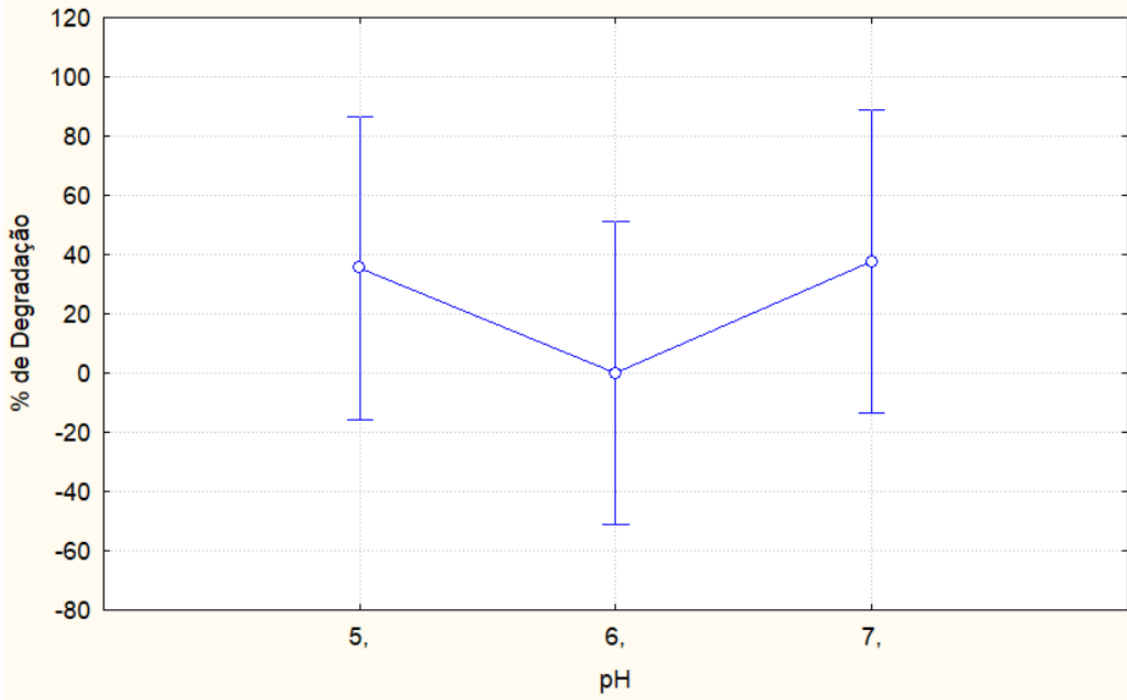


**Fonte: Autoria própria (2021).**

A lacase comercial demonstrou eficiência em pH 7,0, com e sem mediador HBA. Em pH 5,0 a lacase comercial não apresentou nenhum resultado significativo. Silveira (2019) avaliou a degradação de corantes têxteis através de imobilização com lacase bruta e comercial. Como resultado, a maior carga enzimática que pode ser fornecida ao suporte foi a enzima comercial, que por sua vez, apresenta o maior grau de pureza. A enzima bruta contém outras proteínas, que podem ocupar o sítio ativo e reduzir a área disponível. Estudo semelhante foi relatado por Bettin et al. (2016) avaliou a aplicação de lacase bruta e comercial em corantes obtendo resultados superiores com a enzima comercial.

Kelbert et al. (2021) estudou a eficácia de remoção do antibiótico dextrorrubicina por lacase, onde a maior degradação enzimática ocorreu em pH 7,0. Quando a reação foi alterada para pH 8,0 houve uma redução de 79% na taxa de degradação. Segundo Lloret et al. (2010) quando o pH meio reacional ultrapassa a faixa de 8,0 ocorre a redução na taxa de degradação devido à baixa atividade de lacase em pH alcalino.

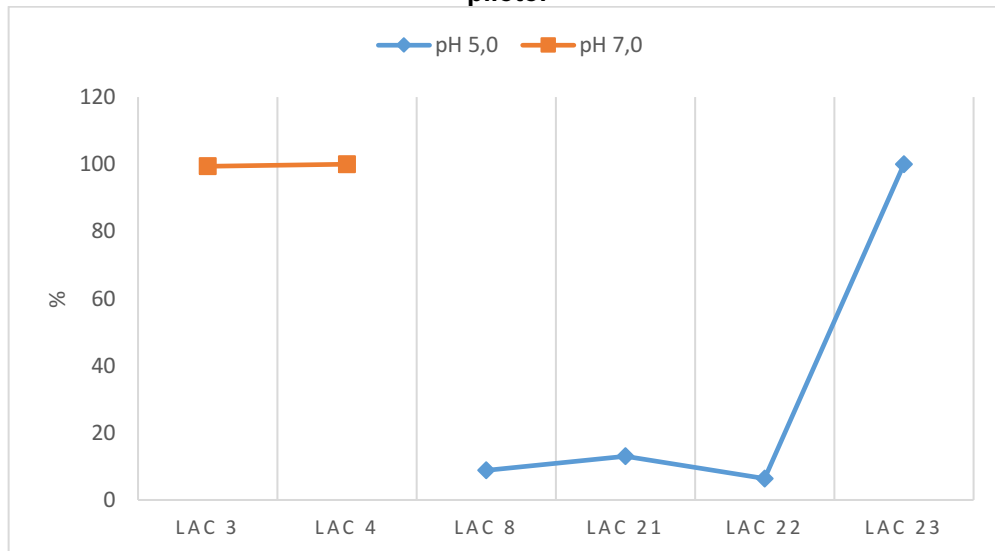
**Figura 26- Relação da concentração de mediador com a degradação da cafeína.**



**Fonte: Autoria própria (2021).**

Na Figura 26 como resposta de rendimento para o pH os valores 5 e 7 em combinação com uma concentração de mediador de 2 mM proporcionaram uma eficiência de 100%. Para pH 6 os valores foram inferiores e não apresentam resposta de rendimento significativa ( $p > 0,05$ ).

**Figura 27- Efeito do pH na degradação de cafeína sob diferentes meios reacionais no teste piloto.**



**Fonte: Autoria própria (2021).**

De acordo com Slagman et al. (2016) a lacase produzida por *Trametes versicolor* possui uma eficiente oxidação de substratos sob condições de pH 5,0. Tian et al. (2020) analisaram a eficiência da lacase na degradação de tetraciclina e oxitetraciclina e alcançaram 100% de eficiência em pH 6,0. Zhang et al. (2020) avaliaram a degradação de clorofenol com lacase imobilizada e livre, obtendo degradação de 100% em pH na faixa de 4,5 e 5,0.

**Tabela 16- Influência do pH na degradação de variados compostos recalcitrantes por lacase.**

Enzima	Espécie	Composto	pH Ótimo	Eficiência de degradação (%)	Referência
Lacase	<i>Trametes versicolor</i>	Dexorrubicina	7,0	100	KELBERT et al., (2021)
Lacase	<i>Rhus vernicifera</i>	Clorofenol	4,5; 5,0	100	ZHANG et al., (2020)
Lacase	<i>Trametes versicolor</i>	Clorotalonil, isoproturon, pirimetanil	4,0	100	SARKER et al., (2020)
Lacase	<i>Trametes versicolor</i>	Isoproturon	5,0	100	ZENG et al., (2017)
Lacase	<i>Trametes versicolor</i>	Clorpirifos, atrazina	5,0	100	JIN et al., (2016)

Fonte: Autoria própria (2021).

Arimurti et al. (2018) analisaram a degradação da cafeína por *Pseudomonas monteilii* KRM9. A maior taxa de degradação foi de 99,26% em meio de cafeína após 24 h de incubação. A teobromina não foi usada como intermediário metabólico da degradação da cafeína, indicando um novo mecanismo de degradação.

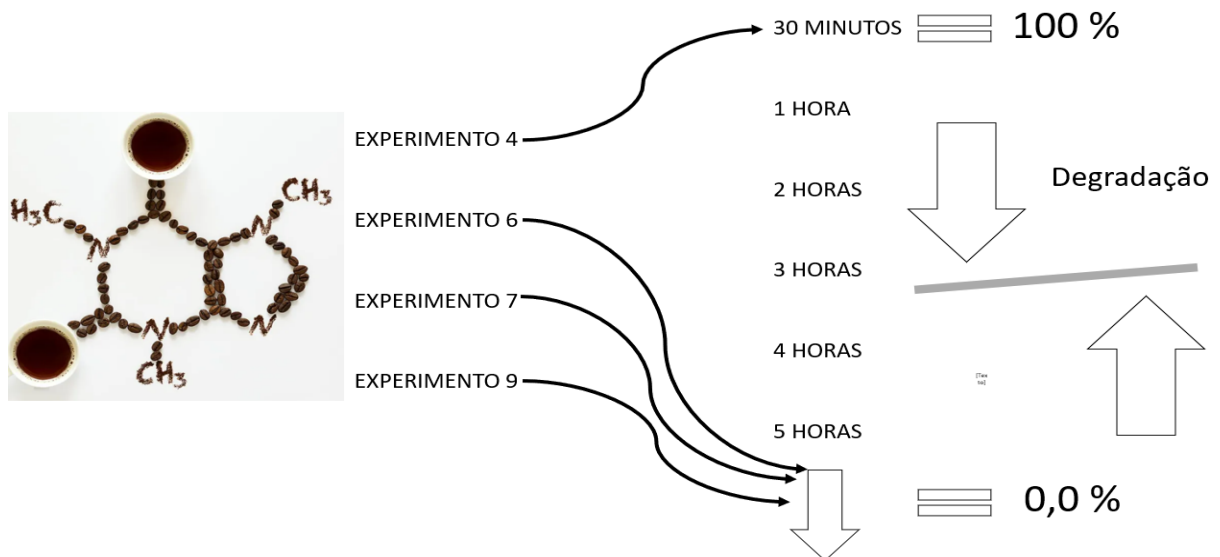
As reações em pH 6,0 não apresentaram resultados satisfatórios e, conseqüentemente na Tabela 16 os melhores rendimentos no comparativo foram nas faixas de pH de 4,0 e 7,0. Na figura 27 é possível observar que em pH 5,0 houve 100 % de degradação da cafeína utilizando lacase bruta com 2 mM de HBA (LAC23). Já para pH 7 a eficiência de degradação foi de praticamente 100% com e sem sistema mediador (LAC3 e LAC4). É possível trabalhar com ambas faixas de pH, porém, levando em conta custos de processo em grande escala utilizando a lacase bruta em pH 5 seria mais vantajoso devido ao alto custo da enzima comercial.

### 5.5 Cinética de Degradação da Cafeína

O estudo da velocidade de reação onde os processos ocorrem em detrimento dos fatores que a influênciam, como: concentração de reagentes, temperatura, pH, superfície de contato e catalisadores é chamado de cinética. Para estabelecer os mecanismos e entender a fase de transformação em uma certa faixa de tempo é necessário o dado das concentrações de reagentes (SINKO, 2008).

São apresentados os resultados da degradação de cafeína utilizando a enzima lacase.

**Figura 28- Cinética de degradação da cafeína.**

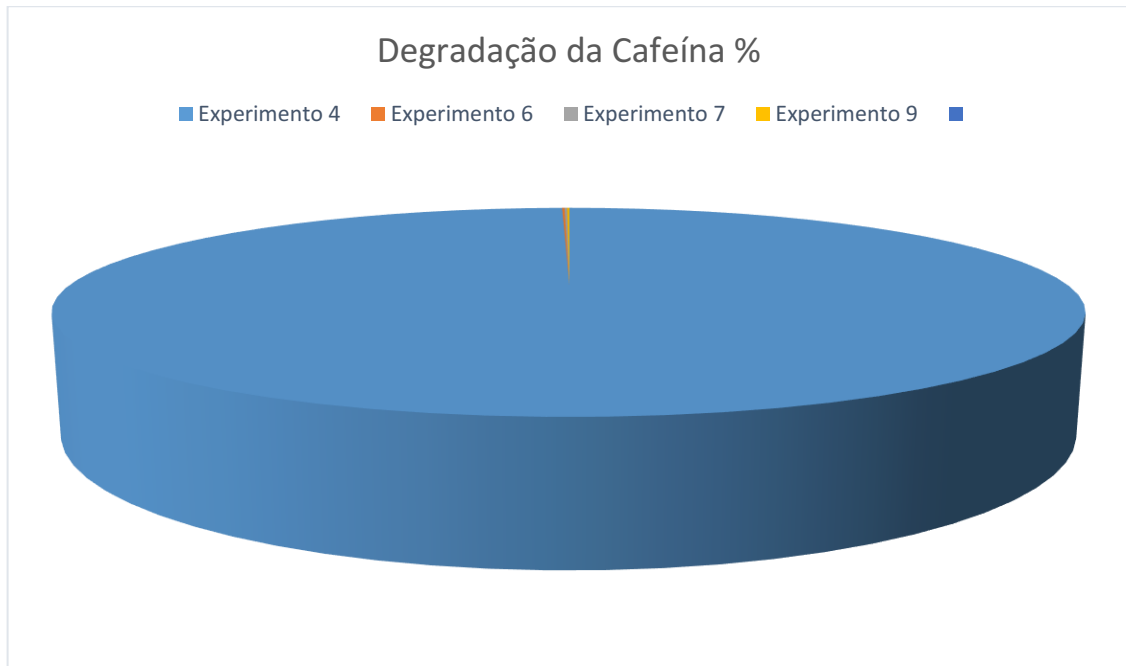


**Fonte: Autoria própria (2021).**

A cinética foi realizada para os experimentos que apresentaram degradação na etapa anterior. Cada ponto foi obtido em duplicata e o tempo máximo foi de 5 horas, com intervalo de 30 minutos para primeira amostra e de 1 hora para as demais. Contudo somente 1 ensaio apresentou atividade que foi no início da reação (Figura 28). Nos demais ensaios não foi possível uma clara observação da cinética, principalmente na taxa inicial.



**Figura 29- Performance dos experimentos frente a cinética realizada em um período de 5 horas.**



**Fonte: Aatoria própria (2021).**

A partir da Figura 29, é possível afirmar que a degradação da cafeína no experimento 4 é de 100% em 30 minutos com as seguintes concentrações: 2,0 mM de HBA, pH 7 e concentração de lacase comercial de ( $\cong 7000$  U/L). Nos demais experimentos até 5 horas de reação os valores são praticamente constantes, não indicando degradação.

Quando todos os sítios ativos da enzima estão preenchidos, é referido a velocidade inicial que apresenta interação com a velocidade máxima ( $V_{max}$ ), ou seja, quando todas as enzimas estão no complexo enzima-substrato) (WILSON; WALKER, 2010). A concentração de lacase bruta nos experimentos 6,7 e 9 era de praticamente o dobro ( $\cong 14000$  U/L) do que presente no experimento 4 com lacase comercial ( $\cong 7000$  U/L). O extrato bruto possui outras proteínas e outros compostos que podem saturar o sítio ativo da enzima reduzindo ou impossibilitando a reação. De acordo com Khilifi et al. (2010) a oxidação de mediadores gera radicais livres que por sua vez distorcem o sistema enzimático quando há presença de outros compostos (proteínas) nos sítios ativos.

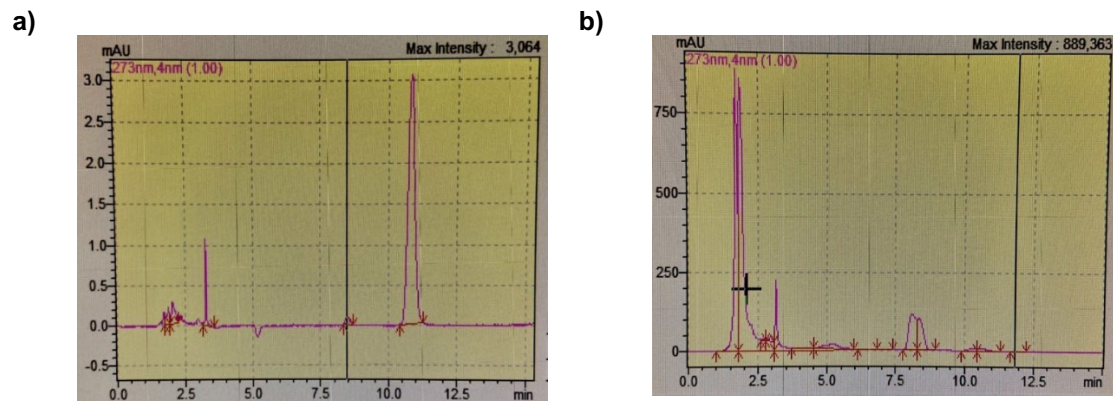
**Tabela 17- Degradação de compostos recalcitrantes pela enzima lacase.**

Enzima	Fungo	Composto	Tempo	Degradação (%)	Referência
Lacase	<i>Trametes villosa</i>	Cafeína	30 min	100	O Autor
Lacase	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Oxitetraciclina	24 h	99,66	Medrado, (2017)
Lacase	<i>Trametes versicolor</i>	Pimimetanil e Isoproturon	24 H	100	Jin <i>et al.</i> , (2016)
Lacase	<i>Trametes versicolor</i>	Fenantreno	36 H	65	Mun-Jung <i>et al.</i> , 2004)
Lacase	<i>Trametes versicolor</i>	2,4- Diclorofenol	10 H	94	Zhang <i>et al.</i> , 2008)

Fonte: Autoria própria (2021).

Tanto a lacase bruta como a lacase comercial proporcionaram uma eficiência de praticamente 100% na degradação da cafeína, porém, a lacase comercial (experimento 4) foi capaz de nos primeiros 30 minutos de reação reduzir por inteiro a concentração de cafeína (Figura 30).

**Figura 30-Cromatogramas e tempo de retenção da cafeína (11 min) dos ensaios realizados na cinética de degradação.**



Nota: a) Experimento 7. b) Experimento 4

Fonte: Autoria própria (2021).

Os compostos elencados na Tabela 17 são recalcitrantes e somente dois autores utilizaram em seus experimentos sistema mediador (JIN *et al.*, 2016 e Mun-jung *et al.*, 2004) com resultados máximos atingidos em 24 e 36 horas. Zhang *et al.*, (2008) imobilizaram a lacase visando melhor estabilidade, resultando em 94% de degradação em 10 horas de reação. Medrado 2017 utilizaram lacases produzidas por *Pleurotus ostreatus* obtendo resultados máximos de 99,66% na degradação do

antibiótico oxitetraciclina. Quando comparamos o experimento 4, a degradação ocorre 100% em um tempo curto de 30 minutos, isto de certa forma, gera muitas vantagens e economia como: redução de reagentes, consumíveis, energia, tempo reduzido e principalmente eficiência do processo em 100%.

## 6 CONCLUSÃO

A metodologia proposta para extração da cafeína nos grãos verdes de café indicou a melhor combinação das variáveis, obtendo a máxima concentração de cafeína aplicando 1:10 soluto/solvente, 15 minutos, 98° C. Essa metodologia de extração permitiu também a obtenção de outros compostos bioativos como compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos grãos de café verde.

A lacase produzida pelo fungo *Trametes villosa* e a lacase comercial apresentaram eficiência de degradação total de cafeína, monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com arranjo de diodos, sob condições semelhantes. Através da cinética de degradação foi possível observar que a lacase comercial em pH 7,0 e com a adição de 2 mM de HBA tem capacidade de degradar a cafeína em 30 minutos de reação.

Dessa forma, a lacase presente no extrato bruto produzido no laboratório demonstrou potencial para ser utilizada na degradação de cafeína, com efeitos comparáveis a lacase adquirida comercialmente.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S.A; PEREIRA, R.G.F.A; LIMA, A.R; FERREIRA, E.B; MALTA, M.R. Bioactive compounds in whole and decaffeinated coffee and sensorial quality of the beverage. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p.1799-1804, 2008.
- AJILA, C.M; BRAR, S.K; VERMA, M; TYAGI, R.D; VALÉRO, J.R. Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* - Liberation and extraction of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1071-1080, 2011.
- ALMEIDA, D.V.P; PEREIRA, N.K; MOREIRA, D.A.R. Efeitos Cardiovasculares da Cafeína: Revisão de literatura. **Revista Ciências em Saúde**, v. 3, p. 1-15, 2013.
- ALMEIDA, S.L.H. **Monitoramento da maturação do café arábica utilizando câmera digital modificada a bordo de veículo aéreo não tripulado**. 2019. 51 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2019.
- ALVES, B.H.P; NASCIMENTO, E.A; AQUINO, F.J.T; CHANG, R; MORAIS, S.A.L. Composição química de cafés torrados do cerrado e do Sul de Minas Gerais. **Ciência e Engenharia**, v. 16, p. 9-15, 2007.
- ANITA, S.H.; ARDIATI, F.C.; OKTAVIANI, M.; SARI, F.P.; NURHAYAT, O.D.; RAMADHAN, K.P.; YANTO, D.H.T. Immobilization of laccase from *Trametes hirsuta* EDN 082 in light expanded clay aggregate for decolorization of Remazol Brilliant Blue R dye. **Bioresource Technology Reports**, v. 12, p. 100602, 2020.
- ARAB, L. Epidemiologic Evidence on Coffee and Cancer. **Nutrition and Cancer**, v. 62, p. 271-283, 2010.
- ARIMURTI, S.; ARDYATI, T.; NURANI, Y.; SISWOYO, T.G.; SUHARJONO, S. Degradation of caffeine by *Pseudomonas monteilii* KRM9. **Malaysian Society for Microbiology**, v. 14, p.55-60, 2018.
- ASFEW, Z.; DEKEBO, A. Quantification of caffeine content in coffee bean, pulp and leaves from Wollega Zones of Ethiopia by high performance liquid chromatography. **Trends in Phytochemical Research (TPR)**, v. 3, p. 261-274, 2019.
- ASHE, B.; NGUYEN, L.N.; HAI, F.I.; LEE, D.; MERWE, J.P.V.; LEUSCH, F.D.L.; PRICE, W.E.; NGHIEM, L.D. Impacts of redox-mediator type on trace organic contaminants degradation by laccase: Degradation efficiency, laccase stability and effluent toxicity. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 1-8, 2016.
- BANKOLE, P.O.; SEMPLE, K.T.; JEON, B.; GOVINDWAR, S.P. Impact of redox-mediators in the degradation of olsalazine by marine-derived fungus, *Aspergillus aculeatus* strain bpo2: Response surface methodology, laccase stability and kinetics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111742, 2021.

BATISTA, F.L. **Produção de lacase e bioconversão de flavonoides por *Pycnoporus sanguineus***. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Farmácia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

BELCHIOR, V; BOTELHO, B.G; OLIVEIRA, L.S; FRANCA, A.S. Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Spectroscopy (ATR-FTIR) and chemometrics for discrimination of espresso coffees with different sensory characteristics. **Food Chemistry**, v. 17, p. 35, 2017.

BERTRAND, G. “Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase,” **Comptes Rendus de L'Academie des Sciences**, vol. 120, pp. 266–269, 1985.

BERTRAND, B; MORALES, F.M; VALENCIA, R.T; ROJAS, S; URDAPILLETA, L.A; HERNÁNDEZ, M.R.T. Biochemical and molecular characterization of laccase isoforms produced by the white-rot fungus *Trametes versicolor* under submerged culture conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 339-347, 2015.

BORTOLINI, D. G.; RIBEIRO, M. A.; HAMINIUK, C. W.; BALTHAZAR, J. M.; LENZ, W. B.; TUSSET, A. M.; LENZI, G. G. Theoretical analysis of methylxanthines. **Mathematics in Engineering, Science and Aerospace (MESA)**, v. 10, n. 1, 2019.

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

BRASIL. Resolução RDC nº 277, 22 de setembro de 2005. Aprova o “**REGULAMENTO TÉCNICO PARA CAFÉ, CEVADA, CHÁ, ERVA-MATE E PRODUTOS SOLÚVEIS**”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <[www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjJwMg%2C%2C](http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjJwMg%2C%2C)>. Acesso em 03 de dezembro de 2018.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Café, Safra 2018. Primeiro levantamento, Janeiro de 2018. Disponível em: <[www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/levantamento/conab\\_safra2018\\_n1.pdf](http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/levantamento/conab_safra2018_n1.pdf)>. Acesso em 03 de dezembro de 2018.

CANO-MARQUINA, A; TARÍN, J.J.; CANO, A. The impact of coffee on health. **Maturitas**, v. 75, p. 7-21, 2013.

CHASSAGNEZ, A.L.M.; CORREA, N.C.; MEIRELES, M.A.A. Extração de Oleoresina de Cúrcuma (*cúrcuma longa* L) com CO<sub>2</sub> Supercrítico. **Food Science and Technology**, v. 17, 1997.

CROZIER, A; JAGANATH, I.B; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v.26, p. 965-1096, 2009.

DAHMOUNE, F.; REMINI, H.; DAIRI, S.; AOUN, O.; MOUSSI, K.; BOUAOUDI-MADI, N.; ADJEROUD, N.; KADRI, N.; LEFSIH, K.; BOUGHANI, L.; MOUNI, L.; NAYAK, B.; MADANI, K. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *P.lentiscus* L. leaves: Comparative study of artificial neural network(ANN) versus degree of experiment for prediction ability of phenolic compounds recovery. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 251-261, 2015.

DEL RIO, D; RODRIGUES-MATEOS, A; SPENCER, J.P.E; TOGNOLINI, M; BORGES, G; CROZIER, A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 18, p. 1818–1892, 2013.

DE LUCA, S.; CIOTOLI, E.; BIANCOLILLO, A.; BUCCI, R.; MAGRI, A.D.; MARINI, F. Simultaneous quantification of caffeine and chlorogenic acid in coffee green beans and varietal classification of the samples by HPLC-DAD coupled with chemometrics. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 28748-28759, 2018.

DEMARCHE, P.; JUNGHANNS, C.; MAZY, N.; AGATHOS, S.N. Design-of-experiment strategy for the formulation of laccase biocatalysts and their application to degrade bisphenol A. **New Biotechnology**, v. 30, p. 96-103, 2012.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214-219, 1980.

BETTIN, F.; BOFF, N.A.; CONCEIÇÃO, R.S.; SILVEIRA, M.M.; DILLON, A.J.P. Aplicação de Lacases Bruta e Comercial na Descoloração de Misturas de Corantes das Classes Antraquinona, Azo e Trifenilmetano. **Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC**, 2016.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; NETO, B. B. Planejamento e otimização de experimentos. **Campinas: Editora da Unicamp**, 1995.

DENOEUDE, F.; CARRETERO-PAULET, L.; DEREEPER, A.; DROC, G.; GUYOT, R.; PIETRELLA, M.; ZHENG, C., ALBERTI, A.; ANTHONY, F.; APREA, G. The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. **Science**, v. 345, p. 1181-1184, 2014.

ELISASHVILI, V; KACHLISHVILI, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot *Basidiomycetes*. **Journal of Biotechnology**, v. 144, p. 37-42, 2009.

ESTEBAN-DÍEZ, J.M; GONZÁLEZ-SÁIZ, C.P. Prediction of sensory properties of espresso from roasted coffee samples by near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 525, p. 171-182, 2004.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. **Tendências do mercado de café. Relatório customizado preparado pelo Euromonitor international para Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC)**, 2015. Disponível em: <[https://www.abic.com.br/wp-content/uploads/2020/01/Euromonitor\\_Coffe-Market-Trends-in-Brazil\\_-Encafe.pdf](https://www.abic.com.br/wp-content/uploads/2020/01/Euromonitor_Coffe-Market-Trends-in-Brazil_-Encafe.pdf)>\_ Acesso em: 20 de abril de 2018.

FARAH, A; MONTEIRO, M.C; CALADO, V; FRANCA, A.S; TRUGO, L.C. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, p. 373–380, 2006.

FARAH, A. Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention, First Edition. Edited by Yi-Fang Chu. **John Wiley and Sons, Inc. and the Institute of Food Technologists**, p. 21-58, 2012. ISBN: 9781119949893.

FELTRIN, A.C.P.; SIBAJA, K.V.M.; TUSNSKI, C.; CALDAS, S.S.; PRIMEL, E.G.; GARDA-BUFFON, J. Evaluation of the Suitability of Analytical Methods in Trichothecene A and B Degradation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 2117-2126, 2018.

FILHO, O.G. [CAFÉ BIOTECNOLOGIA] IAC recorre à tesoura genética para desenvolver café sem cafeína. **Revista Cafeicultura**, 2021. Disponível em: <<https://revistacafeicultura.com.br/?mat=69993>>. Acesso em 10 de outubro de 2021.

GARAMBONE, E; ROSA, G. Possíveis Benefícios do Ácido Clorogênico à Saúde. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 18, p. 229-235, 2007.

GARCÍA, L.R.P; BIANCHI, V.L.D. Efeito da fermentação fúngica no teor de compostos fenólicos em casca de café robusta. **Ciências Agrárias**, v. 33, p. 777-785, 2015.

GETACHEW, A.T.; CHUN, B.S. Influence of hydrothermal process on bioactive compounds extraction from green coffee bean. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 38, p. 24-31, 2014.

GODOS, J; PLUCHINOTTA, F.R; MARVENTANO, S; BUSCEMI, S; LI VOLTI, G; GALVANO, F; GROSSO, G. Coffee components and cardiovascular risk: beneficial and detrimental effects. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 65, p. 925-936, 2014.

GOKULAKRISHNAN, S; CHANDRARAJ, K.S; GUMMADI, N. Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 225-232, 2005.

HOU, HONGMAN; ZHOU, J; WANG, J; DU, C; YAN, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1415-1419, 2004.

HUANG, R.; O'DONNELL, A.J.; BARBOLINE, J.J.; BARKMAN, T.J. Convergent evolution of caffeine in plants by co-option of exapted ancestral enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, p. 10613-10618, 2016.

IBRAHIM, S; SHUKOR, Y; SYED, M.A; RAHMAN, N.A; KHALIL, K.A; KHALID, A; AHMAD, S.A. Bacterial degradation of caffeine: A review. **Asian Journal of Plant Biology**, v. 2, p. 24-33, 2014.



ICO, INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Descafeinação**, 2009. Disponível em: <[http://www.ico.org/pt/decaffeination\\_p.asp](http://www.ico.org/pt/decaffeination_p.asp)>. Acesso em 22 de abril de 2018.

ICO, INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Relatório sobre o mercado do café**, 2018. Disponível em: <[http://www.consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes\\_tecnicas/relatorio\\_oic\\_agosto\\_2018.pdf](http://www.consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/relatorio_oic_agosto_2018.pdf)> Acesso em 03 de dezembro de 2018.

IVAMOTO, S.T; SAKURAY, L.M; FERREIRA, L.P; KITZBERGER, C.S.G; SCHOLZ, M.B.S; POT, D; LEROY, T; VIEIRA, L.G.E; DOMINGUES, D.S; PEREIRA, L.F.P. Diterpenes biochemical profile and transcriptional analysis of cytochrome P450s genes in leaves, roots, flowers, and during *Coffea arabica* L. fruit development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 111, p. 340-347, 2017.

JAHANGIRI, E.; SEIWERT, B.; REEMTSMA, T., SCHLOSSER, D. Laccase- and electrochemically mediated conversion of triclosan: metabolite formation and influence on antibacterial activity. **Chemosphere**, v. 168, p. 549–558, 2017.

JESZKA-SKOWRON, M.; SENTKOWSKA, A.; PYRZYNKA, K.; PENA, M.P. Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. **European Food Research and Technology**, v. 242, p. 1403-1409, 2016.

JESZKA-SKOWRON, M.; FRANKOWSKI, R.; ZGOLA-GRZESKOWIAK, A. Comparison of methylxantines, trigonelline, nicotinic acid and nicotinamide contents in brews of green and processed Arabica and Robusta coffee beans – Influence of steaming, decaffeination and roasting processes on coffee beans. **LWT - Food Science and Technology**, v. 125, p. 109344, 2020.

JIN, X.; YU, X.; ZHU, G.; ZHENG, Z.; FENG, F.; ZHANG, Z. Conditions Optimizing and Application of Laccase-mediator System (LMS) for the Laccase-catalyzed Pesticide Degradation. **Scientific reports**, v. 6, p. 35787, 2016.

JIN, L.; BHUIYA, M.W.; LI, M.; LIU, X.; HAN, J.; DENG, W.; WANG, M.; YU, O.; ZHANG, Z. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for caffeine and theobromine production. **PLoS One**, p. 12, 2014.

KAMIDA, H.M.; DURRANT, L.R.; MONTEIRO, R.T.R.; ARMAS, E.D. Biodegradation of textile effluents by *Pleurotus sajor-caju*. **Quimica Nova**, v. 28, p. 629-632, 2005.

KELBERT, M.; PEREIRA, C.S.; DARONCH, N.A.; CESCO, K.; MICHELS, C.; OLIVEIRA, D.; SOARES, H.M. Laccase as an efficacious approach to remove anticancer drugs: A study of doxorubicin degradation, kinetic parameters, and toxicity assessment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 409, p. 124520, 2021.

KIRSCH, A.; OSTENDORF, K.; EURING, M. Oxygen Consumption of Laccase-Mediator-Systems (LMS). **Journal Of Materials Science Reserch**, v. 4, 2015.

KOSCHORRECK, K.; RICHTER, S.M.; ENE, A.B.; RODUNER, E.; SCHMID, R.D.; URLACHER, V.B. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 217-224, 2008.

KUES, U.; BOHN, C.; EURING, M.; MULLER, C. Enzymatically Modified Wood in Panel Board Production. **Wood Production, Wood Technology, and Biotechnological Impacts**, p. 433-468, 2007.

KUNAMNENI, A.; PLOU, J.F.; BALLESTEROS, A.; ALCALDE, M. Laccases and their Applications. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 2, p. 10-24, 2008.

KHILIFI, R.; BELBAHRI, L.; WOODWARD, S.; ELLOUZ, M.; DHOUIB, A.; SAYADI, S.; MECHICHI, T. Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, p. 802-808, 2010.

KHUWIJITJARU, P.; PLERNJIT, J.; SUAYLAM, B.; SAMUHASENEETOO, S.; PONGSAWATMANIT, R.; ADACHI, S. Degradation kinetics of some phenolic compounds in subcritical water and radical scavenging activity of their degradation products. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 92, p. 810-815, 2014.

LANG, R.; DIEMINGER, N.; BEUSCH, A.; LEE, Y.M.; DUNKEL, A.; SUESS, B.; SKURK, T.; WAHL, A.; HAUNER, H.; HOFMANN, T. Bioappearance and pharmacokinetics of bioactives upon coffee consumption. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 8487-8503, 2013.

LI, X.; LIANG, X.; MCCLEMENTS, D.J.; LIU, X.; LIU, F. Applications of oxidases in modification of food molecules and colloidal systems: Laccase, peroxidase and tyrosinase. **Trends in Food Science e Technology**, v. 103, p. 78-93, 2020.

LIMA, A.R; PEREIRA, R.G.F.A; ABRAHÃO, S.A; DUARTE, S.M.S; PAULA, F.B.A. Coffee bioactive compounds: in vitro antioxidant activity of green and roasted coffees before and after decaffeination. **Química Nova**, v. 33, p. 20-24, 2010.

LING, Z.R; WANG, S.S; ZHU, M.J; NING, Y.J; WANG, S.N; LI.B; YANG, A.Z; ZHANG, G.Q; ZHAO, X.M. An extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Trametes sp.* LAC-01. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 785-793, 2015.

LUDWIG, I.A.; MENA, P.; CALANI, L.; CID, C.; DEL-RIO, D.; LEAN, M.E.J, CROZIER, A. A. Variations in caffeine and chlorogenic acid contents of coffees: What are we drinking? **Food and Function**, v. 5, p. 1718-1726, 2014.

LLORET, L.; EIBES, G.; LÚ-CHAU, T.A.; MOREIRA, M.T.; FEIJOO, G.; LEMA, J.M. Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 124-131, 2010.

MACHEINER, L.; SCHMIDT, A.; SCHREINER, M.; MAYER, H.K. Green coffee infusion as a source of caffeine and chlorogenic acid. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 84, p. 103307, 2019.

MACIEL, M.J.M.; SILVA, A.C.E.; RIBEIRO, H.C.T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electron. Electronic Journal of Biotechnology*, v. 13, p. 1–13, 2010.

MARQUETTI, I. **Classificação de genótipos de café arábica usando espectroscopia de infravermelho próximo**. 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

MARSZALEK, K.; SZCZEPANSLA, J.; STARZONEK, S.; WOZNIAK, L.; TRYCH, U.; SKAPSKA, S.; RZOSKA, S.; SARAIVA, J.A.; LORENZO, J.M.; BARBA, F.J. Enzyme inactivation and evaluation of physicochemical properties, sugar and phenolic profile changes in cloudy apple juices after high pressure processing, and subsequent refrigerated storage. *Journal of Food Process Engineering*, p.8, 2019.

MARTINEZ, H.E.P; CLEMENTE, J.M; LACERDA, J.S; NEVEZ, Y.P; PEDROSA, A.W. Coffee mineral nutrition and beverage quality. *Revista Ceres*, v. 61, p. 838-848, 2014.

MARTINI, D.; DEL-BO, C.; TASSOTTI, M.; RISO, P.; DEL-RIO, D.; BRIGENTHI, F.; PORRINI, M. Coffee consumption and oxidative stress: A review of human intervention studies. *Molecules*, v. 21, p. 979, 2016.

MEDRADO, L.C.L. **Biorremediação do antibiótico oxitetraciclina utilizando lacases produzidas pelo fungo *Pleurotus ostreatus***. Originalmente apresentada como Dissertação de mestrado, Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Goiás, 2012.

MIZUNO, K.; OKUDA, A.; KATO, M.; YONEYAMA, N.; TANAKA, H.; ASHIHARA, H.; FUJIMURA, T. Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Letters*, v. 534, p. 75-81, 2003.

MIZUNO, H.; HIRAI, H.; KAWAI, S.; NISHIDA, T. Removal of estrogenic activity of iso-butylparaben and n-butylparaben by laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Biodegradation*, v. 20, p. 533-539, 2009.

MONTEIRO, M.C; TRUGO, L.C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Química nova*, v. 28, p. 637-641, 2005.

MUN-JUNG, H.; HYOUNG-TAE, P.; ISNI, S.H. Degradation of Phenanthrene by *Trametes versicolor* and Its Laccase. *Korea Science*, v.42, p. 94-98, 2004.

MUSSATO, S.I; BALLESTEROS, L.F; MARTINS, S; TEIXEIRA, J.A. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, v. 83, p. 173-179, 2011.

NANJUNDAIAH, S; MUTTURI, S; BHATT, P. Modeling of caffeine degradation kinetics during cultivation of *Fusarium solani* using sucrose as co-substrate. *Biochemical Engineering Journal*, v. 125, p. 73-80, 2017.

NAJAFI, N.M; HAMID, A.S; AFESHIM, R.K. Determination of caffeine in black tea leaves by Fourier transform infrared spectrometry using multiple linear regression. **Microchemical Journal**, v. 75, p. 151–158, 2003.

NETO, S.L.M. **Caracterização de lacase de *Peniophora cinerea* e estudo do potencial de aplicação biotecnológica**. 2012. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

OGINO, H; WATANABE, F; YAMADA, M; NAKAGAWA, S; HIROSE, T; NOGUCHI, A; YASUDA, M; ISHIKAWA, H. Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PST-01. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, p. 61-68, 1999.

OLIVEIRA, M.P.A. **Expressão de genes da biossíntese de cafeína em frutos e endospermas de *coffea arábica*: sem cafeína**. 2007. 59 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2007.

OLIVEIRA, N.A.; CORNELIO-SANTIAGO, H.P.; FUKUMASU, H.; OLIVEIRA, A.L. Green coffee extracts rich in diterpenes – Process optimization of pressurized liquid extraction using ethanol as solven. **Journal of Food Engineering**, v. 17, p. 30548-30554, 2017.

OLIVEIRA, E.R.; SILVA, R.F.; SANTOS, P.R.; QUEIROZ, F. Potential of alternative solvents to extract biologically active compounds from green coffeebeans and its residue from the oil industry. **Food and Bioproducts Processing**, v. 115, p. 47-58, 2019.

OSMA, J.F.; TOCA HERRERA, J.L.; RODRIGUEZ-COUTO, S. Uses of Laccases in the Food Industry. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 8, 2010.

PACHECO, S.M.V.; SOARES, C.H.L. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleiras. **Química Nova**, v. 37, p. 209-214, 2014.

PASTORIZA, S.; RUFÍAN-HENARES, J.A. Contribution of melanoidins to the antioxidant capacity of the Spanish diet. **Food Chemistry**, v. 164, p. 438-435, 2014.

PENARIOL, M.C; MONTEIRO, A.C; PITELLI, R.A; PEREIRA, G.T. Produção de *Bipolaris euphorbiae* em meios de cultura sólidos e líquidos obtidos de grão e resíduos agroindustriais . **Bragantina**, v. 67, p. 805-814, 2008.

PIAZZA, L; GIGLI, J; BULBARELLO, A. Interfacial rheology study of espresso coffee foam structure and properties. **Journal of Food Engineering**, v. 84, p. 420-429, 2008.

RAMALAKSHMI, K.; RAGHAVAN, B. Caffeine in coffee: its removal. Why and how? **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 39, p. 441-456, 1999.

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

RAMPINELLI, J.R. **Utilização de casca de banana para a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju* CCB 019**. 2016, 132 p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2016, 132p.

RAUT, J; SHINDE, R.B; CHAUHAN, N.M; KARUPPAYIL, S.M. Inhibition of planktonic and biofilm growth of *Candida albicans* reveals novel antifungal activity of caffeine. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 7, p. 777-782, 2013.

RODAKIEWICZ-NOWAK, J.; KASTURE, S.M.; DUDEK, B.; HABER, J. Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 1-11, 2000.

RODAKIEWICZ-NOWAK, J.; WILKOLAZKA, A.J. Catalytic activity of *Cerrena unicolor* laccase in aqueous solutions of water-miscible organic solvents—Experimental and numerical description. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, p. 53-59, 2007.

RIBEIRO, M.V.M.; BORALLE, N.; PEZZA, H.R.; PEZZA, L.; TOCI, A.T. Authenticity of roasted coffee using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 57, p. 24-30, 2017.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 219–226, 2006.

SAGON, C; AARP, E.P. Caffeine for Your Health — Too Good to Be True?. **Healthy Living Journal**, p. 1-5, 2013.

SALINAS-VARGAS, M.E.; CANIZARES-MACIAS, M.P. On-line solid–phase extraction using a C18 minicolumn coupled to a flow injection system for determination of caffeine in green and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, v. 147, p. 182-188, 2014.

SALVA, T.J.G; LIMA, V.B. A composição química do café e as características da bebida e do grão. **O Agrônomo, Campinas**, v. 59, p. 57-59, 2007.

SARKER, A.; LEE, S.; KWAK, S.; NANDI, R.; KIN, J. Comparative catalytic degradation of a metabolite 3,5-dichloroaniline derived from dicarboximide fungicide by laccase and MnO<sub>2</sub> mediators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 196, p. 110561, 2020.

SINKO, P.J. **Físico-Farmácia e Ciências Farmacêuticas**. 5ªed. Porto Alegre. Artmed, 2008.

SINGLETON, Vernon L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SILVEIRA, T.R. **Imobilização de lacase em partículas magnéticas recobertas com quitosana para aplicação na degradação de corantes têxteis**. 2019.

Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

SUMMERS, R.M; MOHANTY, S; GOPISHETTY, S; SUBRAMANIAN, M. Genetic characterization of caffeine degradation by bacteria and its potential applications. **Microbial Biotechnology**, v. 8, p. 369-378, 2015.

SHANMUGAM, M.K; RATHINAVELU, S; GUMMADI, S.N. Self-directing optimization for enhanced caffeine degradation in synthetic coffee wastewater using induced cells of *Pseudomonas* sp.: Bioreactor studies. **Journal of Water Process Engineering**, v. 44, p. 102431, 2021.

SLAGMAN, S.; ESCORIHUELA, J.; ZUILHOF, H.; FRANSSEN, M.C.R.

Characterization of the laccase-mediated oligomerization of 4-hydroxybenzoic acid. **Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 99367-99375, 2016.

TIAN, Q.; DOU, X.; HUANG, L.; WANG, L.; MENG, D.; ZHAI, L.; SHEN, Y.; YOU, C.; GUAN, Z.; LIAO, X. Characterization of a robust cold-adapted and thermostable laccase from *Pycnoporus* sp. SYBC-L10 with a strong ability for the degradation of tetracycline and oxytetracycline by laccase-mediated oxidation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 382, p. 121084, 2020.

TOCI, A; FARAH, A; TRUGO, L.C. Efeito do Processo de Descafeinação com Diclorometano Sobre a Composição Química dos Cafés Arábica e Robusta Antes e Após a Torração. **Química Nova**, v. 29, p. 965-971, 2006.

TOLEDO, P.R.; PEZZA, L.; PEZZA, H.R.; TOCI, A.T. Relationship between the different aspects related to coffee quality and their volatile compounds.

**Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, p. 705-719, 2016.

THATHOLA, P; AGNIHOTRI, V; PANDEY, A. Microbial Degradation of Caffeine Using Himalayan Psychrotolerant *Pseudomonas* sp.GBPI\_Hb5 (MCC 3295). **Current Microbiology**, v. 78, p. 3924-3935, 2021.

THOMAZIELLO, R.A. A classificação do café. **Revista Cafeicultura**, 2014.

Disponível em: <<https://revistacafeicultura.com.br/?mat=55115>>. Acesso em 10 de outubro de 2021.

TURNBULL, D; RODRICKS, J.V; MARIANO, G.F; CHOWDHURY, F. Caffeine and cardiovascular health. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 89, p. 165-185, 2017.

TRAN, T.M.K.; KIRKMAN, T.; NGUYEN, M.; VUONG, Q.V. Effects of drying on physical properties, phenolic compounds and antioxidant capacity of Robusta wet coffee pulp (*Coffea canephora*). **Heliyon**, v. 5, p. 4498, 2020.

TRESSERRA-RIMBAU, A.; MEDINA-REMÓN, A.; ESTRUCH, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Coffee Polyphenols and High Cardiovascular Risk Parameters. **Coffee in Health and Disease Prevention**, p. 387–394, 2014.

UHNÁKOVÁ, B.; PETRICKKOVÁ, A.; BIEDERMANN, D.; HOMOLKA, L.; VEJVODA, V.; BEDNAR, P.; PAPOUSKOVÁ, B.; SULC, M.; MARTÍNKOVÁ, L. Biodegradation of brominated aromatics by cultures and laccase of *Trametes versicolor*. **Chemosphere**, v. 76, p. 826-832, 2009.

UPADHYAY, R.; RAMALAKSHMI, K.; RAO, L.J.M. Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans. **Food Chemistry**, v. 130, p. 184-188, 2012.

VIGNOLI, J.A.; VIEGAS, M.C.; BASSOLI, D.G.; BENASSI, M.T. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food Research International**, v. 61, p. 279-285, 2014.

VISWANATH, B.; RAJESH, B.; JANARDHAN, A.; KUMAR, A.P.; NARASIMHA, G. Fungal laccases and their applications in bioremediation. **Enzyme Research**, p. 21, 2014.

VOGEL, A. **Análise química quantitativa**. 5ª ed. São Paulo: Mestre Jou, p.462.

VRSANSKÁ, M.; VOBERKOVÁ, S.; JIMÉNEZ, A.M.J.; STRMISKA, V.; ADAM, V. Preparation and Optimisation of Cross-Linked Enzyme Aggregates Using Native Isolate White Rot Fungi *Trametes versicolor* and *Fomes fomentarius* for the Decolourisation of Synthetic Dyes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 23, p. 15, 2017.

XAVIER, M.B. **Compostos bioativos, atividade antioxidante e antiproliferativa de duas cultivares do café arábica (*Coffea arabica* L.)**. 2017. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Pós-Graduação em Biologia Vegetal, 2017.

ZHANG, K.; YANG, W.; LIU, Y.; ZHANG, K.; CHEN, Y.; YIN, X. Laccase immobilized on chitosan-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as reusable biocatalyst for degradation of chlorophenol. **Journal of Molecular Structure**, v. 1220, p. 128769, 2020.

ZHANG, J.; LIU, X.; XU, Z.; CHEN, H.; YANG, Y. Degradation of chlorophenols catalyzed by laccase. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v.61, p. 351-356, 2008.

ZAMPIERI, L.A. **Bioxidação fungica de valenceno a nootkatona, bioflavorizante de grapefruit**. 2006. 107f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP, 2006.

ZEEB, B.; SALMINEN, H.; FISCHER, L.; WEISS, J. Impact of Heat and Laccase on the pH and Freeze-Thaw Stability of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Adsorbed Biopolymer Nanoparticles. **Food Biophysics**, v. 9, p. 125,137, 2014.

ZENG, S.; QIN, Z.X.; XIA, L. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 119, p. 92-100, 2017.

ZULLI, A.; SMITH, R.N.; KUBATKA, P.; NOVAK, J.; UEHARA, Y.; LOFTUS, H.;

QARADAKHI, T.; POHANKA, M.; KOBYLIAK, N.; ZAGATINA, A.; KLIMAS, J.; HAYES, A.; LA-ROCCA, G.; SOUCEK, M.; KRUZLIAK, P. Caffeine and cardiovascular diseases: critical review of current research. **European Journal of Nutrition**, v. 55, p. 1331–1343, 2016.

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

WANG, J; FENG, J; JIA, W; CHANG, S; LI, S; LI, Y. Lignin engineering through laccase modification: a promising field for energy plant improvement. **Biotechnology for Biofuels**, p. 11, 2015.

WILSON, K.; WALKER, J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. 7. ed. Nova lorque: **Cambridge University Press**, p.484, 2010.

WORKU, M.; MEULENAER, B.; DUCHATEAU, L.; BOECKX, P. Effect of altitude on biochemical composition and quality of green arabica coffee beans can be affected by shade and postharvest processing method. **Food Research International**, v. 17, p. 30785-30788, 2018.

WU, M; LIN, M; LEE, C; YU, S; WANG, A; HO, T.D. Enhancement of laccase activity by pre-incubation with organic solvents. **Scientific Reports**, v. 9, p. 9754, 2019.

YAN, Y; LIU, N; HOU, N; DONG, L; LI, J. Chlorogenic acid inhibits hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 46, p. 68-73, 2017.

YILMAZ, Y; TOLEDO, R.T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 41-48, 2006.