



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA



Extração e Caracterização de Polissacáridos Isolados do Grão de Café da Gorongosa

SARA ROSEIRA PIMENTA

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica – Perfil de Bioprocessos

Orientadores:

Doutora Sónia Alexandra de Almeida Martins (ISEL/IPL)

Doutora Magda Nobre Semedo (ISEL/IPL)

Doutor José Cochicho Ramalho (ISA/UL)

Júri:

Presidente: Doutor José Augusto Paixão Coelho (ISEL/IPL)

Vogais:

Doutora Paula Scotti Lorenzini Borges Campos (INIAV)

Doutor Nelson Alberto Frade da Silva (ISEL/IPL)

Doutora Sónia Alexandra de Almeida Martins (ISEL/IPL)

Novembro 2023



ISEL

**INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**



Extração e Caracterização de Polissacáridos Isolados do Grão de Café da Gorongosa

SARA ROSEIRA PIMENTA

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre
em Engenharia Química e Biológica – Perfil de Bioprocessos

Orientadores:

Doutora Sónia Alexandra de Almeida Martins (ISEL/IPL)
Doutora Magda Nobre Semedo (ISEL/IPL)
Doutor José Cochicho Ramalho (ISA/UL)

Júri:

Presidente: Doutor José Augusto Paixão Coelho (ISEL/IPL)

Vogais:

Doutora Paula Scotti Lorenzini Borges Campos (INIAV)
Doutor Nelson Alberto Frade da Silva (ISEL/IPL)
Doutora Sónia Alexandra de Almeida Martins (ISEL/IPL)

Novembro 2023

*À minha avó Leonilde, que já dizia a todos que
eu era Engenheira, muito antes de eu o ser.*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao Camões – Instituto da Cooperação e da Língua, I.P. e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., através do projeto *TriCafé*, pelo financiamento deste estudo, e à Delta Cafés, pelo fornecimento de amostras de grão de café verde.

Ao Parque Nacional da Gorongosa e ao Instituto Superior de Agronomia, ao projeto IPL/2021/GoCoffee4H_ISEL, pelas amostras fornecidas, pela disponibilidade, confiança e ajuda, e pela oportunidade de participar num projeto em que realmente acredito.

Aos meus orientadores Professora Doutora Sónia Martins, Professora Doutora Magda Semedo e Doutor José Cochicho Ramalho, assim como à Professora Doutora Patrícia Barata e ao Professor Doutor António Eduardo Leitão pelo apoio, preocupação e ajuda que disponibilizaram.

À minha família, aos meus irmãos, à minha mãe Maria José Roseira e ao meu pai Fernando Pimenta, por me incentivarem a chegar até aqui, por investirem em mim, por estarem presentes em todas as celebrações de pequenas conquistas durante o caminho e por mostrarem sempre a todos o orgulho que têm em mim.

Ao meu padrinho Engenheiro Sérgio Fidalgo e à minha amiga Engenheira Maria Saramago, por serem dois exemplos excecionais de força, determinação e empenho, por todos os conselhos e todas as palavras de incentivo, desde o momento em que pus os pés neste Instituto.

Aos meus afilhados Engenheira Mariana Conduto e Rodrigo Candeias, por me motivarem a ser a melhor versão de exemplo que eles poderiam ter, por acreditarem em mim, por me incentivarem e me encherem de orgulho, e por me pagarem cafés essenciais ao meu bem-estar.

À Carolina Correia, Beatriz Fernandes e Marta Fernandes por me terem apoiado em maus momentos e terem aceitado todas as minhas facetas, pelas palavras apaziguadoras e por me mostrarem que se arranja sempre tempo para quem se gosta.

Aos meus grandes amigos e pilares na minha vida académica António Ablú, Filipa Jacques, Marcos Antunes, Mariana Carvalho, Olímpia Pechir e Rui Pratas pelas tardes no Firmino, pelas aulas na 2.03 (mesmo as que foram cortadas a metade), pelas sessões de estudo que muitas vezes envolviam alguém a tocar um instrumento ou a cantar, pelos jogos de matraquilhos, pelos abraços, estalos, festas e conversas que me salvavam em tempos difíceis.

Ao André Coimbra por nunca parar de me elogiar, incentivar, apoiar e ouvir, por me ajudar a descansar e a trabalhar nos momentos certos e por acreditar em mim mais do que eu acredito em mim própria.

À minha Neni e ao meu Johnny por aturarem todas as fases pelas quais eu passei na última década, por todas as spleepovers, por nunca me abandonarem e estarem sempre prontos a dizer o que tem de ser dito, e acima de tudo pelo carinho incondicional.

Obrigado por terem aparecido e muito obrigado por terem ficado.

E quero agradecer a mim própria, pela paciência, resiliência e auto-controlo, e por todos os anos de trabalho que me trouxeram aqui.

Resumo

O mercado do café, um dos mais proeminentes a nível mundial, é um pilar importante na economia de países exportadores como a Colômbia, Vietname e Brasil. Porém, as alterações climáticas têm resultado em graves consequências nos ecossistemas em geral e na produção de café em particular.

O projeto TriCafé tem contribuído para a recuperação da floresta húmida tropical na Serra da Gorongosa (parte do Parque Nacional da Gorongosa) em Moçambique, que viu a sua biodiversidade ameaçada no passado, com impacto sócio-económico nas comunidades vizinhas. A plantação de cafeeiros, num sistema agroflorestal na Serra da Gorongosa, tem sido um dos focos desse projeto.

De forma a contribuir para a avaliação da qualidade do grão produzido nesse sistema agroflorestal, este trabalho centrou-se na extração e caracterização parcial de compostos bioativos, em particular polissacáridos, a partir de grão verde de plantas *Coffea arabica* L., cultivadas a dois níveis de altitude, com sombreamento moderado.

Os extratos obtidos por extração por micro-ondas (MAE) apresentaram, geralmente, conteúdos de biocompostos e atividade antioxidante superiores aos das frações de extração por multi-etapas (MSE). Os resultados evidenciaram redução de proteínas e da maioria dos polissacáridos no grão com o aumento da altitude de cultivo. Adicionalmente, os extratos MAE e FKOH (fração obtida por MSE) não revelaram atividade contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

A partir dos extratos com maior concentração de polissacáridos (MAE e FKOH) foi possível fracionar por cromatografia de exclusão molecular, polissacáridos de Mr >2000 kDa e ca. 40 kDa. Estes últimos apresentaram atividade antioxidante e foram co-eluídos com proteínas, sugerindo existência na forma livre ou complexada.

Os extratos MAE e MSE analisados por HPLC-RI exibiram sacarose, glucose, frutose e arabinose, enquanto a estaquiose e maltotriose foram detetadas apenas em algumas frações MSE. Os extratos hidrolisados revelaram glucose, manose e arabinose, resultados parcialmente confirmados por cromatografia em camada fina.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L., compostos bioativos, cromatografia de exclusão molecular, HPLC-RI, polissacáridos.

Abstract

The coffee market, one of the most prominent in the world, is an important pillar in the economy of exporting countries such as Colombia, Vietnam and Brazil. However, climate change has resulted in serious consequences for ecosystems in general and coffee production in particular.

The TriCafé project has contributed to the recovery of the tropical rainforest in Mount Gorongosa (part of the Gorongosa National Park) in Mozambique, which saw its biodiversity threatened in the past, with a socio-economic impact on neighboring communities. Planting coffee trees, in an agroforestry system in Mount Gorongosa, has been one of the focuses of this project.

To contribute to the evaluation of the quality of the grain produced in this agroforestry system, this work focused on the extraction and partial characterization of bioactive compounds, in particular polysaccharides, from green grain of *Coffea arabica* L. plants, cultivated at two levels high altitude, with moderate shading.

The extracts obtained by microwave extraction (MAE) generally presented higher biocompound content and antioxidant activity than the multi-step extraction (MSE) fractions. The results showed a reduction in proteins and most polysaccharides in the grain with increasing cultivation altitude. Additionally, MAE and FKOH (fraction obtained by MSE) extracts did not reveal activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

From the extracts with the highest concentration of polysaccharides (MAE and FKOH) it was possible to fractionate by molecular exclusion chromatography, polysaccharides with Mr >2000 kDa and *ca.* 40 kDa. The latter showed anti-oxidant activity and were co-eluted with proteins, suggesting their existence in free or complexed form.

The MAE and MSE extracts analyzed by HPLC-RI exhibited sucrose, glucose, fructose and arabinose, while stachyose and maltotriose were detected only in some MSE fractions. The hydrolyzed extracts revealed glucose, mannose, and arabinose, results partially confirmed by thin layer chromatography.

Keywords: *Coffea arabica* L., bioactive compounds, size exclusion chromatography, HPLC-RI, polysaccharides.

Divulgação científica

Os resultados obtidos no presente trabalho foram divulgados nas seguintes comunicações:

- Pimenta, S. R., Barata, P. D., Ramalho, J. C., Ribeiro-Barros, A. I., Martins, S., Semedo, M., *Extração e caracterização de polissacáridos isolados do grão de café verde da Serra da Gorongosa*, 8ª Edição do Fórum de Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 10 a 12 de maio de 2022, Lisboa, Portugal, Comunicação em painel
- Pimenta, S., Shimura, A., Barata, P. D., Semedo, M. C., Martins, S., Leitão A. E., Ramalho, J. C., Ribeiro-Barros, A. I., *Compounds related to the quality of coffee beans from Gorongosa, Mozambique*, Encontro Ciência '22, Centro de Congressos de Lisboa, 16 a 18 de maio de 2022, Lisboa, Portugal, Comunicação em painel
- Pimenta, S., Shimura, A., Barata, P. D., Semedo, M. C., Martins, S., Leitão, A. E., Ramalho, J. C., Ribeiro-Barros, A. I., *Quality assessment of coffee from Gorongosa: polysaccharides and acrylamide analysis*, 5th International Conference on Green Chemistry and Sustainable Engineering (GreenCHEM-22), Università degli Studi Niccolò Cusano, 20 a 22 de julho de 2022, Roma, Itália, Comunicação em painel
- Fernandes, J.M., Pimenta, S., Barata, P.D., Ferreira-Pinto, M., Ribeiro-Barros, A.I., Ramalho, J.C., Semedo, M. C., Martins, S. (2023) *Impact of altitude and shading on bioactivity of green coffee beans from Gorongosa, Mozambique*. 6º Simpósio - Produção e Transformação de Alimentos em Ambiente Sustentável, Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Portalegre, 25 de Maio de 2023, Elvas, Portugal, Comunicação em painel.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract	v
Divulgação científica.....	vii
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xv
Abreviaturas e Siglas.....	xvii
Enquadramento	xix
1. Introdução	3
1.1. Processamento do grão de café	4
1.2. Composição química do grão de café.....	7
1.3. Efeito do consumo do café na saúde humana.....	12
1.3.1. Diabetes.....	12
1.3.2. Doenças tumorais	13
1.3.3. Doença de Parkinson	14
1.3.4. Doença de Alzheimer	15
1.4. Extração, separação e caracterização de compostos bioativos	15
1.4.1. Métodos de extração de compostos bioativos	15
1.4.2. Métodos de doseamento de compostos bioativos.....	17
1.4.3. Métodos de separação e caracterização de compostos bioativos	19
1.4.4. Métodos de análise de atividade antibacteriana	26
2. Materiais e Métodos	31
2.1. Materiais.....	31
2.1.1. Amostras.....	31
2.1.2. Reagentes	31
2.2. Métodos.....	32
2.2.1. Moenda dos grãos verdes de café.....	32
2.2.2. Extração de biomoléculas.....	33
2.2.3. Doseamento de biomoléculas	36
2.2.4. Análise da capacidade antioxidante pelo método do radical ABTS.....	40
2.2.5. Separação e caracterização parcial de biomoléculas	40
2.2.6. Análise da atividade antibacteriana	45
3. Resultados e Discussão	49
3.1. Extração e doseamento de polissacáridos	49
3.2. Extração e doseamento de proteínas	53
3.3. Extração e doseamento de lípidos	54

3.4.	Análise da capacidade antioxidante	56
3.5.	Separação e caracterização parcial da estrutura de biomoléculas	59
3.5.1.	Fracionamento de biomoléculas por cromatografia de exclusão molecular.....	59
3.5.2.	Caracterização parcial de polissacáridos por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	67
3.5.3.	Análise de hidratos de carbono por cromatografia líquida de alta eficiência.....	70
3.5.4.	Análise de hidratos de carbono por cromatografia em camada fina.....	83
3.5.5.	Análise de polissacáridos e proteínas por eletroforese	89
3.6.	Análise da atividade antibacteriana	92
4.	Conclusões e Perspetivas futuras	97
5.	Bibliografia	103

Índice de figuras

Figura 1 - Dados anuais de produção e exportação mundial de café (Adaptado de ICO, 2022)...	3
Figura 2 - Preço médio a nível mundial do café (Adaptado de ICO, 2022).....	4
Figura 3 – Cereja de <i>C. arabica</i> L. (A); Corte transversal do fruto do café (B): 1) exocarpo (pele exterior), 2) mesocarpo (polpa), 3) endocarpo (pergaminho), 4) pele de prata, 5) grão de café (adaptada de Farah et al., 2019).	5
Figura 4 – Resumo esquematizado do tratamento do café desde a seleção da cereja do café até ao armazenamento (adaptada de Subedi et al., 2011)	6
Figura 5 - Estrutura química do ácido 5-O-caffeoilquínico (A) e do ácido 5-O-ferulioilquínico (B) (Adaptado de Farah et al., 2019).....	7
Figura 6 - Estrutura química da trigonelina (A) e da niacina (B).....	8
Figura 7 - Estruturas químicas da quercetina (A), hesperidina (B) e D-catequina (C) (Sigma-Aldrich)	9
Figura 8 - Estrutura química da celulose (A) e de galactomanano (B)	10
Figura 9 - Estrutura de um arabinogalactano	11
Figura 10 - Estrutura química da cafeína (A) e da adenosina (B).....	14
Figura 11 - Representação da separação de moléculas de diferentes tamanhos por cromatografia de exclusão molecular (Adaptado de Yang et al., 2020).....	20
Figura 12 - Esquema de montagem da eletroforese em gel (adaptada de BraMrer et al., 2001) 23	
Figura 13 – Espectros de FTIR obtidos para polissacáridos extraídos de borras de café por dois métodos diferentes (adaptado de Ballesteros et al., 2017)	25
Figura 14 - Espectro RMN para a molécula de aspirina (adaptado de Gundlach et al., 2015) ...	26
Figura 15 - Espectro RMN ¹³ C de extratos de grão verde de <i>Coffea arabica</i> L. da Colômbia (azul) e <i>Coffea canephora</i> da Indonésia (vermelho) (adaptado de Wei et al., 2022)	26
Figura 16 - Resultado do método de difusão em disco (A: sem inibição; B: com inibição; C: com inibição parcial; D com inibição; E: com inibição; F: sem inibição; G: com inibição) (adaptado de Aryal et al., 2022)	27
Figura 17 - Equipamento utilizado para a moenda dos grãos verdes de café (A: moinho; B: agitador de peneiros).....	32
Figura 18 - Procedimento experimental seguido para a extração por multi-etapas.....	33
Figura 19 - Extração por multi-etapas (A: amostra de pó de café; B: amostra com água, já centrifugada; C: fração centrifugada no eppendorf).....	35
Figura 20 - Amostra de café antes e depois da extração assistida por micro-ondas (A: antes da extração; B: imediatamente após; C: 15 minutos após a extração)	36
Figura 21 - Montagem da coluna cromatográfica empacotada com resina Sephacryl S-300 HR, bomba peristáltica e coletor automático de frações.....	41
Figura 22 - Sistema de HPLC (Beckman System Gold) com detetor de índice de refração (Waters Modelo 2414)	43
Figura 23 - Conteúdo em polissacáridos neutros e ácidos nos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38).....	49
Figura 24 - Conteúdo em polissacáridos sulfatados e β-(1,3)-glucanos nos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38).....	50
Figura 25 - Conteúdo em açúcares redutores dos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38)	52
Figura 26 - Conteúdo em proteínas dos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38)	53
Figura 27 - Conteúdo em lípidos dos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38)	55

Figura 28 - Potencial antioxidante dos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38)	56
Figura 29 - Conteúdo em compostos fenólicos e flavonoides dos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38)	57
Figura 30 - Cromatograma do fracionamento do extrato de MAE da amostra G37 em coluna com Sephacryl S-300 HR (análise de polissacáridos neutros, β -(1,3)-glucanos e proteínas)	59
Figura 31 - Cromatograma do fracionamento do extrato de MAE da amostra G37 em coluna com Sephacryl S-300 HR (análise de compostos fenólicos e flavonoides)	60
Figura 32 - Cromatograma do fracionamento do extrato FKOH da amostra G37 em Sephacryl S-300 HR (análise de polissacáridos neutros, β -(1,3)-glucanos e proteínas)	62
Figura 33 - Cromatograma do fracionamento do extrato FKOH da amostra G37 em Sephacryl S-300 HR (análise de compostos flavonoides).....	63
Figura 34 - Cromatograma do fracionamento do extrato de MAE da amostra G10 em Sephacryl S-300 HR (análise de polissacáridos neutros, β -(1,3)-glucanos e proteínas)	65
Figura 35 - Cromatograma do fracionamento do extrato de MAE da amostra G10 em Sephacryl S-300 HR (análise de compostos fenólicos e flavonoides)	65
Figura 36 - Espectro FTIR do extrato MAE da amostra 37 do café da Gorongosa	67
Figura 37 - Espectro FTIR das frações cromatográficas com maior conteúdo em polissacáridos (V_e = 100, 105 e 110 mL) obtidas a partir do extrato MAE da amostra 37 do café da Gorongosa	67
Figura 38 - Espectro FTIR do extrato FKOH da amostra 37 do café da Gorongosa	68
Figura 39 - Espectro FTIR das frações cromatográficas com maior conteúdo em polissacáridos (V_e = 110 e 115 mL) obtidas a partir do extrato FKOH da amostra 37 do café da Gorongosa ...	69
Figura 40 - Cromatograma obtido para o extrato de MAE da amostra G10 (não hidrolisado) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.....	71
Figura 41 - Cromatograma obtido para o extrato de MAE da amostra G10 (hidrolisado com ácido sulfúrico e preparado a 500 mg/mL) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.	72
Figura 42 - Cromatograma obtido para o extrato de MAE da amostra G10 (hidrolisado com TFA) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.	73
Figura 43 - Cromatograma obtido para o extrato de MAE da amostra G37 (não hidrolisado) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.....	74
Figura 44 - Cromatograma obtido para o extrato de MAE da amostra G37 (hidrolisado com ácido sulfúrico, preparado a 500 mg/mL) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.	75
Figura 45 - Cromatograma obtido para o extrato de MAE da amostra G37 (hidrolisado com TFA) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.	76
Figura 46 - Cromatograma obtido para a fração FKOH da amostra G37 (não hidrolisada) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.....	77
Figura 47 - Cromatograma obtido para a fração FKOH da amostra G37 (hidrolisada com TFA, aplicada diretamente) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.	78
Figura 48 - Cromatograma obtido para a fração FW1 da amostra G37 por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.....	79

Figura 49 - Cromatograma obtido para a fração FW2 da amostra G37 por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.	80
Figura 50 - Cromatograma obtido para a fração FHCl da amostra G37 por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.	81
Figura 51 - Cromatograma obtido para a fração FNaOH da amostra G37 por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.	82
Figura 52 - Resultados de C.C.F. (sistema eluente clorofórmio:ácido acético:água) das frações obtidas por extração por multi-etapas da amostra G37, sob incidência de luz a 254 nm (A) e após aplicação da solução reveladora (B) (1: FW2; 2: FHCl; 3: FKOH; 4: FNaOH; 5: MAE G37; 6: MAE G10; 7: MAE G10 repetição)	84
Figura 53 - Resultados de C.C.F. (sistema eluente clorofórmio:ácido acético:água) do extrato de MAE da amostra G10 hidrolisado e não hidrolisado, sob incidência de luz a 254 nm (A) e após aplicação da solução reveladora (B) (1: sacarose; 2: frutose; 3: glucose; 4: MAE G10 não hidrolisado; 5: MAE G10 hidrolisado; 6: manose; 7: galactose; 8: sorbose).....	84
Figura 54 - Resultados de C.C.F. (sistema eluente clorofórmio:ácido acético:água) do extrato de MAE da amostra G37 hidrolisado e não hidrolisado, sob incidência de luz a 254 nm (A) e após aplicação da solução reveladora (B) (1: sacarose; 2: frutose; 3: glucose; 4: MAE G37 não hidrolisado; 5: MAE G37 hidrolisado; 6: manose; 7: galactose; 8: sorbose).....	85
Figura 55 - Resultados de C.C.F. (sistema eluente clorofórmio:ácido acético:água) da fração FKOH obtida por extração por multi-etapas da amostra G37 hidrolisada e não hidrolisada, sob incidência de luz a 254 nm (A) e após aplicação da solução reveladora (B) (1: sacarose; 2: frutose; 3: glucose; 4: FKOH G37 não hidrolisada; 5: FKOH G37 hidrolisada; 6: manose; 7: galactose; 8: sorbose)	86
Figura 56 - Resultados de C.C.F. (sistema eluente clorofórmio:ácido acético:água) das frações FW1 e FW2 obtidas por extração por multi-etapas da amostra G37, sob incidência de luz a 254 nm (A) e após aplicação da solução reveladora (B) (1: sacarose; 2: frutose; 3: glucose; 4: FW1 G37; 5: FW2 G37; 6: manose; 7: galactose; 8: sorbose).....	87
Figura 57 - Resultados C.C.F. (sistema eluente clorofórmio:ácido acético:água) das frações FHCl e FNaOH obtidas por extração por multi-etapas da amostra G37, sob incidência de luz a 254 nm (A) e após aplicação da solução reveladora (B) (1: sacarose; 2: frutose; 3: glucose; 4: FHCl G37; 5: FNaOH G37; 6: manose; 7: galactose; 8: sorbose)	88
Figura 58 - Géis de poliacrilamida (6%) corados com Alcian blue e nitrato de prata (A) e com corante Stains-All (B) (1: FKOH G37; 2: MAE G37; 3: MAE G10; 4: FKOH G37 f.d. 1:2; 5: MAE G37 f.d. 1:2; 6: MAE G10 f.d. 1:2; 7: heparina da mucosa intestinal suína MR≈17 kDa; 8: sal de sódio de sulfato de dextrano MR≈40 kDa; 9: dextrano MR≈70 kDa; 10: dextrano MR≈100 kDa)	89
Figura 59 – SDS-PAGE (17 %) corado com azul de Coomassie (A) (1: Precision Plus Protein (10 µL); 2: extrato MAE amostra G10; 3: extrato MAE amostra G37; 4: FKOH amostra G37; 5: FNaOH amostra G37; 6: FKOH amostra G38; 7: FNaOH amostra G38; 8: Precision Plus Protein (20 µL)). Perfil de bandas do marcador Precision Plus Protein (Bio-Rad) (B)	91
Figura 60 - Análise da atividade antibacteriana do extrato de MAE e da fração FKOH do grão verde de café G37 contra A) <i>S. aureus</i> ; B) <i>E. coli</i> . Nos discos indicados foram aplicados 10 µL de G – gentamicina (100 µg), MAE – extrato MAE da amostra G37, FKOH – extrato FKOH da amostra G37, água destilada e solução de KOH (1M).	92

Índice de tabelas

Tabela 1 - Composição do grão verde de <i>Coffea arabica</i> L. (adaptado de Belitz et al., 2009)	8
Tabela 2 - Conteúdo em hidratos de carbono simples do grão verde de <i>C. arabica</i> L. em hidratos de carbono, de acordo com diferentes estudos (Adaptado de Portillo et al., 2022).	12
Tabela 3 - Resultados das extrações realizadas por Oosterveld et al. (2003) ao grão de café verde.....	16
Tabela 4 - Descrição das amostras analisadas.....	31
Tabela 5 - Preparação das amostras a analisar por HPLC.....	43
Tabela 6 - Preparação das amostras a analisar por C.C.F.	44
Tabela 7 - Resultados dos doseamentos nos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38)	51
Tabela 8 - Rendimentos obtidos por fracionamento do extrato MAE da amostra G37 por cromatografia de exclusão molecular.....	61
Tabela 9 - Rendimentos obtidos por fracionamento do extrato FKOH de café por cromatografia se exclusão molecular.....	64
Tabela 10 - Análise do cromatograma de MAE G10 não hidrolisado, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.....	71
Tabela 11 – Análise do cromatograma de MAE G10, hidrolisado com TFA, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.....	73
Tabela 12 - Análise do cromatograma de MAE G37, não hidrolisado, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.....	74
Tabela 13 – Análise do cromatograma de MAE G37, hidrolisado com TFA, , obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.....	76
Tabela 14 - Análise do cromatograma de FKOH G37, não hidrolisada, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.....	77
Tabela 15 – Análise do cromatograma de FKOH G37, hidrolisada com TFA, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.....	78
Tabela 16 – Análise do cromatograma de FW1 G37, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.	79
Tabela 17 - Análise do cromatograma de FW2 G37, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.	80
Tabela 18 - Análise do cromatograma de FHCl G37, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.	81
Tabela 19 - Análise do cromatograma de FNaOH G37, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.	82

Abreviaturas e Siglas

Abs	Absorvância
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
C.C.F.	Cromatografia em camada fina
CE	Equivalentes de catequina
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FHCl	Fração obtida com HCl no procedimento de extração por multi-etapas
FKOH	Fração obtida com KOH no procedimento de extração por multi-etapas
FNaOH	Fração obtida com NaOH no procedimento de extração por multi-etapas
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
FW1	Fração obtida com água à temperatura ambiente no procedimento de extração por multi-etapas
FW2	Fração obtida com água quente no procedimento de extração por multi-etapas
GAE	Equivalentes de ácido gálico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-RI	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por índice de refração
MAE	Extração assistida por micro-ondas
MSE	Extração por multi-etapas
Mr	Massa molar relativa
MS	Sombreamento moderado
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfatos salino 0,15 mM pH 7,2
PNG	Parque Nacional da Gorongosa
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
SAB	Tampão acetato de sódio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEC	Cromatografia por exclusão molecular
SPV	Sulfo-fosfo-vanilina
TE	Equivalentes de trolox
Tr	Tempo de retenção

Enquadramento

O Parque Nacional da Gorongosa (PNG) situa-se na província de Sofala, área central de Moçambique. Possui uma área de 3770 km² com dois tipos de ecossistemas, savana e floresta tropical montanhosa, tendo sido *habitat* natural de milhares de leões, búfalos, elefantes e muitos outros animais selvagens. Parte da Serra da Gorongosa foi posteriormente integrada no PGN, após sentir o impacto da guerra civil moçambicana, tendo sofrido uma perda significativa de biodiversidade, tanto a nível de fauna como de flora.

Atualmente o PNG representa um dos maiores casos de sucesso de recuperação da vida selvagem em África, devido a uma parceria público-privada estabelecida em 2008 entre o Governo de Moçambique e o Projeto de Restauração da Gorongosa (PRG), uma organização norte americana sem fins lucrativos. Em 2004, o americano Greg Carr, fundador da Fundação Carr, visitou o PNG e em 2008 estabeleceu um compromisso de longo prazo com o governo moçambicano, não só para restaurar a paisagem e a vida selvagem no PNG, como para promover o desenvolvimento humano na serra da Gorongosa e das populações vizinhas, tanto a nível de cuidados de saúde e de ensino, como de crescimento económico.

O projeto de exploração de Café em Sistema Agroflorestal (*Gorongosa National Parks' Coffee Agroforestry under Shade – CAPS*), surgiu assim nesse âmbito. Adicionalmente foi implementado o projecto “Produção Sustentável de Café no Parque Nacional da Gorongosa em Sistema Agroflorestal Integrado no Contexto da Desflorestação, Alterações Climáticas e Segurança Alimentar - Gorongosa Café - Tricafé”, que teve início em 2018, consistindo numa parceria trilateral entre Moçambique (PNG), Portugal (Instituto Superior de Agronomia de Lisboa) e Brasil (Universidade Federal do Espírito Santo), com financiamento do Camões - Instituto da Cooperação e da Língua, I.P. (Portugal) e da Agência de Cooperação Brasileira (Brasil), com o objetivo de melhorar o sistema de produção de café (*ca.* 500 ha) com benefícios socio-económicos e ambientais diretos. Assim, para além de trabalhar no restauro do PNG, o TriCafé ajuda a proporcionar rendimento à população, promovendo a plantação de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) à sombra das árvores autóctones replantadas, trabalho que tem vindo a ser realizado por agricultores locais. O café produzido é vendido em mercados nacionais e internacionais e os lucros revertem para projetos de conservação e para a comunidade do PNG (Camões, I. P., 2020) (Quammen et al., 2019).

Devido à larga extensão do PNG e à capacidade de adaptação da cultura do cafeeiro, esta plantação pode ser feita em diferentes locais, com altitudes e sombreamento variáveis, aproveitando ao máximo o território reabilitável (Quammen *et al.*, 2019). Para uma avaliação das melhores condições de condução da cultura em termos de altitude e nível de sombreamento, foi acompanhado o desenvolvimento de cafeeiros a três altitudes diferentes (650, 825 e 935 m), sob

diferentes níveis de sombreamento (sombreamento denso, sombreamento moderado ou sem sombreamento ou total exposição solar).

De forma a contribuir para a avaliação da qualidade do grão de café da Gorongosa, no presente estudo, foram analisados os extratos de três amostras de grão verde de *Coffea arabica* da colheita de 2021, obtidos por extração por multi-etapas (MSE) e extração assistida por micro-ondas (MAE). Nesses extratos foram determinados os conteúdos de diversas biomoléculas, designadamente açúcares redutores, polissacáridos neutros, ácidos, sulfatados e β -(1,3)-glucanos, compostos fenólicos e flavonóides, lípidos e proteínas. Para além de terem impacto nas características sensoriais da bebida de café, estes compostos apresentam também vários benefícios associados a atividade antioxidante, anticarcinogénica e antimicrobiana.

Os diversos biocompostos presentes nos extratos obtidos a partir das amostras de grão de café verde, foram fracionados por cromatografia de exclusão molecular e posteriormente foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), electroforese, cromatografia de camada fina (C.C.F.) e espectroscopia de infravermelho. Adicionalmente, foram ainda avaliadas as suas capacidades antioxidante e antibacteriana.

1. Introdução

1. Introdução

As bebidas obtidas a partir do grão de café – sejam estas café, galão, *cappuccino* ou outras – estão presentes em inúmeros contextos sociais, sendo estes produtos consumidos a nível mundial.

Uma das grandes vantagens da planta de café é a sua adaptação a diferentes condições climáticas, embora limitada no seu cultivo à região intertropical. Embora a planta de café (*Coffea arabica* L.) se pense ser originária da Etiópia, ela é atualmente cultivada em mais de 80 países, sendo os grandes produtores Brasil, Vietname, Colômbia, Indonésia e Etiópia. (Prandi *et al.*, 2021).

Existem cerca de 130 espécies de plantas de café, pertencentes ao género *Coffea*, sendo a espécie *Coffea arabica* L. a que domina o mercado, representando aproximadamente 60-65% do mesmo (Prandi *et al.*, 2021; Tsegay *et al.*, 2020). O grão de *Coffea arabica* L. permite preparar bebidas de café com propriedades sensoriais, como o aroma e o sabor, considerados mais agradáveis pela maioria dos consumidores

De acordo com a *International Coffee Organization* (ICO) a produção média anual de café tem vindo a aumentar nos últimos anos, embora não linearmente (Figura 1).

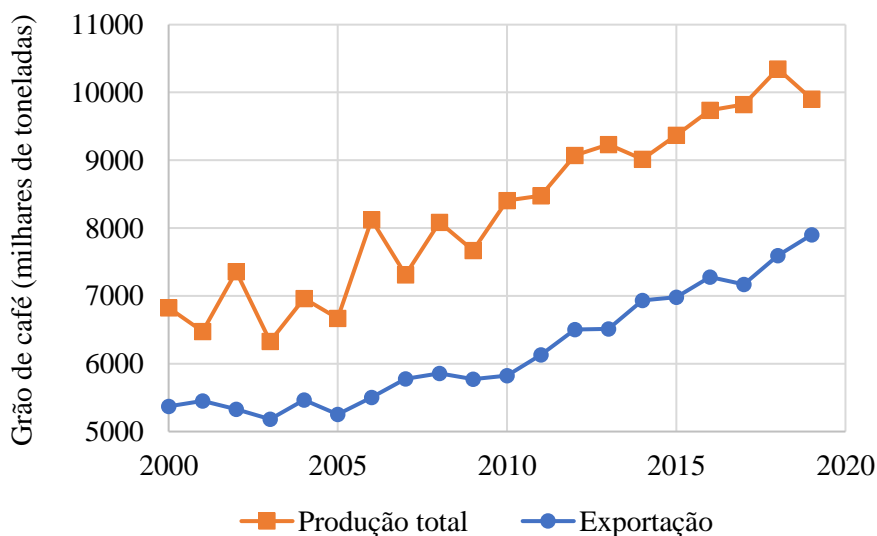


Figura 1 - Dados anuais de produção e exportação mundial de café (Adaptado de ICO, 2022)

Em 2000 foram produzidos 6824 milhares de toneladas de café e exportadas 5373 milhares de toneladas, enquanto em 2019 produziram-se 9903 milhares de toneladas e exportaram-se 7901 milhares de toneladas. O máximo de exportação de café atingiu-se em 2019, enquanto o máximo de produção verificou-se em 2018, com 10347 milhares de toneladas de café produzidos a nível mundial (ICO, 2022).

No que respeita ao preço do café, este diminuiu ao longo de 2022, como demonstram os dados apresentados no gráfico da figura 2, no entanto, o valor desta matéria prima tem aumentado ao longo dos últimos anos.

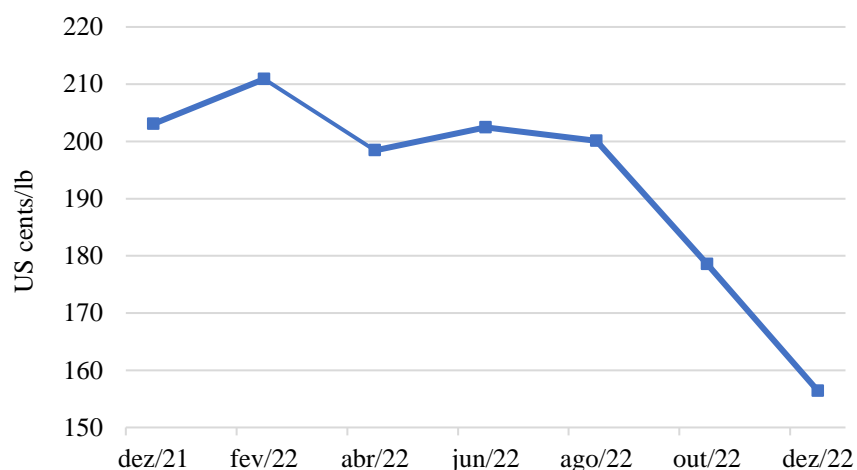


Figura 2 - Preço médio a nível mundial do café (Adaptado de ICO, 2022)

Embora em dezembro de 2021 o preço médio do café fosse 203,1 US cents/lb (aproximadamente 4,21 €/kg), em dezembro de 2022 o preço médio registado foi de 156,4 US cents/lb (aproximadamente 3,24 €/kg), resultado de uma descida gradual desde junho de 2022 (ICO, 2022).

Esta diferença na evolução da produção mundial de café e na evolução do seu preço médio não é vantajosa, uma vez que se traduz em perdas de lucro para os produtores, o que implica uma menor viabilidade na produção de café.

1.1. Processamento do grão de café

A seleção dos grãos de café comercializados é feita assim que estes são colhidos, selecionando, enquanto ainda verdes, os grãos de melhor qualidade, consoante parâmetros previamente estabelecidos pelo fornecedor e de acordo com os padrões de qualidade aplicados (Prandi *et al.*, 2021).

Para compreender melhor o tratamento a que o fruto do cafeeiro é sujeito após colheita, é necessário conhecer a estrutura do mesmo, esquematizada na figura 3.

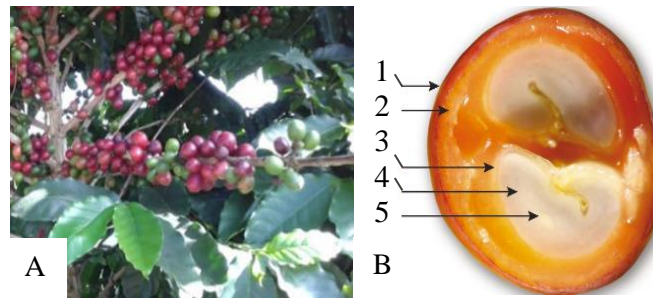


Figura 3 – Cereja de *C. arabica* L. (A); Corte transversal do fruto do café (B): 1) exocarpo (pele exterior), 2) mesocarpo (polpa), 3) endocarpo (pergaminho), 4) pele de prata, 5) grão de café (adaptada de Farah et al., 2019).

O fruto ou cereja do café é processado antes da torra, de forma a isolar o grão de café dos restantes constituintes do fruto e evitar a sua deterioração. O processamento pode ser realizado através dos métodos seco ou húmido, cada um envolvendo diferentes etapas (figura 4). O método seco tem vindo a ser substituído pelo método húmido, que é mais completo e envolve mais etapas de processamento. O método seco inicia-se com a secagem prévia da cereja do café, evitando-se a decomposição da polpa e promovendo-se a libertação do pergaminho do grão de café. Enquanto no método húmido, a polpa é primeiramente removida, a cereja é fermentada, de forma a extrair a camada entre o mesocarpo e o endocarpo, e por fim, o pergaminho é também removido (Figura 4).

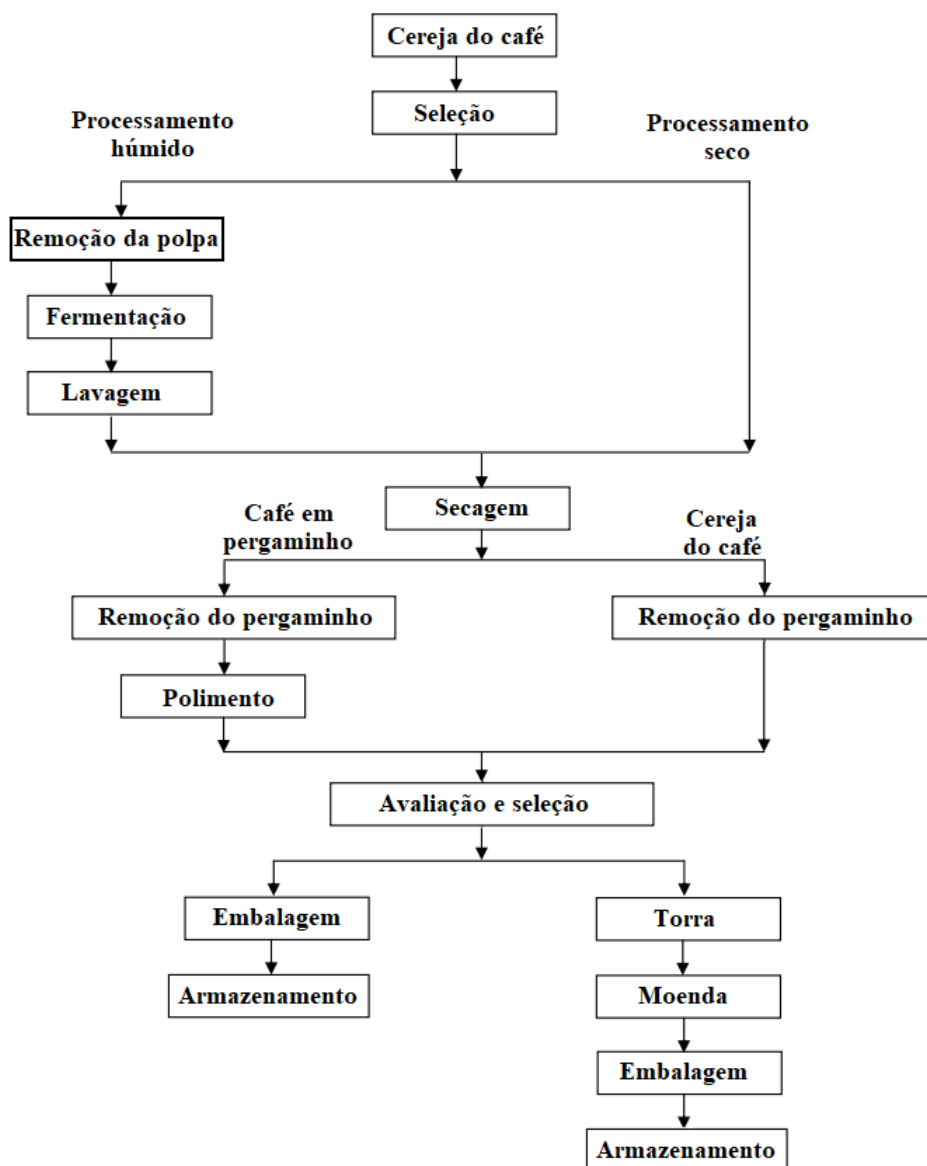


Figura 4 – Resumo esquematizado do tratamento do café desde a seleção da cereja do café até ao armazenamento (adaptada de Subedi et al., 2011)

Existe ainda o método de processamento semi-seco, que envolve a despulpção prévia da cereja do café, secagem do mesmo e descasque posterior do pergaminho.

As propriedades sensoriais do café estão diretamente relacionadas com a composição química do grão verde, dependendo nomeadamente da presença de compostos voláteis e não voláteis. A presença e concentração destes constituintes variam consoante as condições de cultura da planta (como altitude/temperatura, disponibilidade hídrica, sombreamento, tipo de solo, período de colheita) e o processamento pós-colheita a que os frutos são sujeitos (Tsegay et al., 2020). Para além destas variáveis, diversos os constituintes do café, que contribuem para o seu aroma final, são obtidos através da sua torrefação, sendo sujeitos a processos de pirólise e de

degradação, e à reação de Maillard (Sualeh *et al.*, 2020). De facto, a torra dos grãos verdes desencadeia alterações a nível químico e físico nos grãos, apurando o seu aroma e sabor. Este processo pode ser feito através do método convencional, leitos fluidizados ou torra rápida. No método convencional, o café é colocado em tambores e torrado através de movimentos circulares do tambor – este é o método mais simples e fácil de realizar, mas também o que demora mais tempo. O método dos leitos fluidizados baseia-se no método convencional, mas é ainda aplicada uma corrente ascendente de ar quente a atravessar os grãos de café, mantendo-os em movimento e torrando-os – este método permite homogeneizar a temperatura a que os grãos são torrados, diminuindo ou eliminando zonas mais frias, onde o café seria menos torrado. O processo de torra rápida é semelhante ao de leitos fluidizados, mas a corrente de ar quente é aumentada, concluindo a torra em menos de quatro minutos – este método é o mais rápido, no entanto, também é o que requer mais energia (Catelani *et al.*, 2017).

1.2. Composição química do grão de café

A cafeína é o constituinte mais conhecido do café, e, enquanto substância precursora de aroma, é responsável pelo sabor amargo do mesmo. Para além da cafeína, os ácidos clorogénicos – como ácidos cafeoilquínicos e ácidos feruloilquínicos (Figura 5) – e a trigonelina são também precursores de aroma (Farah *et al.*, 2019; Sualeh *et al.*, 2020). Tanto a cafeína como a trigonelina são alcalóides com grupos N-metil, presentes nos grãos verdes de café, em concentrações semelhantes (Tabela 1).

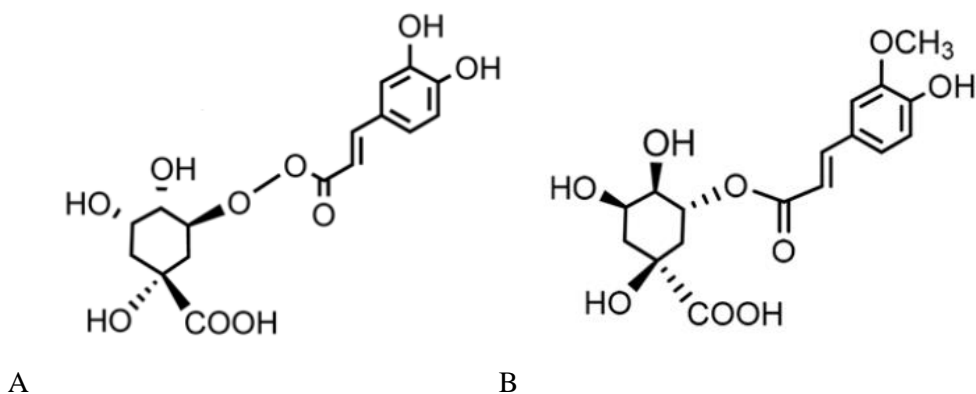


Figura 5 - Estrutura química do ácido 5-O-cafeoilquínico (A) e do ácido 5-O-feruloilquínico (B)
(Adaptado de Farah *et al.*, 2019)

Tabela 1 - Composição do grão verde de *Coffea arabica* L. (adaptado de Belitz et al., 2009)

Constituinte	Concentração (% m/m)
Hidratos de carbono solúveis	9-12,5
Monossacáridos	0,2-0,5
Oligossacáridos	6-9
Polissacáridos	3-4
Polissacáridos insolúveis	46-53
Hemicelulose	5-10
Celulose	41-43
Ácidos voláteis	0,1
Ácidos alifáticos não voláteis	2-2,9
Ácidos clorogénicos	6,7-9,2
Lenhina	1-3
Lípidos	15-18
Cera	0,2-0,3
Óleo	7,7-17,7
Compostos azotados	11-15
Aminoácidos livres	0,2-0,8
Proteínas	8,5-12
Cafeína	0,8-1,4
Trigonelina	0,6-1,2
Minerais	3-5,4

A trigonelina origina diferentes compostos voláteis durante a torra do grão, devido às temperaturas a que o café é sujeito (200-240 °C) (Preedy *et al.*, 2015). Entre estes compostos, está a niacina – vitamina B3 – que participa no metabolismo celular, sendo essencial para converter proteínas, hidratos de carbono e lípidos em energia (Farah *et al.*, 2019).

Na figura 6 encontram-se representadas as estruturas destes compostos.

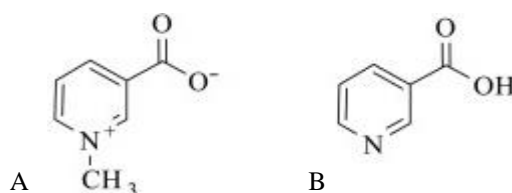


Figura 6 - Estrutura química da trigonelina (A) e da niacina (B)

A trigonelina tem também propriedades anticarcinogénicas e antimicrobianas, impedindo, por exemplo, a adesão e crescimento da bactéria *Streptococcus mutans*, que é responsável por cáries dentárias (Preedy *et al.*, 2015). Devido às suas propriedades e pelo facto

de a trigonelina ser convertida noutros produtos às temperaturas elevadas do processo de torra, já é comercializado café torrado a temperaturas inferiores, e, portanto, rico em trigonelina (Preedy *et al.*, 2015).

Os compostos fenólicos presentes no grão de café, para além de propriedades antioxidantes, exibem outras atividades biológicas, tais como anti-inflamatórias, anticarcinogénicas, antitrombóticas e antimicrobianas. Os compostos polifenólicos contribuem também, por exemplo, para a prevenção do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, obesidade e hiperglicemia. No café, os compostos fenólicos encontram-se não só no grão, como também na pele de prata e nas borras de café – obtidas após a preparação da bebida do café. Os flavonoides e os ácidos clorogénicos são exemplos destes compostos, sendo os últimos produzidos a partir da fenilalanina, e responsáveis pela cor do café e acidez da bebida, podendo mesmo resultar em sabores desagradáveis consequentes da torra do grão (Sualeh *et al.*, 2020; Tajik *et al.*, 2017). No que respeita aos flavonoides, como a quercetina, a hesperidina e as catequinas (Figura 7), estes estão associados ao crescimento, diferenciação e apoptose celular, bem como à prevenção de doenças cardiovasculares, de Alzheimer e de Parkinson. Estes compostos têm ainda capacidades imunomoduladoras, de inibição enzimática e antitumorais, afetando vários processos, tais como a angiogénese (Grotewold *et al.*, 2006).

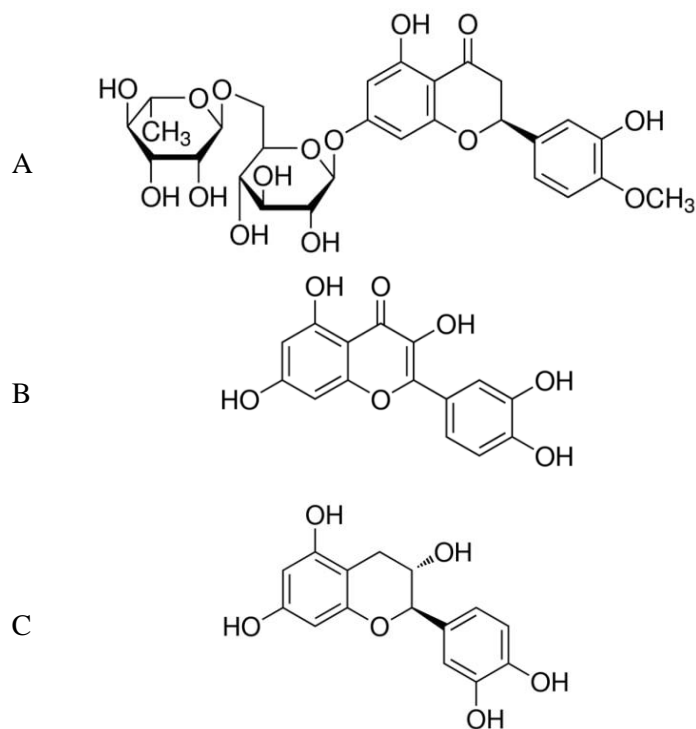


Figura 7 - Estruturas químicas da quercetina (A), hesperidina (B) e D-catequina (C) (Sigma-Aldrich)

Por sua vez, o óleo do café é constituído maioritariamente por lípidos sob a forma de ácidos gordos, como os ácidos linoleico e palmítico. Vários estudos indicam que o óleo do café apresenta capacidade de absorção de radiação UV-B, sendo que os ácidos gordos mencionados demonstram propriedades emolientes e o seu défice está associado a doenças de pele como dermatite e eczema (Tsegay *et al.*, 2020). Após a extração do óleo, é possível recuperar compostos com atividade biológica, como compostos polifenólicos (Prandi *et al.*, 2021). Este óleo é maioritariamente utilizado na indústria dos cosméticos, tendo também potencial aplicação como material de partida para produção de biodiesel (Preedy *et al.*, 2015).

Os polissacáridos insolúveis como a celulose, a hemicelulose e os galactomananos representam cerca de 50% da constituição dos grãos verdes de *Coffea arabica* L. (Redgwell *et al.*, 2006). Apesar de insolúveis, o processo de torra do grão favorece a sua despolimerização, facilitando a extração e solubilização em solventes como a água. Tanto a celulose como os galactomananos (Figura 8) são polissacáridos responsáveis pelas propriedades finais da bebida de café, como a textura, viscosidade e estabilidade da espuma formada. Estes são os polímeros que apresentam maior resistência à solubilização, sendo a sua concentração e conformação dois fatores que fortemente influenciam a sua solubilidade final na bebida (Redgwell *et al.*, 2006). Estes compostos também foram detetados nas borras de café, e, após extração, apresentaram capacidade antimicrobiana, antioxidante e imunomoduladora (Ballesteros *et al.*, 2017).

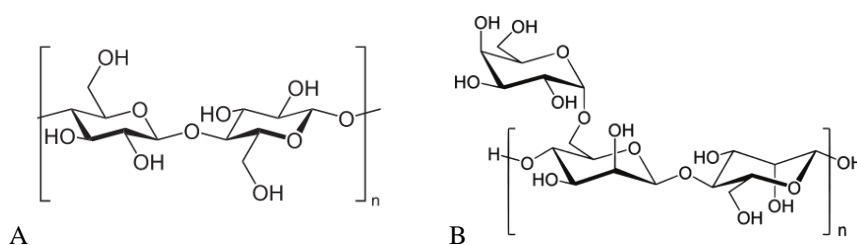


Figura 8 - Estrutura química da celulose (A) e de galactomanano (B)

Os arabinogalactanos (Figura 9) são outros polissacáridos que afetam as propriedades da bebida de café, estando muitas vezes fortemente ligados a proteínas, associação esta que resiste até às condições de torra do grão (Ballesteros *et al.*, 2017). Estes polissacáridos são constituídos por resíduos de sacarose e galactose.

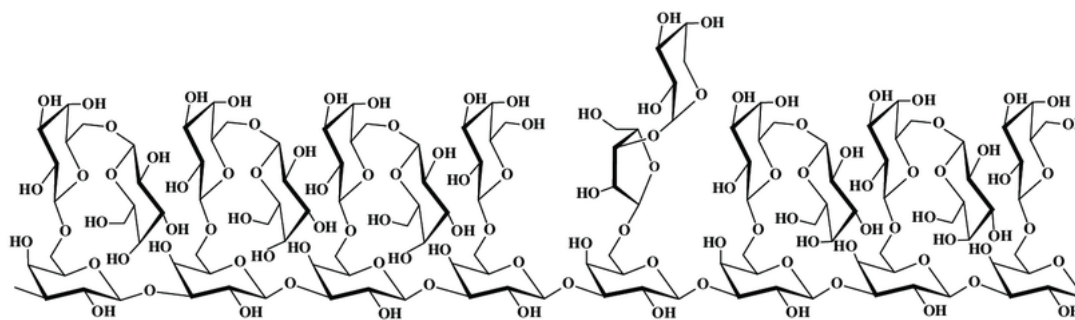


Figura 9 - Estrutura de um arabinogalactano

Para além das atividades biológicas já mencionadas, os polissacáridos presentes no café ajudam também a prevenir doenças cardíacas, associadas ao consumo de alimentos com elevado teor de lípidos, uma vez que são fibras dietéticas solúveis com efeitos benéficos nos níveis de colesterol no sangue e na resposta glicémica (Preedy *et al.*, 2015).

Embora os polissacáridos possam ter origem em diferentes componentes das células, um grupo presente maioritariamente na parede celular, muito importante, devido às suas propriedades biológicas, é constituído pelos glucanos. Estas moléculas podem ser classificadas em α -glucanos e β -(1,3)-glucanos, conforme a conformação dos seus resíduos osídicos e o padrão das suas ligações (Nie *et al.*, 2018). Os mais abundantes na natureza são os β -(1,3)-glucanos, que são moléculas lineares com resíduos de β -glucose. Estes compostos podem existir com conformação de hélice simples, hélice tripla ou enrolamento ao acaso (*random coil*). No presente trabalho, por estarem associados a atividades imunomoduladoras e antitumorais (Semedo *et al.*, 2015), um dos alvos de estudo são os β -(1,3)-glucanos de hélice tripla. Estas moléculas estáveis a pH neutro e temperatura ambiente, podem sofrer uma alteração da conformação mantida por ligações por pontes de hidrogénio, para hélice simples ou *random coil*, quando sujeitas a variações de temperatura ou de pH (Nie *et al.*, 2018). Os β -(1,3)-glucanos têm atividade biológica comprovada, nomeadamente propriedades anticancerígenas, antihiperlipidémicas, antioxidantes, antimicrobianas, antivirais e imunoestimulatórias (Nakashima *et al.*, 2018; Nie *et al.*, 2018). Os estudos realizados por Fernandes (2021) revelaram a presença destes compostos em extratos obtidos a partir de grão verde de *C. arabica* L. produzido na Serra da Gorongosa, embora em baixas concentrações (inferiores a 3 mg/g).

Outro grupo de polissacáridos que tem sido investigado em produtos naturais são os polissacáridos sulfatados, conhecidos pelas suas propriedades antiinflamatórias. Estes compostos já foram identificados em várias plantas marinhas, microalgas e peixes, no entanto, desconhece-se qualquer estudo que os relacione com o grão de café (Muthukumar *et al.*, 2021).

O conteúdo de açúcares simples no café varia consoante a fase de desenvolvimento do fruto. Por exemplo, na fase inicial de desenvolvimento, os açúcares redutores, como a frutose são

dos mais abundantes, mas a sua concentração vai diminuindo ao longo da maturação do fruto. A manose, a galactose, a glucose e a sacarose são os açúcares principais que se encontram na constituição do café verde (Tabela 2).

Tabela 2 - Conteúdo em hidratos de carbono simples do grão verde de *C. arabica* L. em hidratos de carbono, de acordo com diferentes estudos (Adaptado de Portillo *et al.*, 2022).

	Conteúdo em hidratos de carbono simples do grão verde de <i>C. arabica</i> L. em hidratos de carbono (% (m/m))		
	Oestreich-Janzen (2010)	Farah (2012)	Poisson (2017)
Frutose	0,09	ND	ND
Glucose	9,35	ND	ND
Galactose	10,37	ND	ND
Manose	19,85	ND	10,00 – 20,00
Arabinose	3,92	ND	ND
Sacarose	3,63	6,00 – 9,00	ND

ND – Não determinado

Para além dos compostos já mencionados, o grão de café contém ainda proteínas e aminoácidos livres. O desenvolvimento do aroma do café, bem como o seu escurecimento estão associados às reações de Maillard, que ocorrem entre os grupos amino de aminoácidos e os açúcares redutores, originando, entre outros, melanoidinas, que são compostos nitrogenados acastanhados (Preedy *et al.*, 2015).

Face à complexidade química do café, o seu consumo está associado a efeitos na saúde humana, destacando-se a seguir alguns desses efeitos.

1.3. Efeito do consumo do café na saúde humana

Após conhecimento dos compostos que fazem parte do café e das propriedades biológicas apresentadas por alguns desses compostos, é possível assumir que existem relações estabelecidas entre o consumo de café e a prevenção do desenvolvimento de algumas doenças ou terapias associadas às mesmas.

1.3.1. Diabetes

A diabetes é uma doença relacionada com a falta ou incapacidade de produzir insulina, que pode ter diferentes níveis de gravidade. Esta pode ser causada por uma disfunção a nível da hipófise, a nível do pâncreas ou por sobrecarga hormonal.

Vários trabalhos sobre o efeito do consumo de café associado a diabetes associados com a disfunção pancreática apontam para uma redução de 30 a 60% do risco de desenvolver a doença em indivíduos que consomem maiores quantidades de café – até 7 doses por dia (Ludwig *et al.*, 2014; Preedy *et al.*, 2015). No entanto, existem também alguns estudos que detetaram uma correlação entre esse consumo e o aumento da concentração de marcadores específicos para esta doença, bem como ensaios que não verificaram qualquer impacto, positivo ou negativo, na redução do risco de desenvolver a diabetes (Ludwig *et al.*, 2014).

1.3.2. Doenças tumorais

Quando existe um crescimento descontrolado de células, verifica-se a formação de um tumor, que pode ser benigno – se não puser em risco a vida do paciente, for removível, recessivo e não se espalhar pelo organismo – ou maligno – se for perigoso para o paciente, difícil de remover ou de fazer regredir, e se se difundir por diferentes tecidos (LPCC, 2022).

No caso dos carcinomas do endométrio e hepatocelular, vários estudos concluíram haver um impacto positivo do consumo de café na redução do risco de contrair a doença, confirmando um risco 20 a 70 % menor e uma relação linear entre a diminuição do risco e um maior consumo diário de café (Ludwig *et al.*, 2014). Para o cancro do fígado, verificou-se uma diminuição de 25% do risco do seu aparecimento, apesar de ser necessário considerar o possível impacto negativo do consumo de café no fígado em si, sendo este consumo desaconselhado a pessoas que tenham este órgão fragilizado (Ludwig *et al.*, 2014).

Existem ainda estudos que apontam um impacto neutro ou negativo do consumo de café no desenvolvimento de cancro colorretal e cancro da mama. Porém, quando se estudou este impacto em mulheres portadoras de uma mutação no gene BRCA – que inerentemente têm uma probabilidade até 80% de terem cancro da mama aos 70 anos – notou-se uma redução de 70% nesse risco (Ludwig *et al.*, 2014). O risco associado ao sexo feminino é ainda influenciado por outra variável importante: o consumo de hormonas pós-menstruais, como o estrogénio. Em mulheres que não usem estas hormonas, notou-se de facto uma redução do risco de desenvolvimento de cancro, no entanto, em mulheres que as usam, verifica-se um aumento dessa propensão (Ludwig *et al.*, 2014). Este efeito não se verificou no caso do consumo de café descafeinado, podendo esta consequência protetora ser atribuída à ação da cafeína (Ludwig *et al.*, 2014).

O consumo de café foi também associado a uma diminuição do risco de desenvolver cancro da pele, consequência esta atribuída à presença de cafeína e ácidos clorogénicos, que protegem a pele da radiação UV-B emitida pelo sol (Preedy *et al.*, 2015).

1.3.3. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson é uma doença degenerativa, causada pela morte das células responsáveis pela produção de dopamina, que é um neurotransmissor e sem o qual os terminais nervosos ficam inoperacionais (Gonzalez-Usigli *et al.*, 2022).

Concluiu-se em vários estudos, que consumidores de café exibem uma diminuição de 31% do risco de desenvolver a doença de Parkinson, comparativamente com os não consumidores (Lugwid *et al.*, 2014; Preedy *et al.*, 2015). Adicionalmente, um dos trabalhos evidenciou uma diminuição mais acentuada deste risco com o aumento do consumo de café, em homens, o que não se confirmou para as mulheres (Ludwig *et al.*, 2014). Tal como no caso do cancro, foi sugerido um efeito do consumo de hormonas pós-menstruais no desenvolvimento desta doença, sendo que, mulheres que as consomem e bebem café estão sujeitas a um risco aumentado (Ludwig *et al.*, 2014; Preedy *et al.*, 2015).

Estas relações ainda não foram comprovadas, no entanto, o efeito protetor do café é possivelmente atribuído à capacidade de a cafeína favorecer a libertação de dopamina, através do bloqueio por competição dos recetores de adenosina A₂, uma vez que apresentam estruturas semelhantes entre si, tal como se pode observar na figura 10.

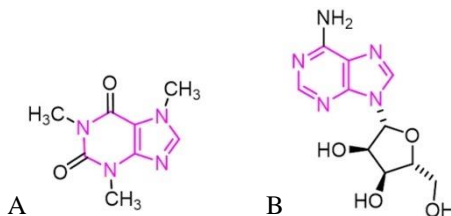


Figura 10 - Estrutura química da cafeína (A) e da adenosina (B)

Este bloqueio conduz à libertação de dopamina, pois a adenosina é antagonista da transmissão mediada de dopamina (Ludwig *et al.*, 2014).

Quanto ao efeito mencionado das hormonas pós-menstruais, como o estrogénio, este pode estar relacionado com o facto de inibirem o metabolismo da cafeína (Ludwig *et al.*, 2014).

1.3.4. Doença de Alzheimer

Tal como a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer é degenerativa e progressiva. Neste caso, verifica-se uma acumulação de proteínas β -amilóides no cérebro, resultando em demência (Preedy *et al.*, 2015). Esta doença está fortemente associada a fatores genéticos, mas outras variáveis como o estado de saúde e o estilo de vida também influenciam a suscetibilidade em desenvolver Alzheimer (Preedy *et al.*, 2014).

Estudos publicados indicam que o consumo de café está associado a uma diminuição de 65% do risco de desenvolver Alzheimer. É possível que esta diminuição esteja relacionada com a existência no café de várias substâncias bioativas, como compostos antioxidantes, polifenóis e vitaminas, sendo também a capacidade protetora da cafeína outro fator a considerar (Preedy *et al.*, 2014).

1.4. Extração, separação e caracterização de compostos bioativos

1.4.1. Métodos de extração de compostos bioativos

A extração de compostos, a partir de produtos naturais, é feita através de diversos métodos, consoante fatores como a afinidade desses compostos para diferentes solventes, sensibilidade a fatores externos (como temperatura), e tempo de extração necessário (Redgwell *et al.*, 2006).

Até à data, já foram desenvolvidos vários métodos de extração, baseados em forças mecânicas, ultrassons, radiação de micro-ondas, entre outros. No caso de compostos bioativos de plantas, a sua extração implica geralmente um pré-tratamento, como secagem e moenda (Chuo *et al.*, 2022).

A extração sólido-líquido por multi-etapas (MSE), é um método simples, que não depende de equipamentos ou tecnologia avançada e que tem sido empregue na obtenção de compostos a partir de cogumelos, microalgas e grãos de café. Esta técnica implica o uso sucessivo de diferentes solventes, em diversas condições de temperatura e pH, visando a solubilização e posterior isolamento de vários tipos de moléculas, consoante a sua afinidade para com o solvente utilizado (Fernandes, 2021; Semedo *et al.*, 2015).

Já a extração assistida por micro-ondas (MAE) é um método que requer o uso de menores volumes de solvente, consome menos tempo, tem uma maior reprodutibilidade e permite obter melhores rendimentos, não só relativamente a métodos convencionais (por exemplo, MSE), bem

como a outros métodos avançados, como o de extração assistida por ultrassons (Chuo *et al.*, 2022). A MAE pode ser realizada em equipamentos fechados, o que permite atingir pressões e temperaturas elevadas em pouco tempo e sem perda substancial de solvente. A temperatura aplicada possibilita a destruição da parede celular das células, facilitando a extração dos produtos intracelulares para o solvente. Fatores como o solvente utilizado, a razão solvente:amostra, temperatura, pressão e tempo de extração influenciam os rendimentos obtidos por este método (Chuo *et al.*, 2022) (Lopes *et al.*, 2020).

Oosterveld *et al.* (2003) extraíram polissacáridos e proteínas dos grãos de café verdes e torrados, com água a 90 e 170 °C, EDTA 0,05 M e NaOH (0,05; 1 e 4 M). Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados das extrações realizadas por Oosterveld et al. (2003) ao grão de café verde

	Água (90 °C)	Água (170 °C)	EDTA	NaOH (0,05 M)	NaOH (1 M)	NaOH (4 M)	Resíduo
Proteína (% m/m)	59	29	39	25	41	24	4
Polissacáridos neutros (% m/m)	34	65	39	30	52	45	79
Rendimento (% m/m)	4,5	7,9	1,7	2,2	0,9	0,6	46,3

Os rendimentos apresentados foram calculados para a extração de polissacáridos, verificando-se que os polissacáridos presentes nos grãos de café são difíceis de extrair, possivelmente devido à densidade da parede celular. Em relação aos açúcares simples, a arabinose e a galactose foram os mais fáceis de extrair com todos os solventes utilizados, enquanto a xilose, a manose e a glucose foram extraídas com maior sucesso quando usaram NaOH (4 M), embora água a 90 °C também tenha possibilitado uma boa recuperação da manose. Por último, obtiveram rendimentos melhores e semelhantes na extração da ramnose quando utilizaram água a 90 °C, EDTA e NaOH (0,5 M) (Oosterveld *et al.*, 2003).

Lopes *et al.* (2020) realizaram extrações de polissacáridos, como arabinose, ramnose, glucose, xilose e outros, de café torrado, por MAE, tendo testado diferentes condições, e concluíram que as condições de temperatura de 180 °C e rácio de 1:4 (café:água), durante 10 minutos, após hidrólise ácida, foram as que permitiram obter melhores rendimentos. Dosearam maioritariamente galactose (58,6 % mol), manose (26,3 % mol) e arabinose (12,1 % mol), e ainda glucose e ramnose. Embora nestas condições tenham verificado os melhores rendimentos para açúcares totais e para galactose, não foram as que permitiram obter maior conteúdo de todos os hidratos de carbono. Uma concentração mais elevada de manose (57,0 % mol) foi extraída a

150 °C, num rácio de 1:2, durante 1 minuto e para a arabinose, as condições de 120 °C, num rácio de 1:6, durante 5,5 minutos permitiram obter 18,6 % mol, condições estas que também conduziram a uma melhor extração da glucose e da ramnose (Lopes *et al.*, 2020).

1.4.2. Métodos de doseamento de compostos bioativos

Após a extração dos compostos presentes nas amostras a analisar, é realizada a sua quantificação. Para tal, recorre-se várias vezes a métodos colorimétricos, nos quais é medida a transmitância ou absorvância de radiação a diferentes comprimentos de onda, após utilização de reagentes específicos, avaliando-se assim a presença de diferentes compostos e sua concentração na amostra. Os procedimentos são geralmente simples, rápidos e não requerem quantidades elevadas de amostra nem de reagente.

Para a deteção de polissacáridos neutros, o método do fenol-sulfúrico é o mais utilizado. O ácido sulfúrico concentrado decompõe polissacáridos (bem como oligo-, di- e monossacáridos) e desidrata-os, formando furfural, que reage com o fenol originando complexos com tom amarelado, que absorvem radiação no comprimento de onda de 490 nm (Jain *et al.*, 2017).

Muitos polissacáridos, como as hemiceluloses apresentam grupos de ácido urónico ou glucorónico, que podem ser responsáveis por mudanças nas propriedades físicas e químicas das moléculas. Como tal, a deteção destes polissacáridos ácidos é importante na caracterização dos mesmos. Esta deteção é feita através do método carbazol-ácido sulfúrico, que tem por base uma reação específica do carbazol com esses grupos acídicos, na presença de água. Como resultado, a mistura reacional adquire um tom cor-de-rosa, absorvendo radiação a um comprimento de onda de 550 nm (Cesaretti *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2007).

No caso de polissacáridos β -D-(1,3)-glucanos de tripla hélice, recorre-se ao método do corante Congo red, que é um corante azo que se liga especificamente a estes polissacáridos, através de interações electrostáticas, hidrofóbicas ou ligações por pontes de hidrogénio. A interação entre o corante e o β -D-(1,3)-glucano é detetada por desvio de absorção da gama de 486-488 nm para 516-520nm (Semedo *et al.*, 2015; Ogawa *et al.*, 1972).

O azul de toluidina é um corante metacromático acidófilo e, como tal, tem a capacidade de corar seletivamente tecidos ácidos, com grupos sulfatos, carboxilatos e radicais fosfato, com cor diferente da que apresenta na sua forma livre em solução aquosa. Como tal, é bastante útil na deteção e quantificação de polissacáridos sulfatados. Este corante pode existir sob a forma polimérica – sendo designado por metacromático, com um máximo de absorção entre 480 e 540 nm, originando uma cor vermelha; ou monomérica – sendo designado por ortocromático, com um

máximo de absorção a 630 nm, resultando numa cor azul. Para ocorrer a forma polimérica, é necessária a presença de moléculas de água entre as moléculas de corante (Figueiredo *et al.*, 2007; Sridharan *et al.*, 2012).

É também possível dosear açúcares redutores através de métodos colorimétricos. Quando em contacto com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), os açúcares redutores presentes na amostra reagem com este ácido, formando o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que tem propriedades aromáticas e absorve luz a um número de onda de 540 nm, ou seja, quanto maior a quantidade de açúcares redutores, mais ácido 3-amino-5-nitrosalicílico se formará, e mais luz será absorvida, permitindo através de curvas de calibração, determinar a concentração de açúcares redutores na amostra em análise (Gonçalves *et al.*, 2010).

A quantificação de compostos fenólicos é frequentemente realizada com o reagente Folin-Ciocalteu, que consiste numa mistura de molibdato de sódio e de tungstato de sódio, que são reduzidos pelos anéis hidroxilados dos compostos fenólicos, originando uma cor azulada. Apesar do máximo de absorção variar com a concentração dos compostos fenólicos e com o pH da solução, a deteção é geralmente realizada a 750 nm (Blainski *et al.*, 2013; Vázquez *et al.*, 2015).

Os compostos fenólicos podem ser flavonoides ou não-flavonoides e possuem diversas propriedades biológicas, tais como antioxidantes e anti-inflamatórias. Os primeiros são doseados através do método do cloreto de alumínio, que forma complexos ácidos com os anéis aromáticos dos flavonoides, sendo necessário ajustar o pH da mistura reacional com soluções alcalinas ou usar soluções tampão. Podem ser utilizados vários compostos de referência, sendo um dos mais utilizados a catequina. O máximo de absorvância dos complexos ácidos na mistura reacional corresponde a 510 nm (Cesaretti *et al.*, 2003).

Um dos métodos amplamente utilizados para avaliar a capacidade antioxidante total de uma amostra, é o do radical livre ABTS – ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). Em solução, o ABTS é um composto incolor, que, quando oxidado a ABTS⁺ adquire uma tonalidade azul, com alteração da sua absorvância máxima para 655 nm. O princípio aplicado neste método tem por base esta forma oxidada, que na presença de compostos que possam por sua vez ser oxidados, oxida-os, retornando à sua forma reduzida e incolor (Erel *et al.*, 2004). Para além do método do radical livre ABTS, podem ser empregues outros métodos que permitem avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra, tais como o método da capacidade quelante do ião Fe³⁺ e o método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).

No caso do doseamento de proteínas, é utilizado o método de ligação do corante azul brilhante de Coomassie ou de Bradford. Na presença de proteínas, o corante na forma G liga-se aos aminoácidos constituintes, através de interações hidrofóbicas e heteropolares e o complexo

formado entre o corante e as proteínas é detetado a 595 nm (Figueiredo *et al.*, 2007; Georgiou *et al.*, 2008; Lowry *et al.*, 1951).

Para dosear lípidos recorre-se ao método do reagente sulfo-fosfo-vanilina (SPV). Inicialmente, é necessário adicionar ácido sulfúrico concentrado à amostra em estudo, para que este reaja com os lípidos presentes, formando carbocatiões cromogénicos. Os produtos desta primeira reação reagem depois com a vanilina, na presença de ácido fosfórico, originando compostos de tom rosado. Como os produtos da primeira reação são difíceis de estabilizar, a duração do ensaio é prolongada (aproximadamente 1 hora) (Anschau *et al.*, 2017).

1.4.3. Métodos de separação e caracterização de compostos bioativos

1.4.3.1. Técnicas cromatográficas

Uma das técnicas mais usadas para separação de compostos é a cromatografia, permitindo a separação gradual de moléculas presentes numa mistura líquida ou gasosa – fase móvel – à medida que esta flui ao longo de um suporte imóvel, como um sólido, resina, ou gel – fase estacionária. A cromatografia pode ser realizada numa coluna – com fase móvel gasosa ou líquida – ou numa superfície plana (cromatografia planar) – com fase móvel líquida.

Os trabalhos publicados de Fischer *et al.* (2001) e de Passos *et al.* (2014) reportam o fracionamento de polissacáridos presentes em extratos de grão de café por cromatografia de exclusão molecular (SEC), ou seja, tendo por base diferenças de tamanho das moléculas. Neste tipo de cromatografia, a fase estacionária é constituída por uma resina com uma dimensão de poro específica e que é selecionada em função do tamanho estimado das moléculas a separar. Assim, à medida que a fase móvel atravessa a coluna com um caudal constante, as moléculas presentes na amostra inicialmente aplicada no topo da coluna, vão passando pelos poros da fase estacionária (Figura 11). Caso sejam moléculas de dimensão superior ao tamanho dos poros, não penetram nestes, e passam mais rapidamente pela coluna, mas se forem moléculas menores, vão entrando e saindo dos poros, sendo o seu percurso retardado, pelo que é necessário maior volume de fase móvel para as eluir (Kostanski *et al.*, 2004).

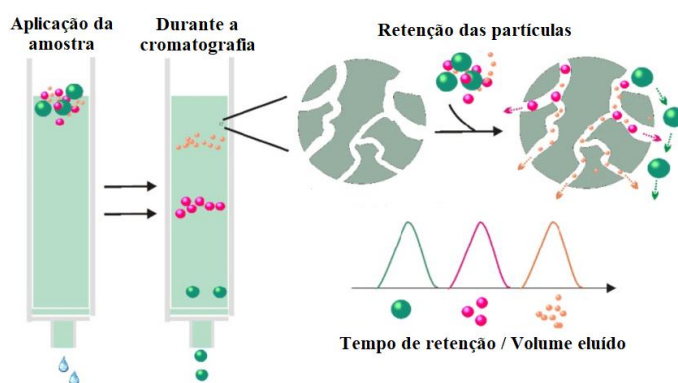


Figura 11 - Representação da separação de moléculas de diferentes tamanhos por cromatografia de exclusão molecular (Adaptado de Yang *et al.*, 2020)

No estudo de Oosterveld *et al.* (2003), o extrato obtido a partir de grãos verdes de *C. arabica*, utilizando água a 90 °C, foi analisado por cromatografia de exclusão molecular, numa coluna empacotada com resina *Sephacryl S500* e a composição em açúcares neutros nas frações recolhidas foi avaliada por cromatografia gasosa com espectroscopia de massa (GC-MS) após hidrólise com ácido sulfúrico. Através destes procedimentos, foi possível separar e caracterizar algumas moléculas de diferentes tamanhos, tais como polissacáridos galactomananos e arabinogalactanos. Fischer *et al.* (2001) isolaram polissacáridos de grãos verdes de *C. arabica* através de extrações sucessivas com água, hidróxido de potássio e clorito de sódio, e os extratos foram fracionados por SEC, numa coluna empacotada com resina *Sephacryl S300*. O conteúdo em polissacáridos foi determinado pelo método do fenol-sulfúrico e a sua composição em monossacáridos por GC-MS. Estes investigadores concluíram que os polissacáridos isolados de *C. arabica* variedade *Caturra* eram constituídos maioritariamente por manose (46,7 % mol), galactose (24,5 % mol), glucose (16,7 % mol) e arabinose (10,6 % mol) e que esses polissacáridos foram mais difíceis de extrair do que os de *C. canephora* variedade *ROM*. A dificuldade de solubilização indicou uma associação forte entre alguns arabinoglucanos, galactomananos e celulose e que essa associação pode ser estabilizada por interações não covalentes entre os diferentes polissacáridos. No entanto, foram também propostas interações covalentes e foi sugerida a presença de uma nova classe de polissacáridos com características estruturais ainda não conhecidas (Fischer *et al.*, 2001).

Na cromatografia em camada fina (C.C.F.) a fase estacionária é um suporte sólido, em geral sílica, cuja dimensão é ajustável ao número de amostras a aplicar no mesmo. Desta forma, é possível analisar em paralelo várias amostras e padrões, sem necessidade de tratamento prévio nem de serem requeridas grandes quantidades. A aplicação é feita na base do suporte, com espaçamento pré-definido, normalmente utilizando capilares de vidro, e o suporte é colocado numa câmara de eluição contendo o sistema eluente (fase móvel). Este sistema tem de ser adequado às amostras aplicadas e às moléculas a analisar, o que pode constituir uma das

desvantagens do método, uma vez que fases móveis distintas eluem a diferentes velocidades, podendo conduzir a ensaios mais demorados. Esta técnica apresenta baixo custo e a possibilidade de realização de tratamentos pós-cromatográficos, entre os quais, a aplicação de soluções reveladoras específicas para certas moléculas, como polissacáridos, pelo que é uma técnica muitas vezes usada para complementar ou confirmar resultados obtidos por outros métodos (Poole *et al.*, 2003).

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) pode ser conseguida em vários modos, inclusivamente por exclusão molecular. As suas grandes vantagens são o facto de ser rápida, de ter elevada precisão e permitir sensibilidade na deteção, ser automatizada e apropriada para diversos tipos de amostras, designadamente biomoléculas (Dong *et al.*, 2006).

Num sistema de HPLC, podem ser usadas diferentes colunas comerciais com propriedades específicas, consoante a aplicação pretendida. Por exemplo, a coluna Sugar Pak I é empacotada com resina baseada num polímero de estireno-divinilbenzeno sulfonado, sendo utilizada para fracionamento por cromatografia de troca catiónica de açúcares e álcoois (Waters Corporation, 2020). O sistema de HPLC é associado a detetores, consoante a amostra a analisar, permitindo não só fracionar os seus componentes, como também dosear as moléculas alvo constituintes, através de propriedades específicas, como absorvância, fluorescência, índice de refração, entre outras (Dong *et al.*, 2006).

A deteção por fluorescência é bastante específica, mas apenas útil para analitos que sejam naturalmente fluorescentes, enquanto a deteção por índice de refração pode ser aplicada a todos os analitos, incluindo polímeros, açúcares e ácidos orgânicos (Dong *et al.*, 2006). O princípio da deteção por índice de refração baseia-se na diferença entre o índice de refração do eluente puro e do eluente contendo analitos – uma vez que a diferença na natureza dos dois meios causa uma mudança mensurável na velocidade das ondas que os atravessam. Embora, este tipo de deteção tenha a vantagem de ser aplicado a qualquer analito, tem menor sensibilidade face aos referidos anteriormente e é influenciado tanto pela temperatura, como pelo caudal imposto (Dong *et al.*, 2006).

Ramalho *et al.* (2013) analisaram carboidratos em folhas de café através de HPLC e identificaram em maiores concentrações sacarose, frutose e manitol, identificando também arabinose, glucose e rafinose.

De forma a avaliar o conteúdo em monossacáridos dos polissacáridos por cromatografia, é necessária uma hidrólise prévia, que conseguida através de diferentes metodologias. Para a análise de monossacáridos, muitas vezes a hidrólise pode ser realizada em apenas uma etapa, por exemplo, aplicando ácido sulfúrico a 100 °C durante 2 horas. Porém, pode também ser realizada hidrólise em duas etapas, a primeira utilizando um ácido mais fraco, como o ácido trifluoroacético

(TFA) numa concentração mais baixa (0,01 a 0,25 M), a 100 °C, durante 30 minutos a 2 horas. Este ácido é depois removido por evaporação, seguindo para a segunda etapa, onde se aplica um ácido mais forte, como o ácido sulfúrico, numa maior concentração, a 100 °C, durante 2 horas. (Shi, *et al.*, 2020). Embora a hidrólise em dois passos tenha apresentado bons resultados no trabalho de Shi e colegas, com elevada sensibilidade e linearidade, as condições da hidrólise ainda não foram otimizadas e ainda se verifica a degradação de açúcares neutros durante a libertação de ácidos urónicos.

Oosterveld *et al.* submetem as suas amostras a uma hidrólise com ácido fórmico (90% v/v) durante 5 horas, a 100 °C (Oosterveld, *et al.*, 2003). Já Lopes *et al.* (2020) incubaram as suas amostras com ácido sulfúrico (72% v/v) e hidrolisaram-nas com ácido sulfúrico (2 M), a 120 °C, durante 1 hora. Romdhane *et al.* (2017) optaram por usar o ácido TFA, a 120 °C, durante 2 horas.

1.4.3.2. Eletroforese

A eletroforese permite separar moléculas que diferem na dimensão e dependendo do tipo de eletroforese, que diferem também na carga elétrica, enquanto migram num suporte que é sujeito a carga elétrica, voltagem, intensidade de corrente e potência constantes (BraMrer *et al.*, 2001). O tipo de eletroforese varia consoante a natureza do suporte escolhido, podendo este ser uma camada de papel (de filtro ou acetato de celulose), gel (de agarose ou poliacrilamida, com ou sem agente desnaturante) ou um capilar (de sílica, vidro ou plástico) (BraMrer *et al.*, 2001).

A eletroforese pode ser aplicada a vários tipos de biomoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos e polissacáridos, sendo uma técnica versátil, bastante informativa, não morosa e que não necessita de grandes quantidades de amostra (Bramrer *et al.*, 2001).

No presente trabalho, para análise de polissacáridos e proteínas em extratos de café selecionados, utilizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), que foi preparado por polimerização de monómeros de acrilamida e de um co-monómero de bis-acrilamida, que estabelece ligações cruzadas no gel. A porosidade do gel está relacionada com a concentração de acrilamida em solução e esta porosidade influencia a resolução das bandas de migração formadas. A seguinte figura ilustra uma tina e um gel de eletroforese.

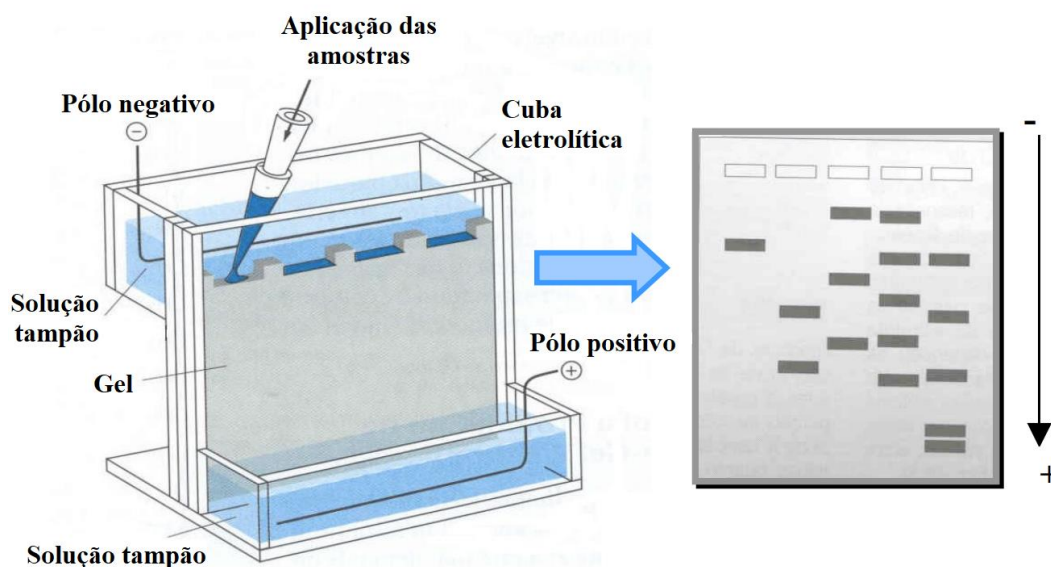


Figura 12 - Esquema de montagem da eletroforese em gel (adaptada de Brammer *et al.*, 2001)

Moléculas com maior carga negativa migram mais rapidamente para o polo positivo e vice-versa; e moléculas com maior dimensão terão mais dificuldade em percorrer o gel, devido à porosidade do mesmo, migrando mais lentamente. Para além da dimensão e carga da molécula, a velocidade da sua migração depende também da distância entre os eléctrodos, da viscosidade do meio e da temperatura. No caso das proteínas, uma vez que são moléculas anfotéricas, é necessário manter o pH do meio constante, através de uma solução tampão (Brammer *et al.*, 2001).

A análise eletroforética de proteínas pode ser realizada em condições nativas ou desnaturantes. No primeiro caso, a conformação nativa das proteínas é conservada, preservando as interações entre as subunidades e a atividade biológica das proteínas. No segundo caso, é aplicado um agente desnaturante, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), que não só causa a desnaturação das proteínas presentes, como lhes atribui carga negativa, de forma que nestas condições, a carga das moléculas não influencia a sua velocidade de migração (Brammer *et al.*, 2001).

De modo a visualizar as bandas de migração podem ser aplicados vários métodos de coloração, consoante o tipo de moléculas em análise, como corar o gel com uma solução de corante azul de Coomassie ou de nitrato de prata (Brammer *et al.*, 2001).

Baú *et al.* (2001) extraíram proteínas do grão verde de diferentes espécies de planta de café utilizando, após remoção por Soxhlet de lípidos com hexano, dietilditiocarbamato de sódio, EDTA, NaCl, ascorbato e polivinilpirrolidona. A análise eletroforética em condições desnaturantes (SDS-PAGE) revelou que a principal proteína de reserva do grão verde de café é

constituída por duas subunidades α e β , e demonstrou para os extratos de *C. arabica* variedade *Typica* a presença de subunidades com Mr de 20.9 ± 1.4 kDa e 37.6 ± 3.3 kDa (Baú *et al.*, 2001).

1.4.3.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN) são duas das técnicas mais utilizadas para caracterizar estruturalmente compostos e que se complementam uma à outra. A análise por FTIR é útil na identificação de grupos funcionais e a análise por RMN na determinação da estrutura química da amostra em estudo (Gundlach *et al.*, 2015).

A técnica de FTIR baseia-se no facto de diferentes tipos de ligações químicas numa molécula absorverem seletivamente radiação infravermelha em diferentes números de onda, alterando a energia das ligações e causando vibração de extensão (*stretching*) ou de flexão (*bending*) dos átomos em torno dessas ligações (Sigma Aldrich *et al.*, 2022). A frequência de radiação absorvida por diferentes ligações e grupos funcionais é também diferente, o que origina padrões de absorvância únicos para cada molécula (Sigma Aldrich, 2022). Esta técnica distingue-se das outras técnicas de espectroscopia de infravermelho por ser mais precisa, não destrutiva e rápida, analisando todos os números de onda simultaneamente graças ao uso de um interferómetro, que consiste num dispositivo ótico que gera um padrão de interferência nos números de onda da luz emitida através do movimento de um espelho interno. Este padrão de interferência é depois convertido num espectro interpretável através do uso da função matemática da transformada de Fourier (Gundlach *et al.*, 2015) (Sigma Aldrich, 2022). Assim, se se fizer incidir radiação infravermelha numa amostra e registar as variações da radiação que passa pela amostra, é possível construir um espectro no qual se identificam bandas de absorvância (ou transmitância) em determinados números de onda, característicos de certas ligações ou grupos funcionais.

Nas figuras abaixo apresentam-se exemplos de espectros FTIR, estando identificadas no espectro da figura 13 algumas bandas típicas de polissacáridos.

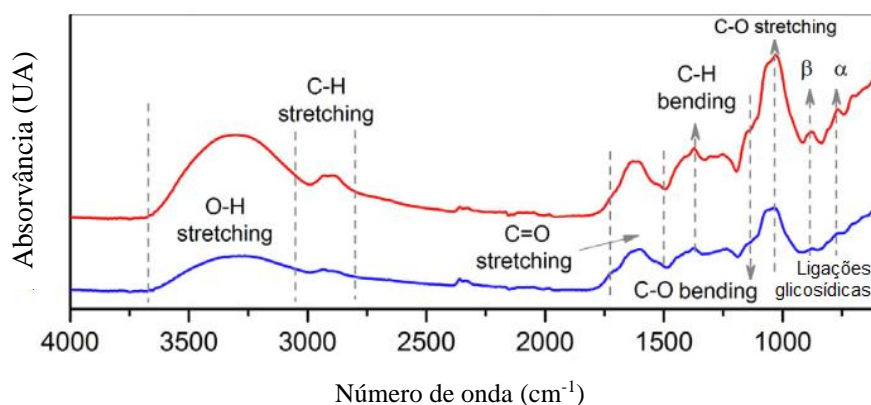


Figura 13 – Espectros de FTIR obtidos para polissacáridos extraídos de borras de café por dois métodos diferentes (adaptado de Ballesteros et al., 2017)

1.4.3.4. Espectroscopia por ressonância magnética nuclear

A ressonância magnética nuclear é uma técnica não destrutiva e não invasiva, na qual é aplicado um campo magnético externo estacionário, que causa a absorção seletiva de frequências por núcleos específicos numa molécula, o que excita os núcleos e induz uma transição nos *spins* nucleares, observável no espectro de RMN. Esta técnica pode ser utilizada de forma dirigida ao conhecimento dos átomos de hidrogénio na molécula em estudo (^1H) ou ao conhecimento dos átomos de carbono (^{13}C) (Sigma Aldrich, 2022).

Quando a energia absorvida é transferida para o ambiente externo, o núcleo excitado volta ao seu estado estável, sendo este processo denominado por *spin-lattice relaxation*. Se o ambiente externo para o qual a energia é transferida for um outro núcleo ao mesmo nível de energia, o processo denomina-se *spin-spin relaxation*. O sinal elétrico detetado por este processo de relaxamento é convertido no espectro de RMN através da transformada de Fourier. As constantes de tempo que caracterizam estes dois processos são responsáveis pelo espectro de RMN obtido (Gundlach et al., 2015; Sigma Aldrich, 2022). A posição no espectro na qual o núcleo absorve energia designa-se por deslocamento químico. O deslocamento químico é afetado pela densidade eletrónica à volta do núcleo – se houver elevada densidade, o núcleo fica protegido do campo magnético externo, o que faz o sinal surgir numa zona superior do espectro – e pelo *spin* de núcleos vizinhos, que podem causar a divisão do sinal de RMN. (Sigma Aldrich, 2022). Como este método depende de uma mudança no *spin* nuclear, moléculas com *spin* nulo (com número par de prótons e neutrões) não podem ser analisadas por RMN (Gundlach et al., 2015).

Nas figuras abaixo encontram-se representados espectros RMN.

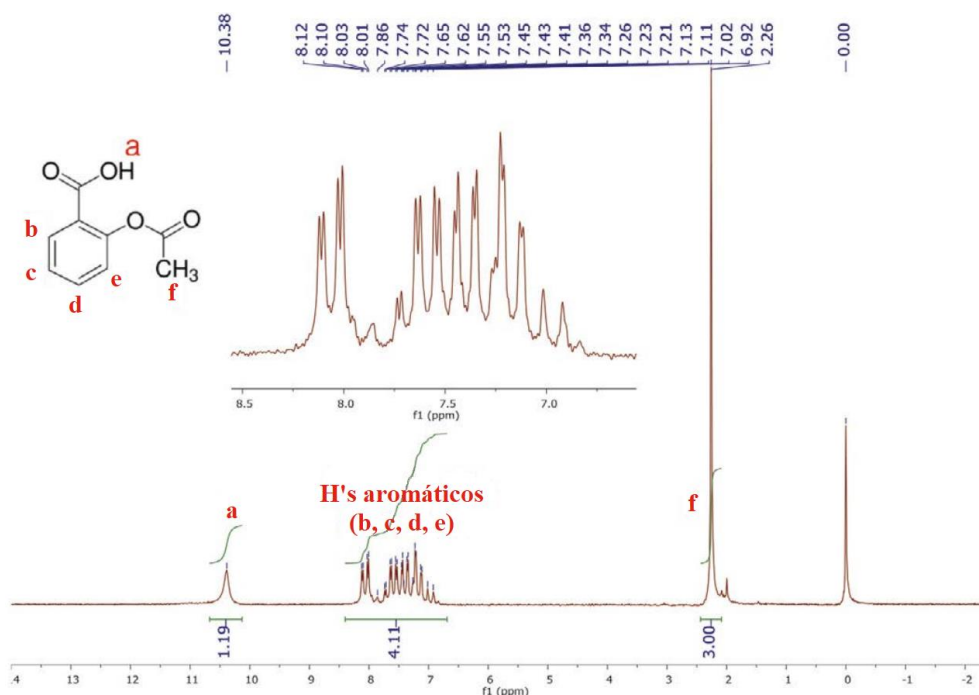


Figura 14 - Espectro RMN para a molécula de aspirina (adaptado de Gundlach et al., 2015)

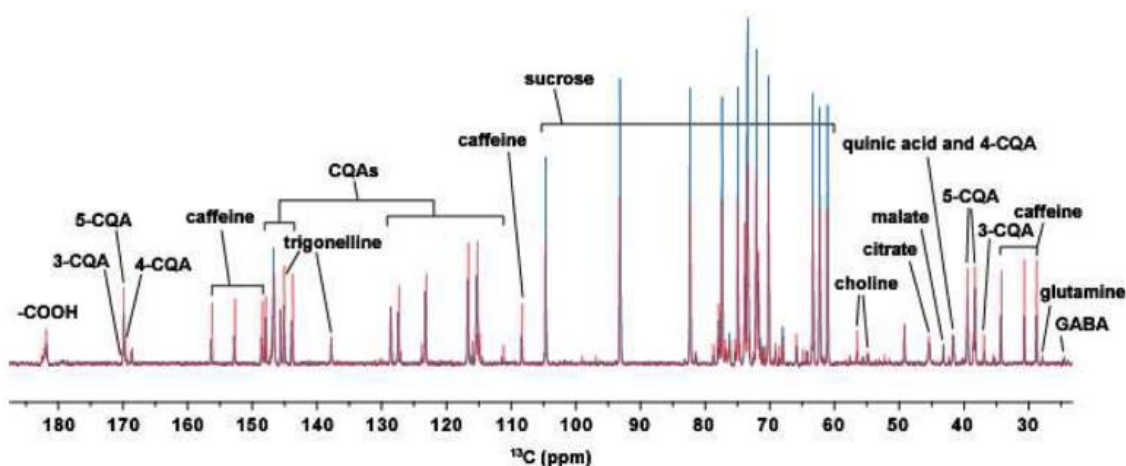


Figura 15 - Espectro RMN ¹³C de extratos de grão verde de *Coffea arabica* L. da Colômbia (azul) e *Coffea canephora* da Indonésia (vermelho) (adaptado de Wei et al., 2022)

1.4.4. Métodos de análise de atividade antibacteriana

Apesar da diversidade de antibióticos sintéticos disponíveis, o crescente aparecimento de bactérias patogênicas multirresistentes a antibióticos, tornou urgente o desenvolvimento de novas moléculas e a pesquisa contínua de compostos com atividade antibacteriana, por exemplo, em produtos naturais como algas, plantas, sementes, grãos e óleos, que são uma fonte importante de compostos com fins terapêuticos (Balouiri et al., 2016).

Como tal, e a fim de testar a sua eficácia de forma prática e rápida, foram estabelecidas várias metodologias experimentais capazes de avaliar a capacidade antimicrobiana de amostras face a vários microrganismos. Os testes com base na difusão de compostos em meios de cultura, previamente inoculados com microrganismos alvo, são bastante comuns. Alguns exemplos são o teste de difusão em disco em meio sólido e o método do gradiente antimicrobiano (disponível em formato comercial: Etest^R) (Balouiri *et al.*, 2016). É também possível combinar a técnica de cromatografia em camada fina com bioautografia e ainda existem métodos de determinação da concentração inibitória mínima de um antibiótico através da diluição do mesmo num caldo ou agar, contendo bactéria alvo (Balouiri *et al.*, 2016).

No presente trabalho, foi aplicado o método da difusão em disco em meio sólido. Este método é dos mais antigos, sendo um procedimento simples e já otimizado, que pode ser utilizado para testar o efeito de diversos compostos em vários microrganismos, modificando fatores como o tipo de meio nutritivo e as condições de incubação utilizadas (Balouiri *et al.*, 2016). Após inoculação do microrganismo alvo em placas de Petri contendo meio sólido, são aplicados, utilizando a técnica asséptica, discos de papel embebidos com as amostras a testar. Após incubação em condições adequadas ao microrganismo em questão, é avaliado o crescimento do microrganismo à volta do disco (figura 16). Se a amostra apresentar propriedades antimicrobianas face ao organismo alvo, a sua difusão no meio, durante o período de incubação, inibe o crescimento microbiano num perímetro à volta do disco, formando uma zona de inibição do crescimento, perceptível a olho nu. Consoante o diâmetro da zona de inibição, é possível concluir-se sobre a suscetibilidade do microrganismo à amostra aplicada no disco, obtendo-se um diâmetro maior quanto maior a suscetibilidade. É também possível averiguar se a inibição é total, caso a zona de inibição à volta do disco seja mais límpida; ou se a inibição é parcial caso seja translúcida. No entanto, este método não permite avaliar a concentração inibitória mínima, uma vez que não é possível quantificar a amostra que é difundida do disco para o agar, podendo apenas fazer-se uma estimativa (Balouiri *et al.*, 2016).

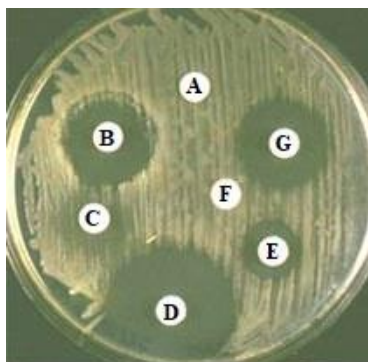


Figura 16 - Resultado do método de difusão em disco (A: sem inibição; B: com inibição; C: com inibição parcial; D: com inibição; E: com inibição; F: sem inibição; G: com inibição) (adaptado de Aryal et al., 2022)

Extração e caracterização de polissacáridos isolados do grão de café da Gorongosa

Vários estudos efetuados com extratos obtidos a partir do grão de *C. arabica* revelaram atividade antimicrobiana contra bactérias como *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e a *Vibrio cholerae* (Almeida *et al.*, 2006; Cushnie *et al.*, 2005; Rawangkan *et al.*, 2022).

2. Materiais e Métodos

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Amostras

Foram analisadas quatro amostras de café, uma delas sendo uma amostra comercial fornecida pela empresa DELTA Cafés, as outras três amostras recolhidas na Serra da Gorongosa, em Moçambique (tabela 4). As amostras da Gorongosa foram produzidas por plantas *Coffea arabica* cv. Costa Rica 95, do grupo Catimor, cujo processamento pós-colheita seguiu o método semi-seco.

Tabela 4 - Descrição das amostras analisadas

Amostra	Descrição
DELTA	Grão de café verde <i>Coffea arabica</i> L. comercial fornecido pela empresa DELTA Cafés
G37	Grão de café verde da planta 37 da Serra da Gorongosa, cultivada a 935 m, com sombreamento moderado, colheita de 2021
G38	Grão de café verde da planta 38 da Serra da Gorongosa, cultivada a 935 m, com sombreamento moderado, colheita de 2021
G10	Grão de café verde da planta 10 da Serra da Gorongosa, cultivada a 650 m, com sombreamento moderado, colheita de 2021

A amostra DELTA foi utilizada numa análise inicial com o intuito de comparar métodos de extração e respetivos resultados de conteúdos em biomoléculas.

As amostras de grão verde de café principais e alvo deste trabalho foram as obtidas nos campos de café da Serra da Gorongosa, em 2021.

2.1.2. Reagentes

Ácido poligalacturónico (Alfa Aesar L04206), fenol (VWR 20599.260), ácido sulfúrico (Fluka B4720), β -(1,3)-D-glucano de cevada (Sigma G6513), Congo Red (Sigma C6767), sulfato de dextrano 200 000 (Sigma 67578), azul toluídino (Fluka WA23035), ácido gálico (Sigma G7384), Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich F9252), Na_2CO_3 (Riedel-de Haën 31432), Azul de Coomassie Brilhante G-250 (Bio-Rad 161-0406), BSA (Fluka 05488), NaNO_2 (Merck 6537.0500), AlCl_3 (Merck 801081), catequina (Sigma C1251), etanol (Fisher Scientific), NaOH (Scharlau), metanol 100% (VWR), ABTS (Sigma A1888), persulfato de potássio (Sigma-Aldrich 216224), Trolox (Aldrich 238813), ácido clorídrico (Fisher Scientific), ácido acético (Merck 1.00063.1000), cloreto de sódio (VWR), dextrano 40 000 (Sigma-Aldrich 9004-54-0), dextrano 70 000 (BioChemica A1847), dextrano 100 000 (Sigma-Aldrich 09184-50G-F).

Os reagentes utilizados que não constam na lista acima descrita foram selecionados em qualidade e pureza consoante a sua aplicabilidade, tendo sido utilizados diretamente e sem tratamento prévio.

2.2. Métodos

2.2.1. Moenda dos grãos verdes de café

As amostras de grão foram previamente despulpadas e lavadas, o que permitiu a remoção do pergaminho e da pele de prata (*silverskin*).

Antes de se proceder à extração de biomoléculas do grão verde de café, foi necessário moer os grãos até uma dimensão de 0,5 mm.

Para o efeito, pesaram-se 5 g de cada amostra, que foram moídas utilizando um moinho (FRITSCH Pulverisette 14) e, de seguida, foram separadas num crivo de 500 μm instalado num agitador de peneiros automático (Retsch AS200 control) (Cassamo *et al.*, 2022).

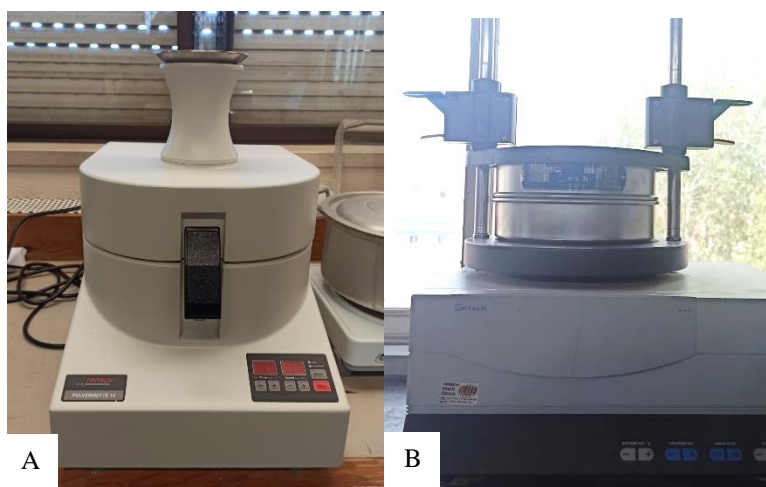


Figura 17 - Equipamento utilizado para a moenda dos grãos verdes de café (A: moinho; B: agitador de peneiros)

O pó de café resultante foi conservado em sacos selados a vácuo, a 4 °C.

2.2.2. Extração de biomoléculas

2.2.2.1. Extração por multi-etapas (MSE)

Tal como o nome indica, este método é realizado em etapas, de forma consecutiva, recorrendo ao uso de diferentes solventes e tempos de extração.

Uma das grandes vantagens deste método é o facto de se obterem 5 frações/sobrenadantes de extração, contendo biomoléculas com diferentes características, consoante a sua afinidade para com o solvente (água fria, água em ebulição, KOH, HCl e NaOH) (Semedo *et al.*, 2015). No entanto, é uma técnica bastante morosa.

O procedimento experimental seguido encontra-se resumido no seguinte esquema:

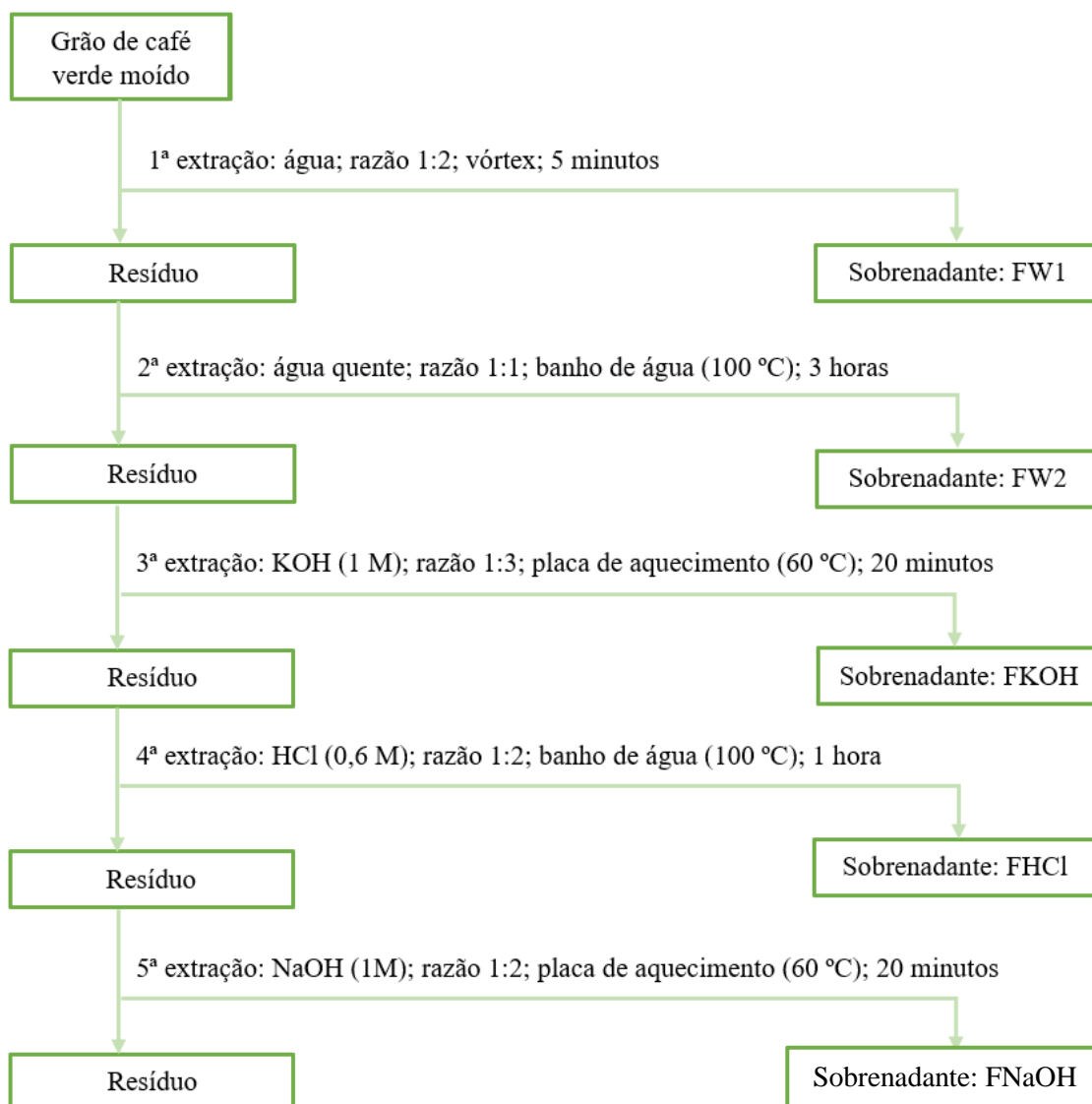


Figura 18 - Procedimento experimental seguido para a extração por multi-etapas

As extrações foram efetuadas a partir de 6 g de pó de grão verde, tendo sido utilizado durante todo o procedimento um único tubo de centrífuga para cada amostra.

Na primeira etapa, foi utilizada água à temperatura ambiente, numa razão de amostra:solvente de 1:2, ou seja, foram adicionados 12 mL de água às 6 g de amostra. A extração foi efetuada através de agitação contínua, durante 5 minutos, com a ajuda de um vórtex (Labnet VX100). Centrifugou-se durante 30 minutos, a 4 °C e 11000 rpm (HERMLE Z 383 K), recolhendo-se depois o sobrenadante (FW1) e separando-o em microtubos. O resíduo sólido foi sujeito à etapa seguinte. Adicionaram-se 6 mL de água (razão amostra:solvente de 1:1) ao resíduo, fechou-se bem o tubo de centrífuga, colocando-o em banho termostaticado (GFL 1002), a 100 °C, durante 3 horas. Centrifugou-se novamente durante 30 minutos, a 4 °C e 11000 rpm, recolheu-se o sobrenadante (FW2) e separou-se o mesmo em microtubos (figura 19).

De seguida, transferiu-se o resíduo sólido para um balão Erlenmeyer, utilizando-se para tal efeito 18 mL de hidróxido de potássio a 1 M (razão amostra:solvente de 1:3). Numa placa de aquecimento (Tethnica Rotamix SHP-10), aqueceu-se a mistura a 60 °C durante 20 minutos, com agitação contínua. Voltou a transferir-se a mistura para um tubo de centrífuga e centrifugou-se durante 30 minutos, a 4 °C e 11000 rpm, recolhendo-se de seguida o sobrenadante (FKOH). Lavou-se o resíduo sólido com 3 mL de água, voltou-se a centrifugar nas mesmas condições e recolheu-se o novo sobrenadante, juntando-o ao previamente recolhido (FKOH). Neutralizou-se esta fração utilizando ácido clorídrico a 6 M, e separou-se a mesma em microtubos.

Prosseguiu-se para a etapa seguinte, adicionando 12 mL de ácido clorídrico a 0,6 M, ao resíduo sólido (razão amostra:solvente de 1:2) e colocou-se o mesmo num banho termostaticado a 100 °C durante 1 hora. Centrifugou-se durante 30 minutos, a 4 °C e 11000 rpm, o sobrenadante foi recolhido, e o resíduo sólido foi lavado com 3 mL de água e centrifugado de novo, juntando os sobrenadantes obtidos (FHCl). A fração final foi neutralizada usando hidróxido de sódio a 6 M, e foi dividida em microtubos.

Por último, adicionaram-se 12 mL de hidróxido de sódio a 1 M ao resíduo sólido remanescente, tendo sido sujeito a 60 °C, durante 20 minutos, sobre uma placa de aquecimento com agitação contínua. A mistura voltou a ser transferida para um tubo de centrífuga, e novamente centrifugada durante 30 minutos, a 4 °C e 11000 rpm, recolhendo-se de seguida o sobrenadante (FNaOH). Lavou-se o resíduo sólido com 3 mL de água e centrifugou-se nas mesmas condições, o sobrenadante foi recuperado e misturado com a fração FNaOH. Neutralizou-se a fração total usando ácido clorídrico a 6 M e separou-se a mesma em microtubos.

Todas as frações, após serem divididas em microtubos, foram centrifugadas novamente, numa mini-centrífuga (Lagogene ScanSpeed Mini), a 13500 rpm, em intervalos de tempo variados, consoante a quantidade e dimensão dos sólidos ainda suspensos nas frações. As frações foram conservadas a 4°C.

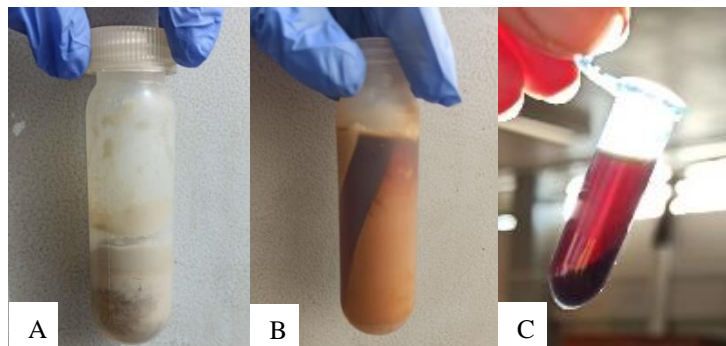


Figura 19 - Extração por multi-etapas (A: amostra de pó de café; B: amostra com água, já centrifugada; C: fração centrifugada no eppendorf)

2.2.2.2. Extração assistida por micro-ondas (MAE)

Esta extração foi feita utilizando um reator de micro-ondas monomodo (Anton Paar “monowave 300”), sendo cada ciclo de extração efetuado a temperatura e tempo de irradiação constantes, 180 °C, durante 10 minutos, usando água como solvente. A potência aplicada foi de 100 W. Estas condições foram selecionadas de acordo com a otimização efetuada no trabalho de Fernandes (2021).

Em tubos adequados foram colocadas 0,4 g de grão de café verde moído, nos quais se adicionaram 4 mL de água destilada (razão amostra:solvente de 1:10), e um agitador magnético (figura 20). Para se obterem volumes suficientes para as análises seguintes, este processo foi efetuado nove vezes para cada amostra, recolhendo tanto o sólido como o líquido para um só tubo *Falcon*. Transferiu-se depois a mistura para um tubo de centrífuga e centrifugou-se durante 1 hora, a 11000 rpm e a 4 °C. Recolheu-se o sobrenadante e separou-se o mesmo em microtubos.

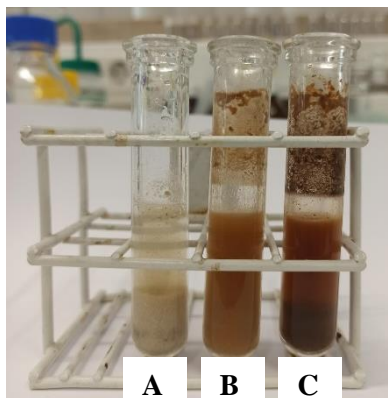


Figura 20 - Amostra de café antes e depois da extração assistida por micro-ondas (A: antes da extração; B: imediatamente após; C: 15 minutos após a extração)

2.2.3. Doseamento de biomoléculas

2.2.3.1. Método do fenol-ácido sulfúrico

Para o doseamento de polissacáridos neutros presentes em cada extrato, foi utilizado o método fenol-sulfúrico com adaptações (Masuko *et al.*, 2005).

Numa microplaca de 96 poços, colocaram-se por poço 50 μL da amostra a analisar, 150 μL de ácido sulfúrico concentrado e, imediatamente a seguir, 30 μL de solução de fenol com concentração de 5% (m/v). Após todos os volumes terem sido pipetados para a microplaca, esta foi colocada em banho termostático, a 90 °C, durante 5 minutos, sendo depois retirada e arrefecida até à temperatura ambiente, antes de ser feita a leitura num espectrofotómetro (BIO-RAD 680), a 490 nm.

Os doseamentos foram realizados em triplicado e para o ensaio em branco foram usados 50 μL de água destilada em substituição do volume de amostra. O padrão utilizado foi o ácido poligalacturónico numa gama de concentrações entre 0 e 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, preparado em tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,5. Os resultados foram apresentados em mg de polissacáridos por g de café verde.

2.2.3.2. Método carbazol-ácido sulfúrico

Este método foi utilizado para dosear os polissacáridos ácidos presentes nos extratos obtidos, seguindo-se o procedimento de acordo com Monsalve-Bustamante *et al.* (2019), Cesaretti *et al.* (2003) e Taylor *et al.* (1993), com adaptações.

Foram adicionados 40 μL de amostra, 400 μL de água destilada, 2 mL de tetraborato de sódio (0,95 g/L H_2SO_4) e 40 μL de carbazol (0,2 % m/v em etanol) em tubos de ensaio. Posteriormente, foram agitados e colocados em banho termostático a 90 °C, durante 12 minutos.

De seguida, retiraram-se os tubos do banho, agitaram-se novamente e depois de arrefecidos até à temperatura ambiente, pipetaram-se 300 µL de cada solução para uma microplaca de 96 poços. A absorvância foi lida a 528 nm num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec). O padrão utilizado foi o ácido D-galacturónico numa gama de concentração de 0 a 2,5 µg/µL.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado, e o ensaio em branco foi efetuado utilizando água destilada em substituição do volume de amostra. A quantificação foi expressa em mg de polissacáridos ácidos por g de de café verde.

2.2.3.3. Método do corante Congo red

De forma a dosear os β -(1,3)-D-glucanos com estrutura em tripla hélice presentes nos extratos obtidos, foi utilizado o método do corante Congo red otimizado sugerido por Semedo *et al.* (2015). Foram pipetados 140 µL de amostra para uma microplaca de 96 poços e adicionaram-se 140 µL de Congo red 0,017 % (m/v) em tampão fosfatos salino 0,15 mM pH 7,2 (PBS). De seguida foi lida a absorvância a 510 nm (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec). Foi utilizado como padrão β -(1,3)-glucano de cevada, numa gama de 0 a 7 µg/poço, dissolvido em NaOH (1M) e neutralizado. Todos os ensaios foram realizados em triplicado e formam efetuados 3 tipos de ensaio em branco: água destilada com o corante Congo red, água destilada com o tampão PBS e a amostra com o tampão PBS. Os resultados foram apresentados em mg de β -(1,3)-D-glucanos por g de café verde.

2.2.3.4. Método do Corante Azul de toluidina

Com o intuito de dosear polissacáridos sulfatados, seguiu-se o protocolo sugerido por Hahn *et al.* (2016), com alterações.

Colocaram-se numa microplaca de 96 poços 50 µL de amostra, seguidos de 250 µL de solução de azul de toluidina 0,05 mg/mL preparada em PBS. Deixou-se repousar no escuro durante 5 minutos e leu-se a absorvância a 655 nm (BIO-RAD 680). Utilizou-se como branco, água destilada em substituição do volume de amostra e como padrão uma solução de sulfato de dextrano com massa molar média de 200 kDa, numa gama de concentrações entre 0 e 6,25 µg/poço. Os doseamentos foram realizados em triplicado e a quantificação foi expressa em mg por g de café verde.

2.2.3.5. Método do ácido 3,5-dinitrosalicílico

De modo a determinar o teor em açúcares redutores nos extratos obtidos, utilizou-se o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico descrito por Lindsay *et al.* (1973), com adaptações.

Em tubos de vidro roscado colocou-se 500 µL de amostra (ou água, no ensaio em branco), 1 mL de água e 500 µL do reagente DNS (1 % (m/V) de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 16 % (m/V) de hidróxido de sódio e 30 % (m/V) de tartarato de sódio-potássio). Os tubos foram incubados a 100 °C durante 10 minutos, e após arrefecerem até à temperatura ambiente colocou-se 300 µL da mistura reacional numa microplaca de 96 poços.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e leu-se a absorvância a 550 nm num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec). Utilizou-se como padrão glucose numa gama de 0,0375 a 0,225 mg/mL e, como branco, água destilada em substituição do volume de amostra. Os resultados foram apresentados em mg de açúcares redutores por g de café verde.

2.2.3.6. Método de ligação do Corante Azul de Coomassie

Este método é adequado ao doseamento de proteína total, sendo também identificado como método de Bradford *et al.* (1976).

Numa microplaca de 96 poços foram colocados 100 µL de amostra a dosear e igual volume do reagente de Bradford (*Quick Start Bradford 1x dye reagent*, BIORAD). Deixou-se repousar durante 10 minutos e de seguida leu-se a absorvância, a 550 nm, num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec). Os ensaios foram efetuados em triplicado, tendo sido utilizado como padrão albumina de soro bovino (BSA) numa gama de 0-20 µg/mL, e água destilada em substituição do volume de amostra como branco. Os resultados obtidos foram apresentados em mg de proteína por g de café verde.

2.2.3.7. Método do sulfofosfovanilina (SPV)

Este método permitiu determinar o conteúdo em lípidos numa amostra, tendo sido seguido o procedimento sugerido por Anschau *et al.* (2017), com algumas modificações.

As amostras a dosear foram diluídas em etanol, de seguida foram agitadas com a ajuda de um vórtex durante 1 minuto e por último centrifugadas a 13500 rpm, durante 3 minutos. Separou-se o sobrenadante e colocaram-se 20 µL em tubos de vidro roscado, e incubou-se a 90 °C durante 10 minutos, para evaporação do solvente e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. Adicionaram-se 180 µL de ácido sulfúrico concentrado, e incubou-se a 100 °C durante 10 minutos, e deixou-se arrefecer novamente até à temperatura ambiente. Por fim, foram

adicionados 500 µL do reagente SPV (0,0012 % (m/V) numa solução de ácido o-fosfórico a 70,83 % (V/V)), e incubou-se a 37 °C durante 15 minutos. Deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente e colocou-se 150 µL da mistura de cada tubo nos respetivos poços de uma microplaca de 96 poços. A microplaca foi reservada no escuro durante 30 minutos, e de seguida a absorvância foi lida a 528 nm num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec).

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e o ensaio em branco foi realizado com etanol em substituição do volume de amostra. Como padrão foi utilizado o óleo de canola numa gama de concentração de 0 a 2,5 mg/mL e os resultados foram expressos em mg por g de café verde.

2.2.3.8. Método de Folin-Ciocalteu

Para dosear o conteúdo em compostos fenólicos totais utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu, sugerido por Reis *et al.* (2012).

Numa microplaca de 96 poços foram colocados 30 µL de amostra a dosear, seguidos de 150 µL de reagente de Folin-Ciocalteu (diluído de 1:10 (V/V)) e 120 µL de solução de Na₂CO₃ (75 mg/mL). A microplaca foi colocada em banho termostaticado a 40 °C durante 30 minutos, sendo depois lida a absorvância a 655 nm num leitor de microplacas (BIORAD 680). Todos os ensaios foram realizados em triplicado, tendo sido utilizado como branco água destilada em substituição do volume de amostra e como padrão ácido gálico (0,25 mg/mL), numa gama de 0 a 0,25 mg/mL. Os resultados foram apresentados em mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por g de café verde.

2.2.3.9. Método do cloreto de alumínio

De modo a determinar o teor total em compostos flavonóides, utilizou-se o método colorimétrico de cloreto de alumínio descrito anteriormente por Yeh *et al.* (2011), com algumas modificações. Numa microplaca de 96 poços, colocou-se 25 µL de amostra, 100 µL de água destilada e 7,5 µL de solução de NaNO₂ (5% m/v). Deixou-se repousar 5 minutos à temperatura ambiente e adicionou-se 7,5 µL de solução de AlCl₃ 10% (m/v), deixando repousar novamente durante mais 5 minutos. Pipetou-se, então, mais 100 µL de uma solução de NaOH 4% (m/v) e deixou-se repousar durante 10 minutos. Leu-se então a absorvância da mistura reacional a 510 nm num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec).

Como branco utilizou-se água destilada em substituição do volume de amostra e como padrão utilizou-se catequina preparada em etanol 50% (V/V) em concentrações de 0 a 0,56

mg/mL. Os doseamentos foram realizados em triplicado e os resultados apresentam-se em mg equivalentes de catequina (CE) por g de café verde.

2.2.4. Análise da capacidade antioxidante pelo método do radical ABTS

De forma a analisar a atividades antioxidante dos extratos obtidos, utilizou-se o método do radical ABTS, de acordo com o sugerido por Re *et al.* (1998).

Preparou-se inicialmente a solução de ABTS^{•+} 7 mM com K₂O₈S₂ 2,5 mM em água destilada e deixou-se repousar no escuro durante 12 a 16 horas. Após este período, a solução foi diluída com tampão PBS de modo que a absorvância a 655 nm se aproximasse de 1, sendo a solução resultante designada por solução stock de ABTS^{•+}. Numa microplaca de 96 poços pipetou-se 10 µL da amostra ou padrão e 290 µL da solução ABTS^{•+} e leu-se a absorvância a 655 nm num leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA – BMG Labtec).

Como padrão para a curva de calibração, utilizou-se uma solução de Trolox (2 mg/mL em metanol 80% (V/V)) preparado em concentrações de 0 a 1 mg/mL, e para o ensaio em branco utilizou-se água destilada em substituição do volume de amostra. Os doseamentos foram realizados em triplicado e a quantificação foi expressa em mg equivalentes de Trolox (TE) por g de café verde.

2.2.5. Separação e caracterização parcial de biomoléculas

2.2.5.1. Fracionamento por cromatografia de exclusão molecular

Este método foi utilizado para fracionar as biomoléculas nos extratos obtidos por MAE das amostras G37 e G10 e na fração FKOH obtida por extração por multi-etapas da amostra G37. Para o efeito, recorreu-se ao método de cromatografia de exclusão molecular, com base no procedimento descrito por Fischer *et al.* (2001).

A coluna cromatográfica foi empacotada com resina *Sephacryl S-300 HR* (95 cm x 20 mm) e equilibrada com 2 volumes de uma solução de tampão acetato de sódio 0,05 M com 0,15 M de NaCl (SAB), pH 5,45, a um caudal de 30 mL/h (figura 21).



Figura 21 - Montagem da coluna cromatográfica empacotada com resina Sephacryl S-300 HR, bomba peristáltica e coletor automático de frações

Para a calibração prévia da coluna cromatográfica, aplicaram-se 3 mL de soluções padrão de azul de dextrano (MR \approx 2000 kDa) e de dextrano MR \approx 40 kDa, preparadas a 3 mg/mL e 20 mg/mL, respetivamente, em tampão SAB.

Os extratos a fracionar foram previamente liofilizados e solubilizados em tampão SAB a uma concentração entre 12,5 e 20 mg/mL. Posteriormente, foram aplicados 3 e 5 mL destas soluções à coluna anteriormente equilibrada com tampão SAB contendo 1M de NaCl e um caudal imposto de 30 mL/h. A recolha das frações cromatográficas (5 mL) foi iniciada após a eluição do volume de exclusão da coluna (84 mL).

A cromatografia foi monitorizada através do doseamento do conteúdo em polissacáridos (neutros, sulfatados e β -(1,3)-D-glucanos), compostos fenólicos totais, compostos flavonoides totais e proteína total nas frações, pelos métodos já descritos anteriormente em 2.2.3.

2.2.5.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Os polissacáridos presentes nos extratos e nas frações cromatográficas selecionadas com maior conteúdo nestes compostos, foram analisados por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), com o objetivo de caracterizar parcialmente a sua estrutura. Os espectros foram obtidos num espectrofotómetro Bruker Vertex 70 (com software OPUS 5.5) num total de 64 varrimentos com uma resolução de 2 cm^{-1} , em pastilhas de KBr, numa gama de $500 - 4000\text{ cm}^{-1}$.

Uma vez que o tampão SAB interfere nesta análise, foi necessário alterar o solvente das frações cromatográficas para água ultrapura (Ultrapura®), utilizando unidades de filtração por centrifugação (Centricon EMD Millipore UFC903024) com limite de exclusão molecular da membrana de 10 kDa. Todas as amostras analisadas foram previamente liofilizadas (UNICRYO MC2L) e secas em linha de vácuo.

2.2.5.3. Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A análise das oses constituintes dos polissacáridos presentes nos extratos obtidos e nas frações cromatográficas selecionadas, foi efetuada por HPLC (Beckman System Gold) com detetor de índice de refração (Waters, Modelo 2414). Para o efeito, foi necessário inicialmente realizar uma hidrólise ácida dos polissacáridos, tendo sido aplicados dois métodos descritos por Coimbra *et al.* (2013) e por Romdhane *et al.* (2017).

Aos extratos MAE das amostras G10 e G37 e FKOH da amostra G37, previamente liofilizados (192,5 mg), foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico (12M), e foram mantidos em agitação, à temperatura ambiente, durante 3 horas.

De seguida, adicionou-se 25 mL de água e a mistura foi mantida a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora, com agitação. Posteriormente, adicionou-se mais 30 mL de água destilada (Coimbra *et al.*, 2013).

A 20 mg dos extratos liofilizados MAE das amostras G10 e G37 adicionou-se 1,5 mL de ácido trifluoroacético 2M (TFA), e 4,5 mL ao extrato de FKOH da amostra G37. De seguida, foram colocados em banho termostaticado a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 2 horas e guardados durante a noite a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Romdhane *et al.*, 2017).

Foram também analisados extratos não hidrolisados de MAE das amostras G10 e G37, bem como todas as frações obtidas por extração multi-etapas da amostra G37 e ainda a fração FKOH da amostra G37 (previamente liofilizada). As amostras analisadas foram preparadas como descrito na tabela 5.

Tabela 5 - Preparação das amostras a analisar por HPLC

Amostra	Preparação
Extratos hidrolisados com ácido sulfúrico	Diluídos 1:2 em água ultrapura, filtrados
Extratos hidrolisados com TFA (2M)	Filtrados
Extratos (MAE e MSE) não hidrolisados da amostra G37	Filtrados
Extrato FW1 da amostra G37	Diluído 1:10 em água ultrapura, filtrado
Extrato FKOH liofilizado da amostra G37	Solubilizado em água ultrapura (66,7 mg/mL), filtrado
Extrato MAE não hidrolisado da amostra G10	Filtrado

Como se pode observar através da tabela anterior, todas as amostras foram filtradas (filtro de nylon com porosidade 0.45 μm) antes da sua injeção (50 μL) no equipamento de HPLC. A coluna utilizada foi a SugarPak I (300 x 6.5 Mr, Waters) a 90 °C com detetor por índice de refração (a 35°C). O eluente foi água ultrapura (Milli-Q®) contendo 50 mg/L de EDTA de cálcio, a um caudal de 0,5 mL/minuto, em condições isocráticas, (Ramalho *et al.*, 2013).

O equilíbrio da coluna foi realizado previamente com a coluna invertida, utilizando uma solução de EDTA de cálcio a 500 ppm, ao mesmo caudal. O registo, a aquisição e o tratamento dos dados foram efectuados através do software 32 Karat (versão 8.0).

Para a quantificação dos oligo- e monossacáridos foram construídas quatro curvas de calibração, utilizando como padrões sacarose, glucose, frutose e manose numa gama de 0 a 10 mg/mL.



Figura 22 - Sistema de HPLC (Beckman System Gold) com detetor de índice de refração (Waters Modelo 2414)

2.2.5.4. Análise por cromatografia em camada fina

A cromatografia em cama fina (C.C.F.) foi efetuada também para a análise dos hidratos de carbono presentes nos extratos e frações cromatográficas selecionados (Tabela 6). Este método foi aplicado segundo o descrito por Romdhane *et al.* (2017), com algumas adaptações.

Tabela 6 - Preparação das amostras a analisar por C.C.F.

Amostra	Estado	Preparação
Padrões de hidratos de carbono	Sólido	Diluídos no volume mínimo de etanol.
Extratos hidrolisados com TFA (2M)	Líquido	Filtrados e aplicados diretamente.
Extratos (MAE e MSE) não hidrolisados da amostra G37	Líquido	Filtrados e aplicados diretamente.
Extrato de MAE não hidrolisado da amostra G10	Líquido	Filtrados e aplicados diretamente.
Frações cromatográficas obtidas a partir do extrato MAE da amostra G10	Sólido	Diluídas no volume mínimo de água.

Os padrões utilizados foram sacarose, glucose, frutose, manose, galactose e sorbose, e foram selecionados os extratos FW2, FHCl, FKO₂H, FNaOH e MAE da amostra G37 e ainda o extrato obtido por MAE da amostra G10, com base nos resultados dos conteúdos em polissacáridos. Os extratos foram previamente congelados e liofilizados, e os extratos FKO₂H e MAE da amostra G37, assim como o extrato MAE da amostra G10, foram ainda hidrolisados.

Utilizaram-se placas de sílica, nas quais foram aplicadas as amostras espaçadas 1 cm entre si. A fase eluente utilizada foi uma solução de clorofórmio, ácido acético e água destilada (6:8:1 V/V) e após cada corrida foram identificadas as manchas de migração de cada amostra utilizando uma lâmpada com emissão de radiação a 254 nm. Adicionalmente, após a secagem de cada placa, estas foram borrifadas com uma solução reveladora específica para hidratos de carbono (ácido sulfúrico a 5 % (V/V) em etanol) e incubadas a 120 °C durante 5 a 10 minutos.

2.2.5.5. Fracionamento de biomoléculas por eletroforese

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foi utilizada numa tentativa de análise e identificação dos polissacáridos presentes nos extratos e nas frações cromatográficas obtidos. Para tal, foram preparados géis de poliacrilamida a 6 % em tampão Tris-Borato (TBE) 100 mM contendo 1 mM EDTA a pH 8,3. Utilizaram-se como padrões dextranos de Mr ≈70 kDa e Mr ≈100 kDa, sulfato de dextrano Mr ≈40 kDa e heparina de mucosa intestinal suína Mr ≈17 kDa.

As amostras foram preparadas numa proporção de 1:5 com tampão de aplicação (azul de bromofenol 0,02% em sacarose 2 M), e as corridas foram realizadas a 100 V durante 45 minutos, à temperatura ambiente, utilizando tampão TBE pré-arrefecido a 4°C.

Após a corrida, foram testados dois métodos de coloração: o método de coloração com com uma solução de *Stains-All* (0,5% (m/V) em etanol 50% (V/V) e também o método de coloração do nitrato de prata (0,4% m/V), adaptados de Semedo *et al.* (2016) e Phillips *et al.* (2011).

Para além da análise de polissacáridos, foram também analisadas as proteínas presentes nas amostras por SDS-PAGE com géis de 12,5 e 17% em tampão TBE 100 mM contendo 1 mM EDTA, a pH 8,3. Como marcador de massa molar utilizou-se o *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (10–250 kDa, BIORAD) e a frente de migração foi constituída por azul de bromofenol. Foi seguido o protocolo sugerido por Poulsen *et al.* (1996) com algumas alterações.

As amostras (extratos e frações cromatográficas) foram preparadas numa proporção de 1:1 com o tampão de aplicação (glicerol 20% (V/V) em SDS, com 0,001 g/mL de bromofenol e tampão Tris-HCl 0,5 M, 20 % (V/V)) e colocadas em banho termostatizado a 100 °C durante 10 minutos. As corridas eletroforéticas foram realizadas a 150 V durante 90 minutos à temperatura ambiente, e os géis foram corados com uma solução corante de azul de *Coomassie* R-250 0,5% (m/V) com etanol 50% (V/V) e ácido acético 10 % (V/V).

2.2.6. Análise da atividade antibacteriana

O estudo da atividade antimicrobiana dos extratos de MAE e das frações de MSE contra as espécies *Staphylococcus aureus* ATCC25923 (Gram positiva) e *Echerichia coli* ATCC25922 (Gram negativa) foi efetuado através da técnica de difusão em disco (Hockett *et al.*, 2017; Hudzicki *et al.*, 2009).

Os meios de cultura Mueller-Hinton Broth (MHB) e Mueller-Hinton Agar (MHA) foram preparados com concentrações de 21 g/L e 38 g/L, respetivamente, e esterilizados em autoclave (Uniclave 99) a 121 °C, durante 15 minutos. De seguida, verteu-se o meio MHA para as placas de Petri estéreis e deixou-se solidificar à temperatura ambiente. Prepararam-se pré-inóculos no meio líquido MHB (10 mL), no qual foram ressuspendidas 2-3 colónias de cada cultura bacteriana. Os pré-inóculos foram incubados a 37 °C durante 12 horas, a 37 °C, com agitação a 180 rpm (Incubadora Gallenkamp). Registou-se a absorvância a 625 nm das culturas e ajustou-se a sua turbidez por diluição em soro fisiológico (NaCl a 0,85% (m/v) à turbidez do padrão 0,5 de McFarland.

A inoculação das espécies microbianas foi feita de acordo com as normas M100 do CLSI (CLSI, 2021), na superfície seca do meio de cultura sólido MHA utilizando a técnica de riscado (três vezes, em amplitudes de 60°), após o que se deixou as placas repousar 3 a 5 minutos, com a tampa entreaberta. Por último, aplicaram-se discos de papel (1 cm de diâmetro) embebidos com 10 µL das amostras numa placa de Petri, contendo o meio de cultura sólido MHA inoculado. Em cada placa de Petri foram também colocados um disco com solução de gentamicina 10 mg/mL (controlo positivo) e outro disco com água esterilizada (controlo negativo). Após incubação a 37 °C durante 12 horas, mediram-se os diâmetros correspondentes às zonas de inibição de crescimento bacteriano de cada amostra e controlo.

3. Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

3.1. Extração e doseamento de polissacáridos

Os extratos obtidos pelos métodos de multi-etapas (MSE) e de extração assistida por micro-ondas (MAE), a partir das amostras de grão de café verde comercial da marca Delta e café verde do PNG (planta 10 – cultivada a baixa altitude, sombreamento moderado, plantas 37 e 38 – cultivadas a elevada altitude, sombreamento moderado), foram doseados relativamente ao seu conteúdo em polissacáridos neutros, polissacáridos ácidos, polissacáridos sulfatados e β -(1,3)-glucanos, através das curvas de calibração obtidas pelos métodos fenol-ácido sulfúrico, carbazol-ácido sulfúrico, corante azul de toluidina e corante Congo red, respetivamente.

Os resultados obtidos para os polissacáridos nos extratos de MAE e nas diferentes frações de MSE para as três amostras de café encontram-se nas figuras que se seguem.

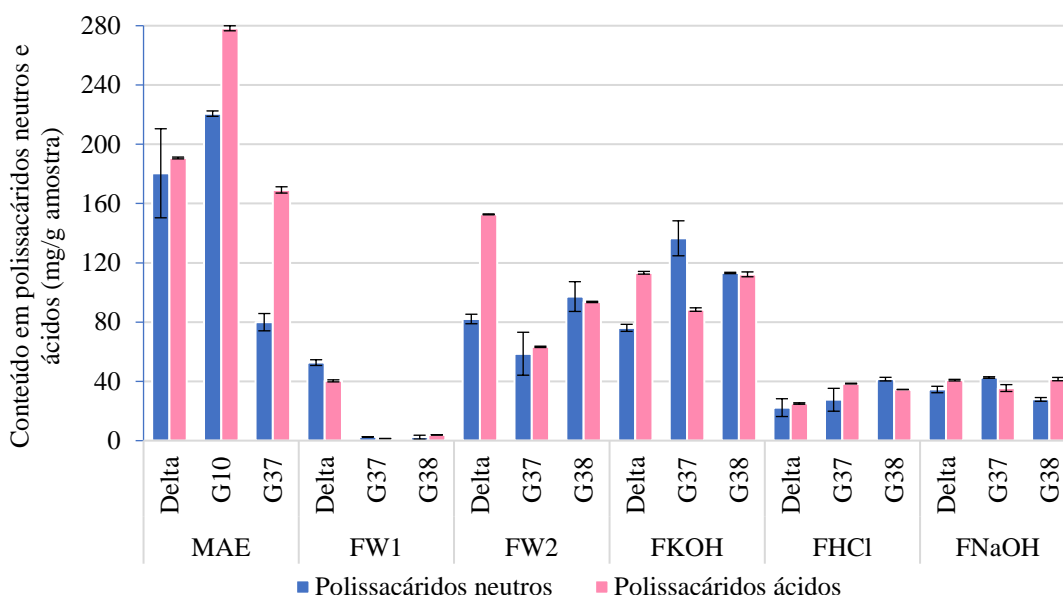


Figura 23 - Conteúdo em polissacáridos neutros e ácidos nos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38)

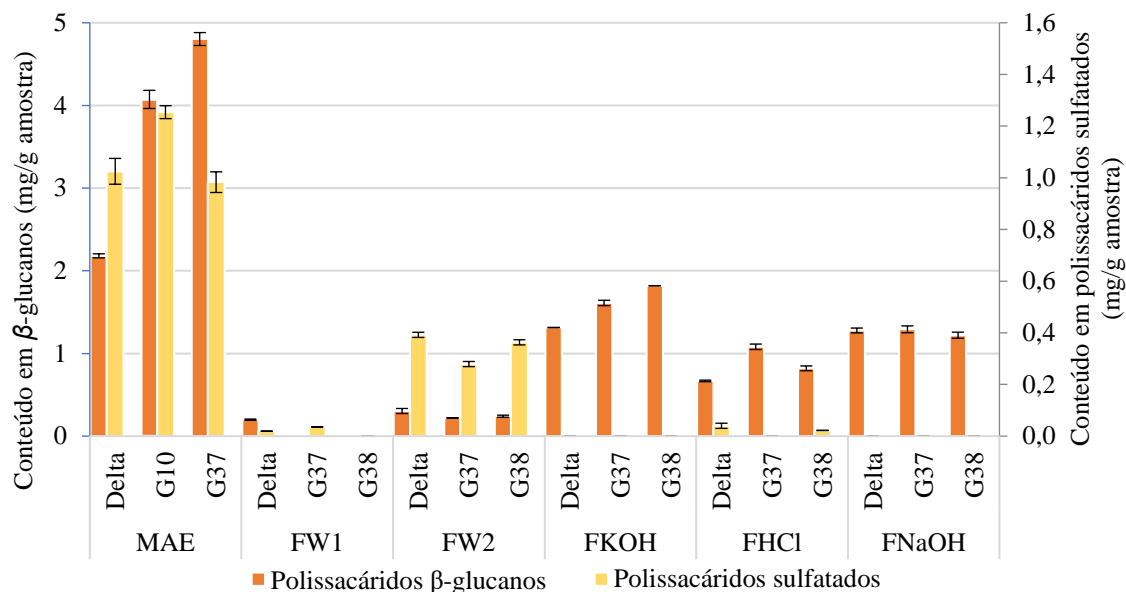


Figura 24 - Conteúdo em polissacáridos sulfatados e β -(1,3)-glucanos nos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38)

Analisando as figuras 23 e 24, é possível concluir que a extração por micro-ondas é uma boa alternativa à extração por multi-etapas, no entanto, a soma das massas de polissacáridos dos diferentes extratos obtidos por multi-etapas é sempre superior à massa extraída por micro-ondas, o que indica que esta última técnica tem um rendimento menor.

Uma das grandes desvantagens da extração por multi-etapas aplicada a uma amostra como o café em pó, é o facto de ser usada água como solvente nas duas primeiras extrações. Isto resulta na formação de uma pasta entre o café e a água, que dificulta a extração do sobrenadante a analisar. Consequentemente, devido ao pouco volume obtido na fração FW1, não foi possível realizar o doseamento pelo método Congo red para as amostras do café da Gorongosa (figura 24).

Na extração por multi-etapas, as frações nas quais geralmente são obtidos maiores conteúdos em polissacáridos neutros e em polissacáridos ácidos são a FW2 e FKOH. Já em β -(1,3)-glucanos a FKOH e FNaOH. A fração FKOH parece então ter resultado de condições de extração mais promissoras.

O extrato com maior conteúdo em polissacáridos neutros foi o de MAE do café da Gorongosa, amostra número 10 ($220,7 \pm 1,8$ mg/g amostra), sendo este também o extrato com maior conteúdo em polissacáridos ácidos ($278,3 \pm 0,5$ mg/g amostra). Comparando os resultados obtidos para os extratos de MAE das plantas G10 e G37, é possível concluir que o cultivo a altitudes mais baixas favorece o conteúdo em polissacáridos neutros e ácidos.

O maior conteúdo em β -(1,3)-glucanos foi obtido por MAE do café da Gorongosa, amostra G37 ($4,8 \pm 0,01$ mg/g amostra). Durante a extração por multi-etapas aplicada às amostras de pó de café verde, verificou-se que a utilização de água como solvente nas duas primeiras etapas resulta na formação de uma pasta, que dificulta a recolha do sobrenadante a analisar.

Relativamente a polissacáridos sulfatados, o maior conteúdo corresponde ao extrato de MAE da amostra G10 ($1,25 \pm 0,025$ mg/g amostra). As frações FKOH e FNaOH não apresentam conteúdo em polissacáridos sulfatados, em nenhuma das amostras, e as frações FW1 e FHCl apresentam valores muito baixos (aproximadamente 10^{-2} mg/g amostra) (Figura 24).

Numa primeira análise dos resultados das figuras 23 e 24 é possível concluir que a extração por micro-ondas é uma boa alternativa à extração por multi-etapas, no entanto, a soma das massas dos diversos polissacáridos nas diferentes frações de multi-etapas é quase sempre superior à massa extraída por micro-ondas, sendo a exceção o conteúdo em polissacáridos sulfatados, o que indica que MAE permite obter um rendimento menor em polissacáridos neutros, ácidos e β -(1,3)-glucanos, relativamente a MSE.

Tabela 7 - Resultados dos doseamentos nos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38)

	MAE Delta	MSE Delta	MAE G37	MSE G37	MAE G10	MSE G38
Polissacáridos neutros (mg/g amostra)	$180,41 \pm 42,49$	267,67	$79,94 \pm 8,26$	267,99	$220,66 \pm 5,89$	282,10
Polissacáridos ácidos (mg/g amostra)	$190,75 \pm 3,68$	372,18	$169,20 \pm 8,77$	227,20	$278,27 \pm 0,66$	285,84
Polissacáridos β -(1,3)-glucanos (mg/g amostra)	$2,18 \pm 0,04$	3,76	$4,80 \pm 0,14$	4,20	$4,07 \pm 0,44$	4,10
Polissacáridos sulfatados (mg/g amostra)	$1,03 \pm 0,08$	0,45	$0,98 \pm 0,05$	0,32	$1,25 \pm 0,04$	0,39

As frações da extração por multi-etapas das amostras em estudo com maiores conteúdos em polissacáridos neutros e em polissacáridos ácidos são as FW2 e FKOH, enquanto as que exibem mais β -(1,3)-glucanos são as FKOH e FNaOH. Desta forma, o KOH parece ser o solvente mais adequado para a extração de polissacáridos do café verde.

Para alguns extratos, como os de MAE das amostras Delta, G10 e G37, e algumas frações de MSE, foram obtidos mais polissacáridos ácidos do que polissacáridos neutros (Figura 23), sugerindo que o método do fenol-ácido sulfúrico não permite quantificar todos os polissacáridos presentes, e em específico, os polissacáridos ácidos.

No que respeita ao doseamento de polissacáridos do grão verde de café extraídos pelos métodos aplicados no presente estudo, verifica-se que são poucos os trabalhos atualmente publicados. Porém, Fischer *et al.* (2001) trabalharam com grão verde de café, cujas biomoléculas foram extraídas por MSE. Estes autores detetaram 273 mg polissacáridos neutros/g amostra em frações obtidas com água e 149 mg polissacáridos neutros/g amostra em frações de KOH (1M),

resultados que não diferem muito dos obtidos no presente trabalho. Já Fernandes (2022) obteve conteúdos em polissacáridos neutros por MAE de aproximadamente 584 mg/g amostra, no entanto, para frações extraídas com KOH (1M), obteve valores inferiores a 100 mg/g amostra.

Nos extratos obtidos foram também determinados os conteúdos em açúcares redutores, pelo método do reagente DNS, e tendo por base a respetiva curva de calibração obtida para a glucose. Os resultados apresentam-se na figura 25.

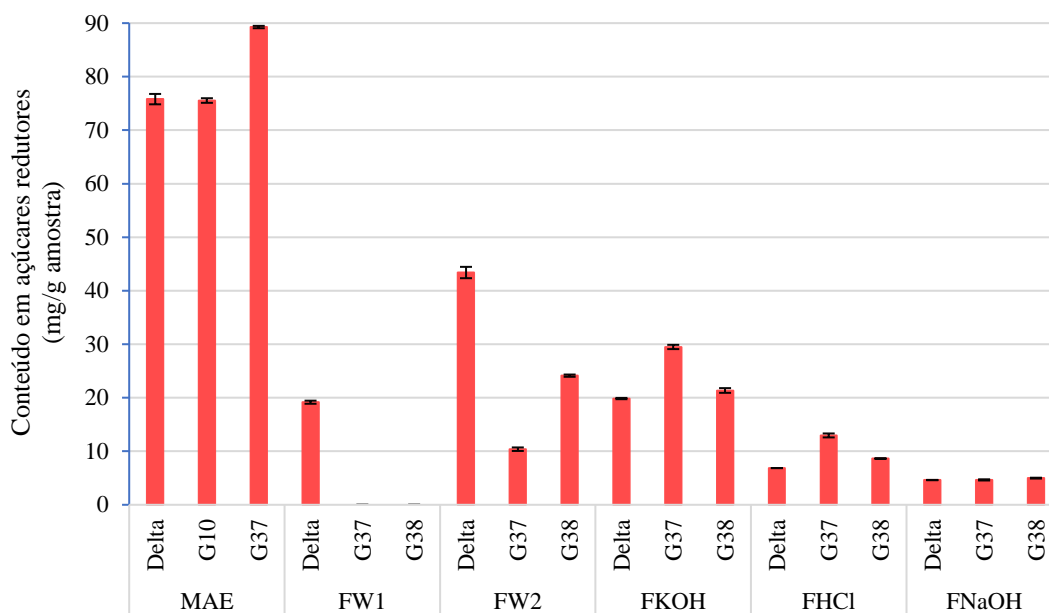


Figura 25 - Conteúdo em açúcares redutores dos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38)

Devido ao pouco volume obtido na extração das frações FW1 das amostras G37 e G38, não foi possível dosear estes extratos relativamente ao seu conteúdo em açúcares redutores.

O extrato de MAE da amostra G37 foi o que apresentou maior conteúdo em açúcares redutores ($83,3 \pm 0,22$ mg/g amostra), apesar dos resultados obtidos para as amostras da Delta e da Gorongosa se encontrarem na mesma ordem de grandeza.

Go *et al.* (2016) analisaram o conteúdo em açúcares redutores em borras de café submetidas a hidrólise ácida, obtendo valores entre 25 e 31 mg/g amostra, valores estes que, embora sejam inferiores aos verificados nos extratos de MAE do presente trabalho, estão na mesma ordem de grandeza que os obtidos para as frações de multi-etapas. É também necessário considerar que os procedimentos aos quais o grão verde de café é submetido até se obter borras terão sem dúvida impacto na sua composição.

Os extratos obtidos por MAE apresentaram conteúdos muito maiores que os obtidos por extração por multi-etapas, como se tinha verificado também nos doseamentos de polissacáridos

neutros, ácidos, sulfatados e β -(1,3)-glucanos. De igual modo, as frações de multi-etapas que apresentaram maior conteúdo em açúcares redutores foram também a FW2 e FKOH.

3.2. Extração e doseamento de proteínas

Aquando da extração de polissacáridos, inevitavelmente são extraídas outras macromoléculas, na forma livre ou complexada. Um exemplo são as proteínas, que no café muitas vezes se encontram associadas a polissacáridos presentes na parede celular (Fischer *et al.*, 2001).

Desta forma, os extratos recolhidos foram também analisados relativamente ao seu conteúdo em proteínas, com base nas curvas de calibração traçadas para o método de ligação do azul de *Coomassie*, estando os resultados destes doseamentos presentes na seguinte figura.

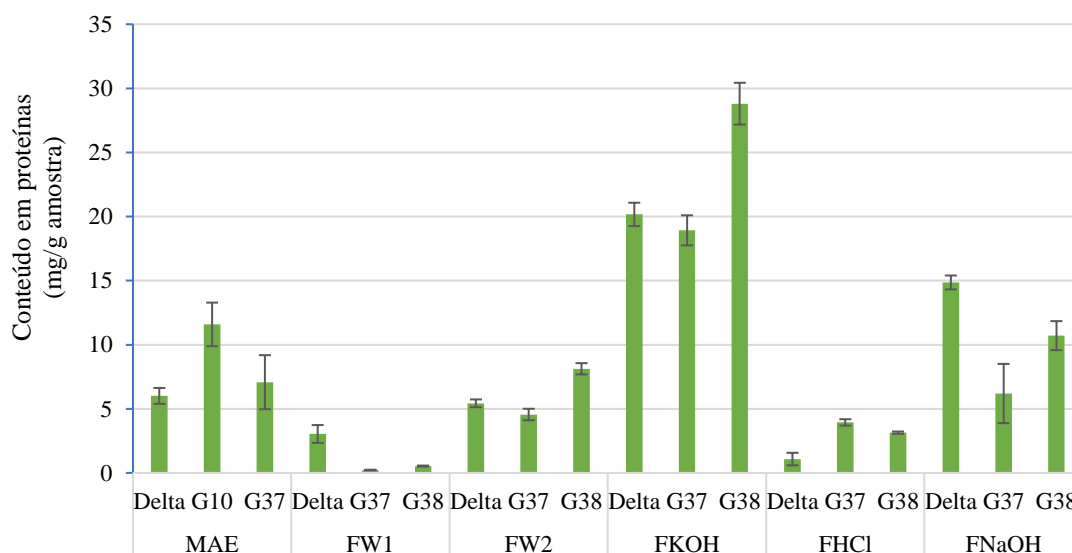


Figura 26 - Conteúdo em proteínas dos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38)

É possível concluir que os extratos com maior conteúdo em proteínas correspondem à fração FKOH, destacando-se o da amostra 38 do café da Gorongosa ($28,8 \pm 1,6$ mg/g amostra). Nesta análise os extratos provenientes da extração por MAE apresentam menores quantidades do que os provenientes da extração por multi-etapas, contrariamente ao que se verificou para polissacáridos neutros e β -(1,3)-glucanos. Estes resultados podem ser justificados pela elevada temperatura a que esta extração é realizada (180 °C), que possivelmente desencadeia reações de Maillard e desnatura algumas proteínas presentes nas amostras. Tal como os extratos de MAE, os extratos da fração FW2 apresentam também baixo conteúdo comparativamente às restantes frações, e ao contrário do que se verificou para os hidratos de carbono, sendo as frações com maior conteúdo proteico as FKOH e FNaOH.

As evidências referidas reforçam a influência da temperatura de extração na quantidade de proteína doseada, uma vez que as frações FW2 e FHCl são obtidas a 100 °C – apresentando menor conteúdo – e as frações FKOH e FNaOH a 60 °C – exibindo maior conteúdo.

Oosterveld *et al.* (2003) concluíram que extraíndo biomoléculas do grão verde de café usando água quente como solvente, obtém-se um conteúdo de 59% (m/m) em proteínas, e com NaOH (1M) um conteúdo de 41 % (m/m). No entanto, também referiram que estes resultados podem ter sido incrementados pela presença de outros compostos azotados.

Redgewell *et al.* (2002) trabalharam com condições de extração mais extremas – solventes como etanol e obtiveram um conteúdo proteico de 12-15 % (m/m), menores do que os de Oosterveld *et al.*, mas ainda superiores aos da presente dissertação.

Fernandes (2022), que trabalhou com condições muito semelhantes às do presente trabalho e com amostras de uma colheita anterior das mesmas plantas, obteve para a extração com KOH (1M) um teor de $28,6 \pm 0,01$ mg/g amostra, o que é concordante com os resultados obtidos. No entanto, para as amostras G10 e G37 extraídas por MAE, Fernandes obteve valores menores, concluindo que esta extração não teria sido completa.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem uma redução do conteúdo proteico no grão com o aumento da altitude a que o mesmo é produzido, tal como evidenciou Fernandes (2022). Apesar das amostras G37 e G38 corresponderem a grão de café produzido exatamente nas mesmas condições de altitude e sombreamento, mas de plantas diferentes, os extratos de MAE e nas frações FKOH e FNaOH apresentam conteúdos proteicos distintos.

3.3. Extração e doseamento de lípidos

Para além de polissacáridos e proteínas são extraídas, a partir do grão verde de café, outras macromoléculas como os lípidos. Para avaliação do conteúdo de lípidos, os extratos foram analisados através do método da sulfosfosvanilina (SPV), com base na curva de calibração traçada para o mesmo. Os resultados obtidos apresentam-se na figura 27.

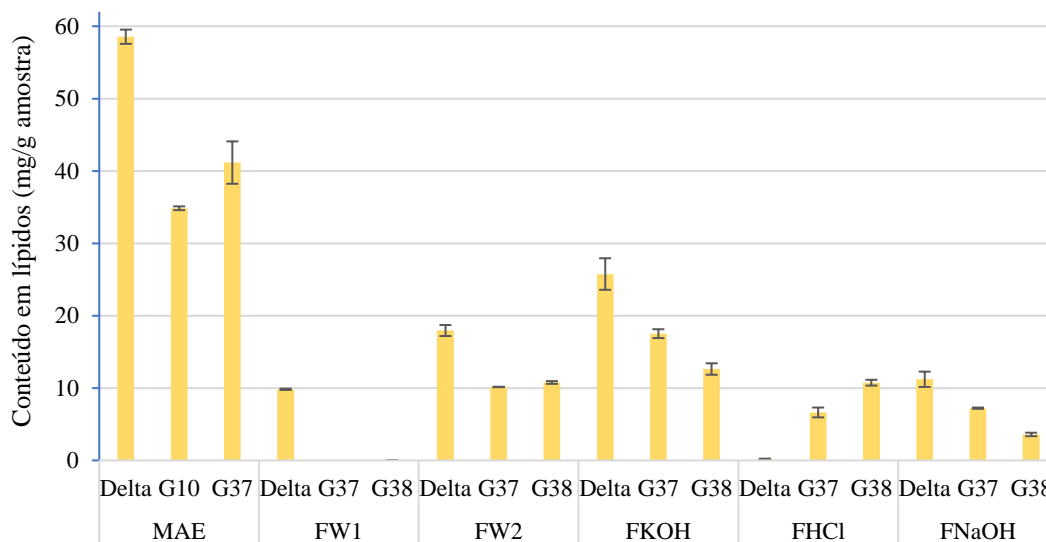


Figura 27 - Conteúdo em lípidos dos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38)

Devido ao volume muito reduzido das frações FW1 obtidas por extração por multi-etapas das amostras G37 e G38, a análise de lípidos nestas frações não foi possível.

À semelhança do verificado para os polissacáridos, os extratos resultantes de MAE apresentam o conteúdo mais elevado, sendo o extrato com maior concentração de lípidos o da amostra comercial de café da Delta ($58,5 \pm 1,0$ mg/g amostra). No que respeita à extração por multi-etapas, os extratos com maior conteúdo são os das frações FW2 e FKOH. Analisando a diferença de conteúdo em lípidos dos extratos de MAE, é possível concluir que plantas cultivadas a maiores altitudes dão origem a grãos de café com maior concentração lipídica.

Go *et al.* (2016) estudaram extratos obtidos de amostras de borras de café, e dosearam o seu conteúdo em lípidos entre 13 e 16 mg/g amostra. Estes resultados são da mesma ordem de grandeza dos obtidos para as frações de multi-etapas do presente trabalho, embora menores do que os valores obtidos para os extratos de MAE. No entanto, é necessário ter em conta que as amostras de borras de café são submetidas a mais procedimentos do que as amostras de grão verde, o que terá afetado a sua composição.

De referir que a composição do grão verde de *C. arabica* L. publicada por Belitz *et al.* (2009) apresenta concentrações de lípidos cerca de quatro vezes superiores às obtidas no presente trabalho para os extratos de MAE, podendo tais diferenças ser justificadas pelas condições de produção do grão e pelos métodos de extração aplicados.

3.4. Análise da capacidade antioxidante

Um dos métodos utilizados para determinar o potencial antioxidante dos extratos foi o método do radical ABTS^{•+}, para o qual foi necessário efetuar uma curva de calibração com o padrão Trolox. Na figura que se segue, encontram-se resumidos os resultados obtidos.

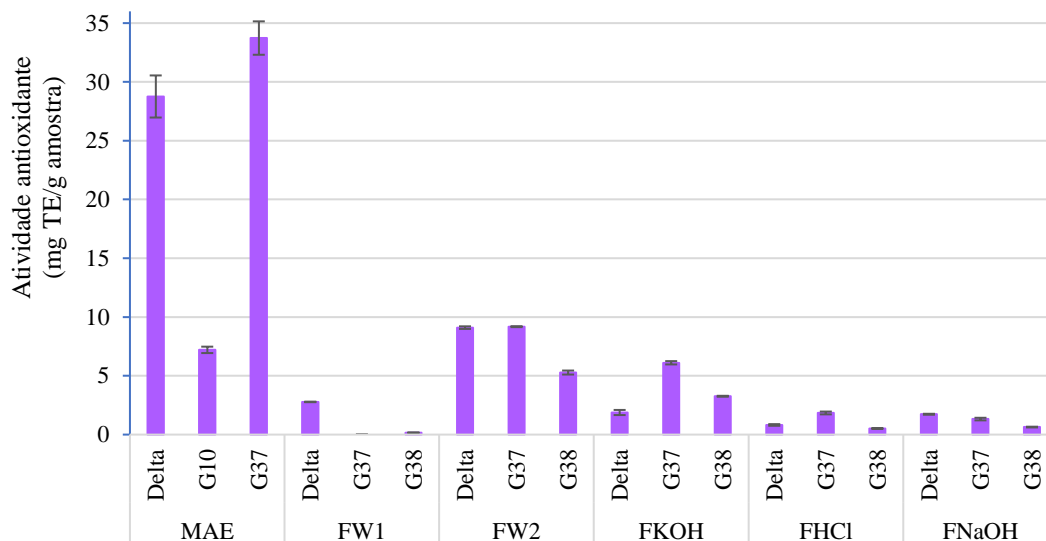


Figura 28 - Potencial antioxidante dos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38)

Como seria de esperar, face aos resultados anteriormente apresentados, os extratos de MAE são os que apresentam maior atividade antioxidante, especialmente o da amostra 37 do café da Gorongosa ($33,73 \pm 1,42$ mg TE/g amostra), que se destaca surpreendentemente do extrato G10 ($7,21 \pm 0,27$ mg TE/g amostra). Esta diferença indica que café cultivado a altitudes superiores apresenta um maior potencial antioxidante, mas considerando que a amostra G10 foi armazenada durante mais tempo do que a amostra G37 antes da extração por MAE, pode ter havido perda da capacidade antioxidante durante este armazenamento. Consistentemente, dos extratos obtidos por multi-etapas, os mais promissores em termos de atividade antioxidante são FW2 e FKOH, em concordância com o que se verificou para a maioria dos polissacáridos e lípidos doseados.

Esta análise foi aprofundada através dos doseamentos de composto fenólicos e flavonoides, fazendo uso das curvas de calibração obtidas para os métodos Folin-Ciocalteu e do cloreto de alumínio, respetivamente. Os resultados obtidos encontram-se na figura 29.

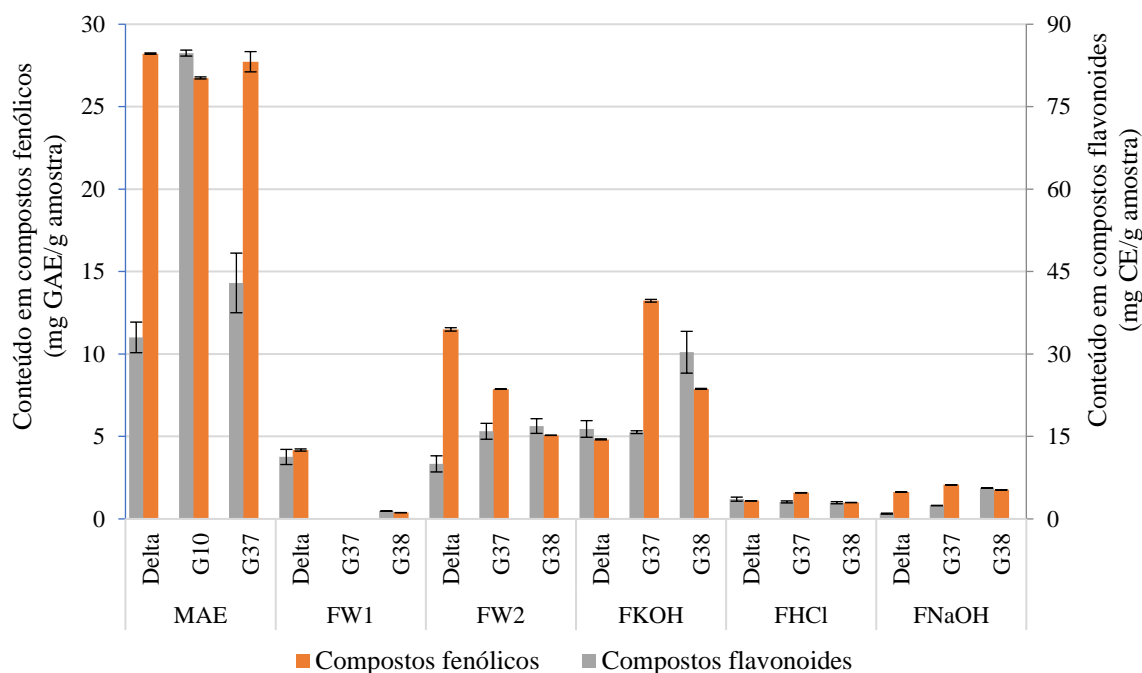


Figura 29 - Conteúdo em compostos fenólicos e flavonoides dos extratos obtidos pelos métodos de extração MAE e MSE para as amostras da Delta e do PNG (G10, G37 e G38)

Tal como se verificou no doseamento de β -(1,3)-glucanos e de lípidos, devido ao pequeno volume de sobrenadante recolhido na primeira extração por multi-etapas, não foi possível analisar a amostra 37 da Gorongosa pelos métodos Folin-Ciocalteu e cloreto de alumínio.

Em termos de compostos fenólicos, o extrato com maior conteúdo foi o de MAE do café Delta ($28,2 \pm 0,04$ mg GAE/g amostra), valor muito próximo do obtido para o extrato de MAE da amostra 37 da Gorongosa ($27,7 \pm 0,6$ mg GAE/g amostra). O extrato de MAE da amostra 37 revelou maior conteúdo em compostos flavonoides ($42,9 \pm 5,4$ mg CE/g amostra), em relação ao da Delta, embora a determinação apresente maior erro associado. O extrato da amostra G10, obtido pelo mesmo método de extração, quando comparado com os resultados das amostras Delta e G37, demonstrou um conteúdo semelhante em compostos fenólicos ($26,74 \pm 0,06$ mg GAE/g amostra) mas superior em flavonoides ($84,76 \pm 0,54$ mg CE/g amostra).

Relativamente aos diferentes extratos resultantes da extração por multi-etapas, as frações FW2 e FKOH continuam a mostrar ser as mais promissoras também para compostos fenólicos e flavonoides.

Pérez-Hernández *et al.* (2012) avaliaram a capacidade antioxidante de várias amostras de café após extração de biomoléculas do grão verde de *C. arabica* utilizando água quente, contudo os valores foram reportados em equivalentes de ácido clorogénico (CAE) ($55,84 \pm 2,40$ mg CAE/g amostra), inviabilizando a comparação com os resultados do presente trabalho. Para o

método do radical ABTS, reportaram $227,25 \pm 16,7 \mu\text{M Trolox/g}$ amostra, valor inferior até mesmo ao obtido para o extrato MAE da amostra G10.

Sualeh *et al.* (2020) realizaram a extração de biomoléculas do grão verde de café utilizando água quente e metanol. Nestas condições, obtiveram um nível de atividade antioxidante de 70,32 %, embora esta tenha sido avaliada através do método do radical livre DPPH, e não para o método do radical ABTS.

Fernandes (2022), que realizou extrações em condições semelhantes, obteve um conteúdo máximo em compostos fenólicos de $41,24 \pm 2,40 \text{ mg GAE/g}$ amostra para a amostra G10 e de $39,19 \pm 2,26 \text{ mg GAE/g}$ amostra para a amostra G37, valores superiores aos obtidos no presente trabalho. Já em compostos flavonoides, obteve um conteúdo máximo de $38,96 \pm 3,14 \text{ mg CE /g}$ amostra para a amostra G10 e $51,24 \pm 12,81 \text{ mg CE /g}$ amostra para a amostra G37, valores inferiores aos agora obtidos. Para as frações FW1, FW2 e FKOH, esta autora determinou conteúdos de 20-60 mg CE/g amostra, também superiores aos obtidos no presente trabalho. Adicionalmente, no estudo atual, concluiu-se que a extração por MAE foi a mais eficaz em termos de isolamento de compostos fenólicos e flavonoides, o que não vai ao encontro do referido por Fernandes (2022).

Relativamente à capacidade antioxidante avaliada através do método do radical ABTS, Fernandes (2022) concluiu que os extratos obtidos por MAE foram os que revelaram maior capacidade, 18-30 mg TE/g amostra, o que é concordante com os resultados obtidos no presente trabalho.

3.5. Separação e caracterização parcial da estrutura de biomoléculas

3.5.1. Fracionamento de biomoléculas por cromatografia de exclusão molecular

Identificados os extratos com maiores conteúdos em β -(1,3)-glucanos e elevada atividade antioxidante, e tendo em consideração outros fatores como o volume de extrato disponível, avançou-se para a purificação dos mesmos.

O fracionamento de biomoléculas nos extratos foi realizado por cromatografia de exclusão molecular, em coluna empacotada com resina *Sephacryl* S-300 HR e utilizando como fase móvel solução tampão acetato de sódio 0,05 M, com 0,15 M de NaCl, a um pH de 5,45.

A primeira separação cromatográfica foi realizada para o extrato obtido por MAE da amostra 37 do café da Gorongosa. O extrato foi previamente liofilizado e o sólido resultante foi dissolvido em tampão da fase móvel, a uma concentração de 12,6 mg/mL. Aplicaram-se na coluna cromatográfica, 5 mL desta solução e recolheram-se 90 frações de 5 mL cada. As frações foram analisadas pelos métodos fenol-sulfúrico, azul de toluidina, corante Congo red, Folin-Ciocalteu, cloreto de alumínio e corante azul de Comassie, o que permitiu obter os cromatogramas que se seguem.

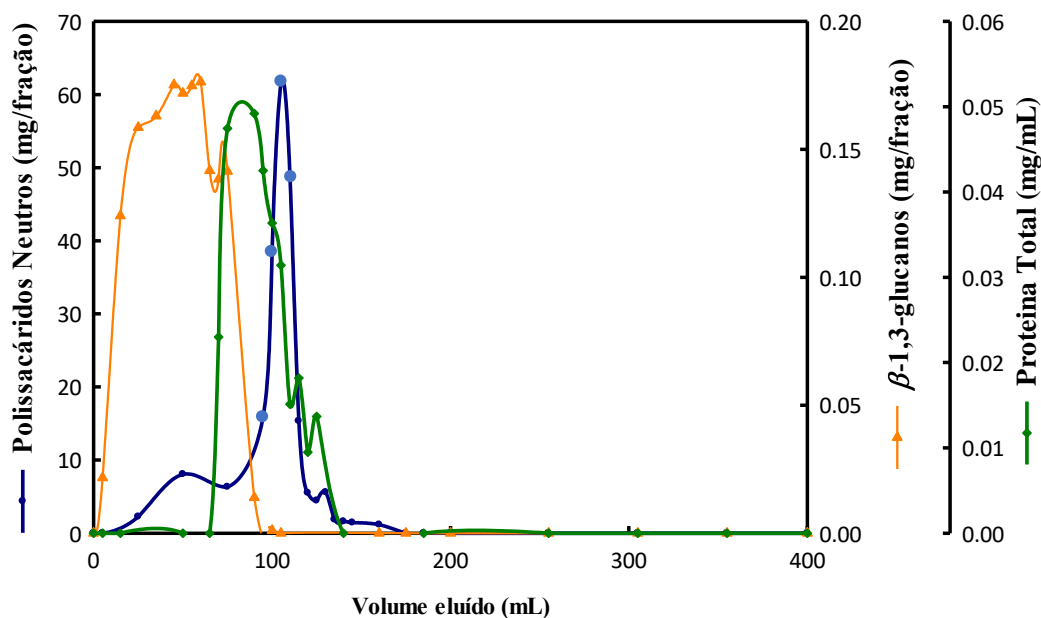


Figura 30 - Cromatograma do fracionamento do extrato de MAE da amostra G37 em coluna com *Sephacryl* S-300 HR (análise de polissacáridos neutros, β -(1,3)-glucanos e proteínas)

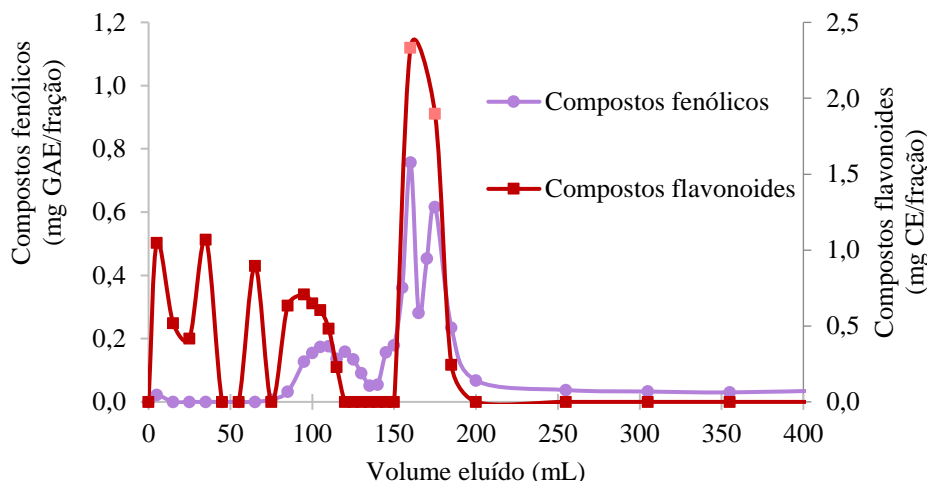


Figura 31 - Cromatograma do fracionamento do extrato de MAE da amostra G37 em coluna com Sephacryl S-300 HR (análise de compostos fenólicos e flavonoides)

Nos cromatogramas da figura 30 verificam-se dois picos para polissacáridos neutros, um com uma área muito pequena (Volume eluído (V_e) = 50 mL) e outro maior (V_e = 105 mL), correspondendo a massas molares relativas, tendo em conta a calibração prévia da coluna, superior a 2000 kDa e de 40 kDa. No que respeita aos β -(1,3)-glucanos, não foi possível uma separação efetiva dos mesmos, pelo facto do perfil cromatográfico revelar um único pico largo, ao qual se atribuem massas molares relativas superiores a 2000 kDa. Em relação às proteínas presentes no extrato de MAE, o seu fracionamento também não foi conseguido, face ao pico único visível no cromatograma. Verifica-se ainda que nas frações com maior conteúdo de polissacáridos neutros, estes polissacáridos não são do tipo β -(1,3)-glucanos, mas como contêm alguma proteína, sugerem a sua existência na forma livre, ou de proteoglicanos ou de complexos proteína-polissacáridos (Sutherland *et al.*, 2004).

Relativamente aos cromatogramas de análise de compostos fenólicos e flavonoides (figura 31), as frações iniciais (até $V_e \approx 70$ mL) que apresentam compostos flavonoides correspondem às que contêm β -(1,3)-glucanos. No que respeita às frações recolhidas com $V_e = 100$ mL, nas quais tinham sido doseados polissacáridos e proteínas, verifica-se também a presença de compostos fenólicos e de compostos flavonoides. Na fração referente a $V_e = 160$ mL doseou-se 2,3 mg de flavonoides e 0,76 mg de compostos fenólicos, tendo assim sido possível separar algumas destas moléculas de polissacáridos e de proteínas.

As frações cromatográficas correspondentes a picos de concentração dos diferentes compostos doseados foram ainda analisadas através do método do radical ABTS. As frações correspondentes a $V_e = 90$; 100; 105; 110 mL – relativas ao pico de polissacáridos neutros, marcadas com um tom azul-claro no cromatograma (figura 30) – apresentaram valores de inibição do radical ABTS de 9,2%, 7,4%, 12,2% e 12,1%, respetivamente. Desta forma, a atividade antioxidante detetada pode dever-se quer à presença de polissacáridos e/ou compostos fenólicos

e/ou flavonoides. Já as frações referentes ao pico de flavonoides ($V_e = 160; 175$ mL) também com compostos fenólicos e assinaladas a vermelho-claro (figura 31) – exibiram valores de inibição de 28,2% e 15,1%, respetivamente.

Embora as frações também tenham sido analisadas pelo método de azul de toluidina, o cromatograma resultante apresentou um perfil bastante variável, provavelmente devido à muito baixa concentração de polissacáridos sulfatados presentes no extrato inicial de grão verde. A concentração máxima obtida corresponde a um $V_e = 120$ mL (0,36 mg/fração). Importa ainda referir, que foram detetados polissacáridos sulfatados em frações com V_e superiores a 175 mL, nas quais não foram detetados outro tipo de polissacáridos.

Durante qualquer corrida cromatográfica é frequente a existência de perdas, devido à eventual retenção de moléculas na resina. Para avaliar o sucesso da cromatografia realizada, determinaram-se os rendimentos nos diferentes tipos de moléculas, considerando os resultados obtidos para as frações cromatográficas e para o extrato de MAE da amostra G37 em tampão acetato aplicado na coluna. Os rendimentos obtidos encontram-se resumidos na seguinte tabela.

Tabela 8 - Rendimentos obtidos por fracionamento do extrato MAE da amostra G37 por cromatografia de exclusão molecular

Moléculas doseadas	Massa total frações doseadas (mg)	Massa inicialmente aplicada (mg)	Rendimento (%)
Polissacáridos neutros	175,85	192,01	91,6
Polissacáridos sulfatados	1,89	6,49	29,1
β-(1,3)-glucanos	1,70	0,34	ND
Proteínas	0,29	0,40	71,1
Flavonóides totais	12,84	25,22	50,9
Fenólicos totais	4,57	8,80	51,9

ND – Não determinado

Na tabela 8, não é apresentado o rendimento em β -(1,3)-glucanos, uma vez que a soma das concentrações para as diferentes frações foi bastante superior à da solução aplicada na coluna, obtendo-se assim um rendimento sem significado. Este resultado pode indiciar a presença de interferentes no extrato que possam ter conduzido a uma concentração subestimada de β -(1,3)-glucanos na solução inicial. O menor rendimento foi obtido na análise de polissacáridos sulfatados, possivelmente devido ao facto de estas biomoléculas se encontrarem em baixas concentrações, existindo um limite de deteção, que é superior às mesmas. Já a análise de polissacáridos neutros, presentes em elevadas concentrações, permitiu obter um maior rendimento.

A fração FKOH da extração por multi-etapas da amostra G37 também foi sujeita a cromatografia de exclusão molecular e as frações cromatográficas obtidas foram analisadas pelos mesmos métodos acima mencionados (figuras 32 e 33).

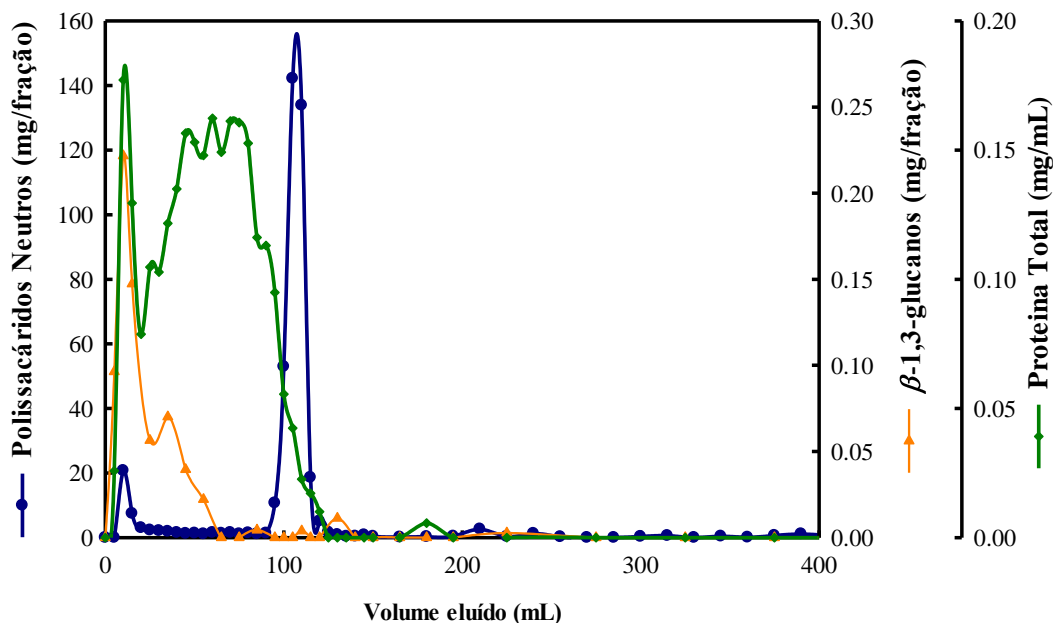


Figura 32 - Cromatograma do fracionamento do extrato FKOH da amostra G37 em Sephacryl S-300 HR (análise de polissacáridos neutros, β -(1,3)-glucanos e proteínas)

Através do cromatograma apresentado na figura 32, é possível identificar dois polissacáridos de diferentes massas molares, nas frações obtidas com $V_e = 10$ mL (20,7 mg/fração) e 105 mL (149,1 mg/fração). Tal como se verificou no cromatograma do fracionamento do extrato de MAE da mesma amostra, no cromatograma agora obtido, o maior pico de concentração de polissacáridos encontra-se a um V_e entre 100 e 110 mL, correspondendo a uma massa molar de aproximadamente 40 kDa, considerando a curva de calibração previamente obtida. Já o polissacárido identificado na fração correspondente a $V_e = 10$ mL estima-se que terá mais de 2000 kDa.

Por ter sido detetada proteína na fração $V_e = 10$ mL, o polissacárido de maior dimensão é possivelmente um complexo β -glucano-proteína ou um proteoglicano ou ter sido co-eluído com proteínas que se encontravam livres na fração FKOH.

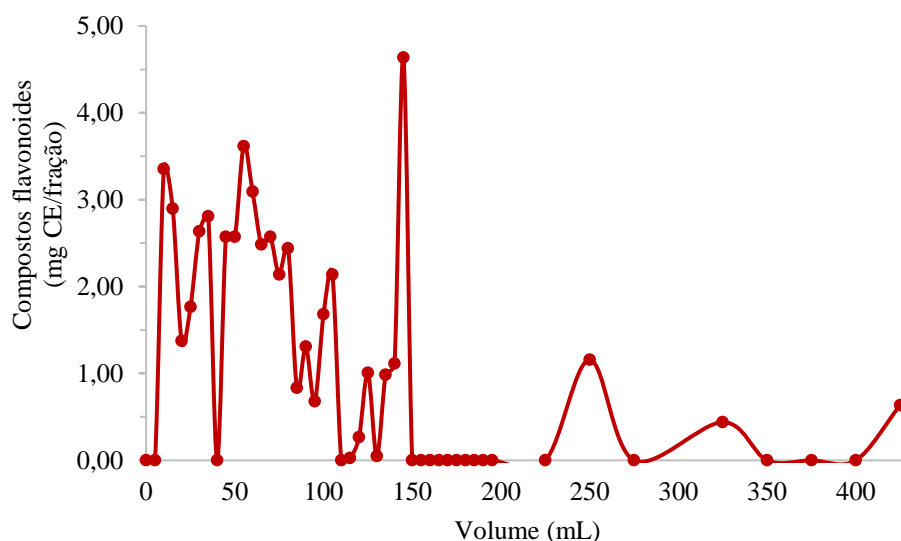


Figura 33 - Cromatograma do fracionamento do extrato FKOH da amostra G37 em Sephacryl S-300 HR (análise de compostos flavonoides)

Por análise do cromatograma da figura 33, verifica-se a existência de compostos flavonoides em várias frações, sugerindo a presença deste tipo de compostos com diferentes massas molares na fração FKOH de MSE. Apesar de também ter sido realizada a avaliação de compostos fenólicos e de polissacáridos sulfatados, as concentrações determinadas nas frações recolhidas foram muito baixas, o que não permitiu obter os respetivos cromatogramas.

A deteção de flavonoides conduziu à avaliação da atividade antioxidante de algumas frações. Como tal, através do método do radical ABTS, analisaram-se as frações correspondentes a V_e de 10, 60, 105, 145 e 325 mL, para as quais se obtiveram valores de inibição baixos de 3,4 %, 5,1 %, 5 %, 3 % e 2 %, respetivamente.

Os resultados apresentados nos gráficos das figuras 23 e 26 são concordantes com os das figuras 30 e 32, uma vez que no cromatograma da figura 32 há uma maior deteção de polissacáridos e proteínas do que no cromatograma da figura 30 e nas figuras 23 e 26 verifica-se que a fração FKOH da amostra G37 tem maior conteúdo nestas moléculas do que a fração MAE da mesma amostra.

Os rendimentos calculados para os diferentes tipos de moléculas estão resumidos na tabela que se segue.

Tabela 9 - Rendimentos obtidos por fracionamento do extrato FKOH de café por cromatografia se exclusão molecular

Moléculas doseadas	Massa total frações doseadas (mg)	Massa inicialmente aplicada (mg)	Rendimento (%)
Polissacáridos neutros	301,98	334,89	90,2
Polissacáridos sulfatados	4,13	8,09	51,0
β-(1,3)-glucanos	0,68	0,16	ND
Proteínas	2,60	3,04	85,5
Flavonóides totais	53,83	36,47	ND
Fenólicos totais	2,53	3,85	65,6

ND – Não determinado

Na tabela 9, à semelhança do que se verificou nos resultados apresentados na tabela 8, não se calculou o rendimento em β -(1,3)-glucanos, pois a soma das concentrações para as diferentes frações foi superior à da solução aplicada na coluna, obtendo-se um rendimento sem significado. Este resultado pode indiciar a presença de interferentes no extrato que tenham conduzido a uma concentração subestimada de β -(1,3)-glucanos na solução inicial. Tal como na cromatografia do extrato de MAE da amostra G37, o menor rendimento foi obtido na análise de polissacáridos sulfatados, possivelmente devido ao facto de estas biomoléculas se encontrarem em baixas concentrações, inferiores ao seu limite de deteção. A análise para a qual se obteve maior rendimento foi a de polissacáridos neutros, presentes em elevadas concentrações, equiparado ao que se verificou na análise do extrato de MAE da amostra G37.

Uma terceira corrida cromatográfica foi realizada para fracionamento do extrato de MAE da amostra G10. Com base nos resultados obtidos nas cromatografias anteriores do extrato de MAE e de FKOH da amostra G37, identificaram-se as frações com polissacáridos de maior interesse e dosearam-se apenas as frações correspondentes a V_e de 100 a 140 mL (figuras 34 e 35).

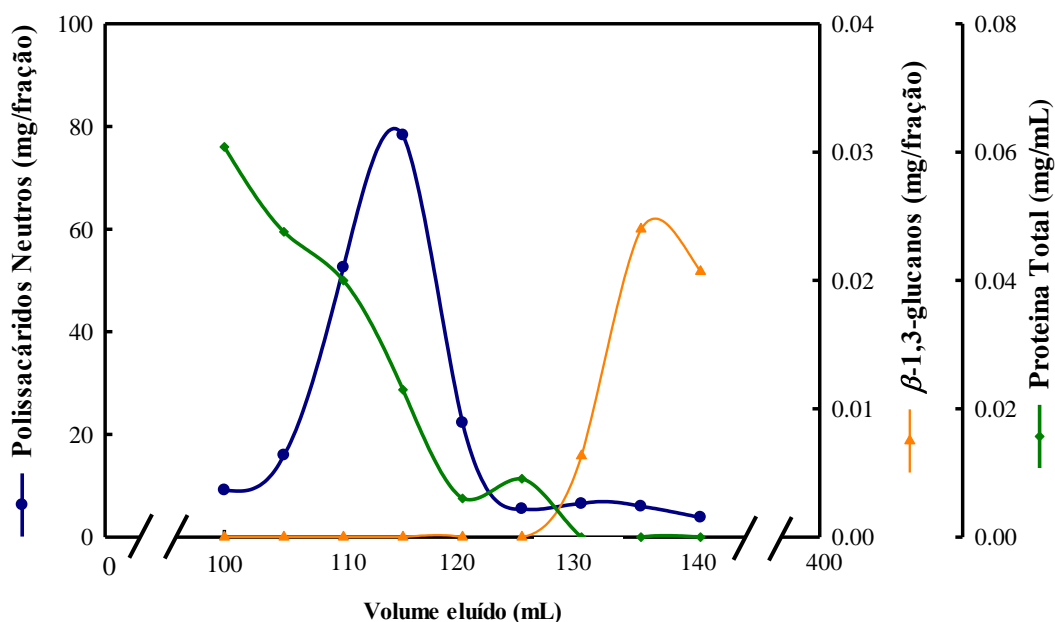


Figura 34 - Cromatograma do fracionamento do extrato de MAE da amostra G10 em Sephacryl S-300 HR (análise de polissacáridos neutros, β -(1,3)-glucanos e proteínas)

Através do cromatograma da figura 34, identificou-se a fração com conteúdo máximo em polissacáridos neutros correspondente a $V_e = 115$ mL (78,3 mg/fração), o que está de acordo com as cromatografias anteriores. Devido ao facto de o volume de eluição ser semelhante, e tendo em conta a calibração antecedente da coluna, a massa molar relativa destes polissacáridos é aproximadamente 40 kDa.

As frações analisadas podem estar contaminadas com proteínas, não tendo sido conseguida a separação total dos componentes presentes nas frações, ou como anteriormente sugerido, os polissacáridos podem existir na forma de complexos proteína-polissacárido, ou de proteoglicanos.

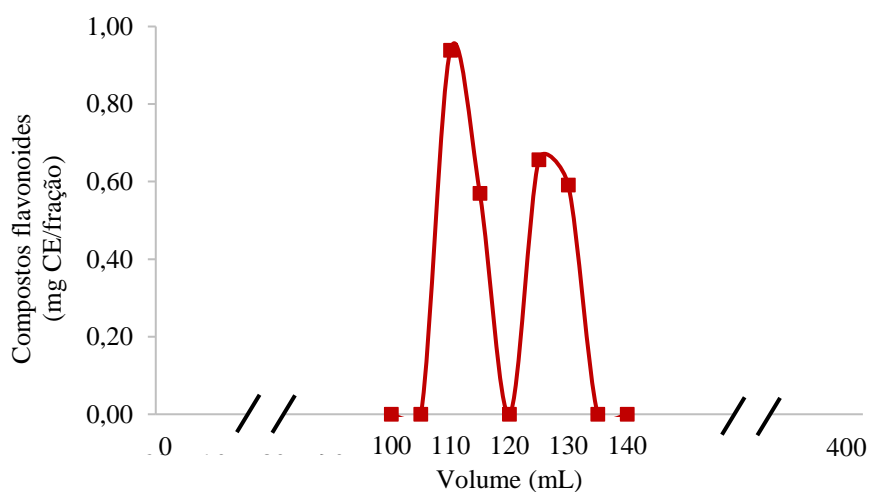


Figura 35 - Cromatograma do fracionamento do extrato de MAE da amostra G10 em Sephacryl S-300 HR (análise de compostos fenólicos e flavonoides)

O baixo conteúdo em compostos fenólicos detetado está na mesma ordem de grandeza do das frações das cromatografias anteriores (dados não apresentados), tendo-se verificado um máximo a $V_e = 125$ mL (0,16 mg/fração). No que respeita ao conteúdo em compostos flavonoides na gama analisada, o máximo foi obtido a 110 mL (0,94 mg/fração). A análise é dificultada pelo facto de se ter verificado elevada instabilidade nos doseamentos das frações cromatográficas do extrato FKOH da amostra G37, bem como pelo facto de o foco do estudo terem sido as frações mais promissoras em termos de polissacáridos neutros e não de compostos fenólicos e flavonoides – cujo pico de concentração tem sido verificado a volumes de eluição de 150 a 160 mL.

Relativamente ao doseamento do conteúdo em polissacáridos sulfatados, nas frações correspondentes ao volume eluído de 100 a 140 mL, identificou-se um pico de conteúdo máximo a $V_e=130$ mL (0,48 mg/fração). Devido à falta de rigor associada aos doseamentos do método do azul de toluidina, não é possível assegurar que este corresponda a um máximo real da totalidade das frações.

Tendo em conta estes resultados, analisaram-se as frações correspondentes a V_e de 115 (conteúdo máximo em polissacáridos neutros) e 125 mL (conteúdo máximo em compostos fenólicos) através do método do radical ABTS, que apresentaram valores de inibição de 3,3 % e 0,6 %, respetivamente.

Redgwell *et al.* (2002) trabalharam com café verde e com café com diferentes graus de torra, recorrendo também a cromatografia de exclusão molecular com resina *Sephacryl S-300 HR*, para a sua caracterização. Estes autores concluíram que o grão de café verde apresenta um conteúdo de 80-85% em polissacáridos, sendo o restante principalmente proteínas, enquanto o grão torrado tem menor conteúdo em polissacáridos, 42-45%. No referido estudo, detetaram-se polissacáridos de 500 kDa no café verde e de 10-40 kDa no café torrado, verificando-se uma diminuição da massa molar dos polissacáridos com o grau de torra. No presente trabalho, estimou-se um valor de massa molar relativa (M_r) para os polissacáridos detetados aproximadamente de 40 kDa, provavelmente justificado pela temperatura imposta nos métodos de extração aplicados (60 °C e 180 °C), que podem potenciar reações típicas da torra do grão, com impacto nas biomoléculas presentes nos extratos e consequentemente nas frações cromatográficas. Contudo, na análise cromatográfica da fração FKOH da amostra G37, detetou-se um polissacárido de elevada M_r (figura 32), o que pode ser explicado pelo facto de as condições da extração por multi-etapas terem permitido preservar algumas biomoléculas do grão de café verde.

No trabalho desenvolvido por Baú *et al.* (2001), que analisaram grão de café *C. arabica*, foi reportado que as proteínas presentes no café apresentam massas molares na gama dos 48-62 kDa. De acordo com a curva de calibração obtida para a coluna cromatográfica utilizada no presente trabalho, as proteínas detetadas nas corridas cromatográficas dos extratos de MAE e

FKOH da amostra G37 e de MAE da amostra G10 (figuras 30, 32 e 34) apresentam massas molares superiores a 40 kDa, o que é concordante com os resultados de Baú *et al* (2001).

3.5.2. Caracterização parcial de polissacáridos por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

De modo a complementar a caracterização das moléculas detetadas pelos métodos anteriores, realizaram-se espectros FTIR para os extratos mais promissores em compostos bioativos – MAE e FKOH da amostra 37 do café da Gorongosa – bem como para algumas das suas frações cromatográficas (figuras 36 e 37).

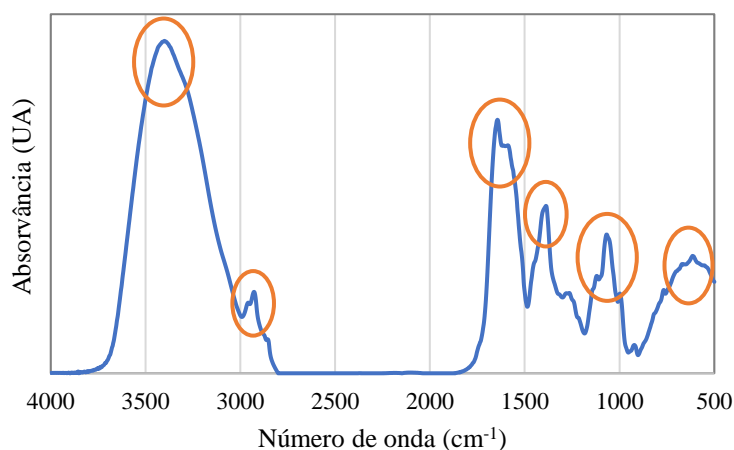


Figura 36 - Espectro FTIR do extrato MAE da amostra 37 do café da Gorongosa

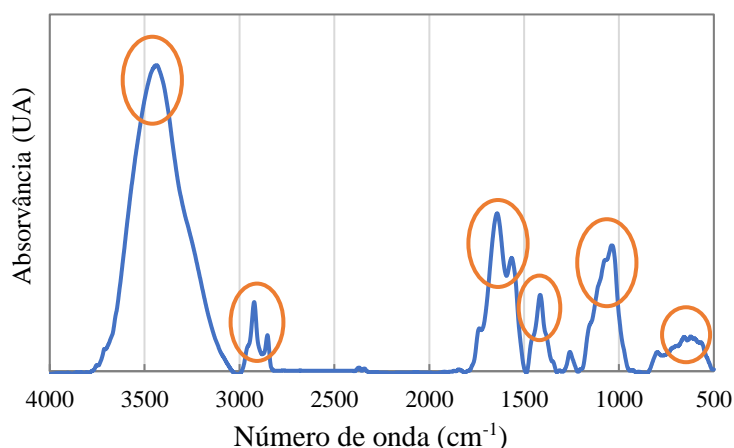


Figura 37 - Espectro FTIR das frações cromatográficas com maior conteúdo em polissacáridos ($V_e = 100, 105$ e 110 mL) obtidas a partir do extrato MAE da amostra 37 do café da Gorongosa

Um dos obstáculos na realização dos espectros FTIR foi a pouca quantidade de amostra sólida disponível, o que afetou os resultados.

Mesmo assim, nos espectros presentes nas figuras 36 e 37 é possível identificar seis bandas principais nos mesmos intervalos de número de onda. Entre 3430 e 3370 cm^{-1} encontra-se uma banda correspondente ao grupo hidroxilo, indicando a presença de fenol, polissacáridos ou ácidos carboxílicos e no intervalo de 3000 a 2800 cm^{-1} encontra-se uma banda associada à vibração de alongamento da ligação C-H. A 1635 cm^{-1} identifica-se outra banda característica de grupos carbonilo. As bandas identificadas de 1380 a 1400 cm^{-1} podem estar associadas a ácidos clorogênicos devido às suas ligações éster C-O-C e deformação angular das ligações OH. Estas bandas podem estar também relacionadas com a vibração de deformação simétrica da ligação C-H. O sinal detetado entre 1100 e 900 cm^{-1} indica a presença de hidratos de carbono, enquanto o detetado abaixo de 700 cm^{-1} sugere a presença de polissacáridos com conformação β (Ballasteros *et al.*, 2017; Fernandes, 2022; Pandey *et al.*, 1997).

Uma vez que os espectros presentes nas figuras 37 e 38 são bastante semelhantes, apresentando as mesmas bandas, é possível concluir que as frações isoladas por cromatografia do extrato MAE da amostra G37 apresentam uma composição semelhante ao extrato inicial, portanto, a corrida cromatográfica não separou de forma eficaz as biomoléculas presentes neste extrato.

De seguida, são apresentados os espectros FTIR obtidos para o extrato FKOH da amostra G37 e respetiva fração cromatográfica com maior conteúdo em polissacáridos.

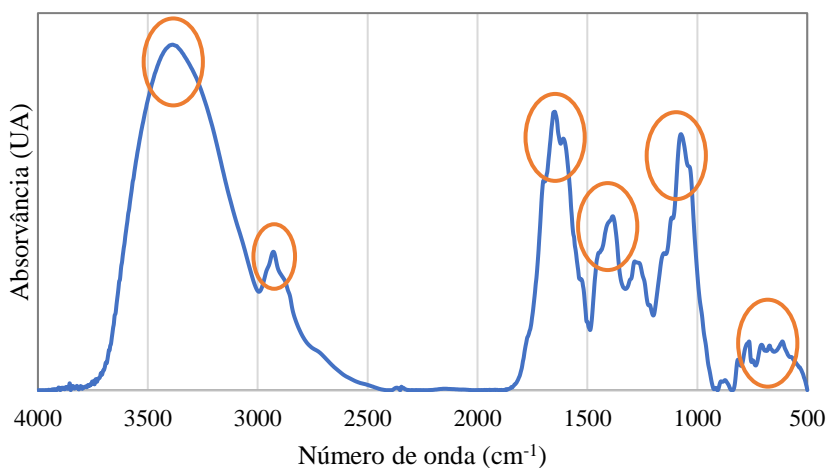


Figura 38 - Espectro FTIR do extrato FKOH da amostra 37 do café da Gorongosa

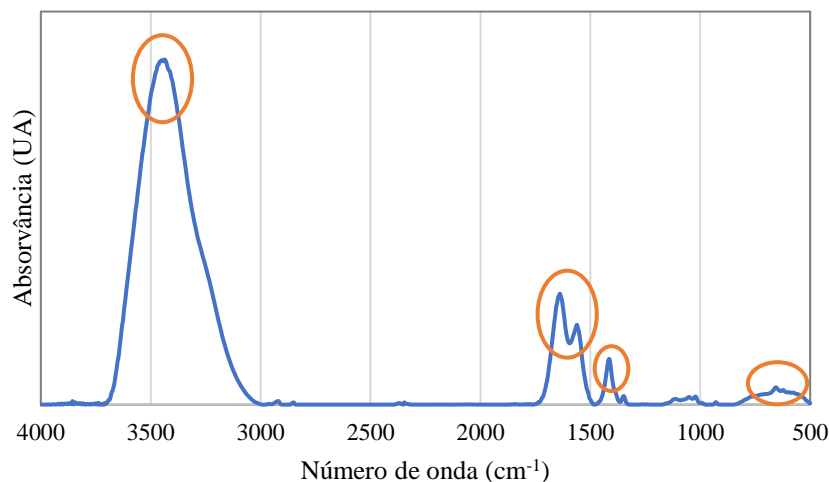


Figura 39 - Espectro FTIR das frações cromatográficas com maior conteúdo em polissacáridos ($V_e = 110$ e 115 mL) obtidas a partir do extrato FKOH da amostra 37 do café da Gorongosa

Comparando os espectros presentes nas figuras 38 e 39 é possível identificar algumas bandas em comum e com os espectros das figuras 36 e 37 nomeadamente entre 3430 e 3360 cm^{-1} , onde se encontra uma banda correspondente a um grupo hidroxilo, que indica a presença de fenol, polissacáridos ou ácidos carboxílicos. No espectro da figura 38, identifica-se também uma banda na zona dos 3000 a 2800 cm^{-1} correspondente à vibração de alongamento da ligação C-H, que não se identifica no espectro da figura 40. No intervalo entre 1640 e 1630 cm^{-1} , encontra-se novamente uma banda típica de grupos carbonilo, no entanto, comparando esta banda com a banda presente no intervalo de 3430 a 3360 cm^{-1} , existe uma grande diferença em termos de intensidade, face à mesma comparação no espectro obtido para o extrato FKOH e a fração selecionada após a sua cromatografia. Esta diferença de intensidade verifica-se também na banda presente entre 900 e 1100 cm^{-1} , característica de hidratos de carbono, que no espectro da fração cromatográfica é quase inexistente. No espectro da figura 39 identifica-se também uma banda a 1375 cm^{-1} atribuída à presença de ácidos clorogénicos devido às suas ligações éster C-O-C e deformação angular das ligações OH ou à vibração de deformação simétrica da ligação C-H. Por último, o sinal detetado abaixo de 700 cm^{-1} típico de polissacáridos com conformação β é bastante notório no espectro do extrato FKOH, sendo quase inexistente no espectro da fração cromatográfica (Ballesteros *et al.*, 2017; Fernandes, 2022; Pandey *et al.*, 1997).

Estas diferenças levam à conclusão de que se verificou de facto uma separação dos componentes presentes no extrato de FKOH da mostra G37 durante a corrida cromatográfica.

Nos espectros dos extratos de MAE e FKOH (figuras 36 e 38), identificaram-se bandas em números de onda semelhantes, indicando uma composição idêntica.

Ballesteros, *et al.* (2017) trabalharam com borras de café e identificaram bandas principais nas mesmas zonas das que foram detetadas nos espectros obtidos no presente trabalho. A números de onda entre 3600 e 3200 cm^{-1} , verificou-se uma banda correspondente ao grupo hidroxilo, e entre 3000 e 2800 cm^{-1} outra banda atribuída à vibração de alongamento da ligação C-H. Identificou-se também uma banda na zona de 1500 a 1700 cm^{-1} associada à presença de grupos carbonilo, à deformação na lenhina e à presença de ácidos clorogénicos e cafeína. A 1374 cm^{-1} identificaram uma banda relacionada com a vibração da ligação C-H. Foram ainda detetadas bandas a 1039 e 1140 cm^{-1} atribuídas à presença de ligações C-O de piranoses, que não foram visíveis no presente trabalho. Entre 1191 e 920 cm^{-1} foi reportada uma banda característica de polissacáridos, correspondente a vibrações no anel, bem como a vibrações dos grupos C-OH e C-O-C – a menor intensidade desta banda no espectro da figura 39 indica a quebra de ligações nos polissacáridos inicialmente presentes. Por último, entre 778 e 884 cm^{-1} encontrou-se uma banda atribuída à presença de ligações glicosídicas α e β , relacionadas com polissacáridos constituídos por resíduos com esse tipo de conformações.

3.5.3. Análise de hidratos de carbono por cromatografia líquida de alta eficiência

Os extratos de MAE das amostras G10 e G37 não-hidrolisados e os extratos hidrolisados com ácido sulfúrico ou com ácido trifluoroacético, de acordo com o procedimento descrito no subcapítulo 2.2.5.3, foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Adicionalmente, todas as frações obtidas por extração por multi-etapas da amostra G37 foram submetidas ao mesmo estudo. A fração FKOH da amostra G37 foi liofilizada e realizou-se uma hidrólise ácida com 20 mg do pó obtido, sendo o restante dissolvido numa concentração de 7,4 mg/mL em água Milli-Q. A fração FW1 da amostra G37 foi diluída 1:10 em água Milli-Q, antes de ser aplicada na coluna de HPLC, devido ao pouco volume obtido.

Com a realização das múltiplas análises, pretendeu efetuar-se um estudo comparativo dos vários extratos e também avaliar as diferenças num mesmo extrato com diversos tratamentos (nomeadamente liofilização e hidrólises ácidas).

As corridas cromatográficas foram realizadas em duplicado, apresentando-se apenas um dos cromatogramas de cada ensaio, com uma tabela que inclui uma tentativa de identificação dos picos mais evidentes, tendo por base os respetivos tempos de retenção (t_r) e a sua comparação com os t_r dos padrões. Apresentam-se também as áreas médias desses picos e as concentrações de sacarose, glucose, manose e frutose, calculadas através das curvas de calibração previamente obtidas.

Na figura 40 encontra-se o cromatograma obtido para o extrato de MAE da amostra G10 não hidrolisado e que foi aplicado diretamente após filtração na coluna cromatográfica.

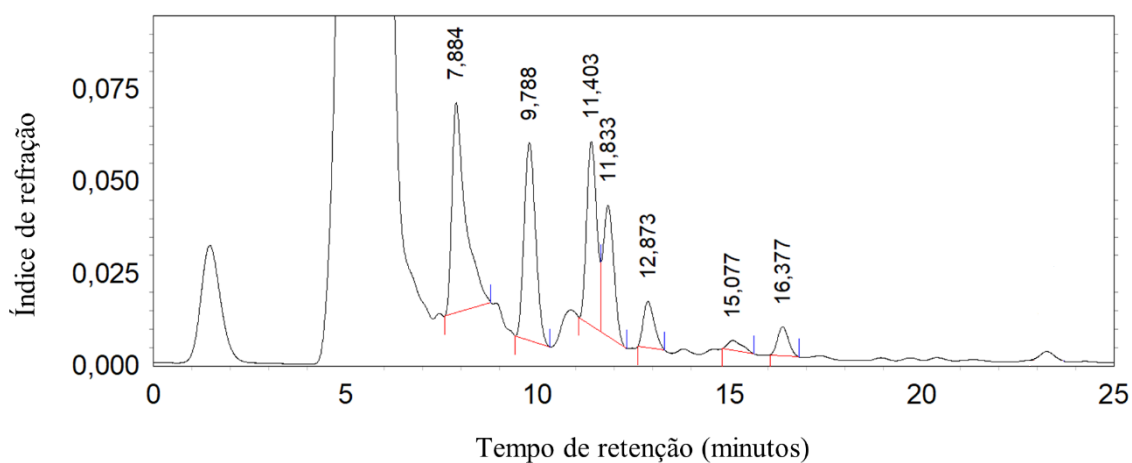


Figura 40 - Cromatograma obtido para o extrato de MAE da amostra G10 (não hidrolisado) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.

Para este extrato são visíveis vários picos, cujas características se encontram resumidas na tabela 10.

Tabela 10 - Análise do cromatograma de MAE G10 não hidrolisado, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis

Glúcido	Tempo médio (minutos)	Área média	Concentração (mg/g amostra)*
Sacarose	7,88	1665162	12,78 ± 2,77
Glucose	9,78	1099170	6,16 ± 0,07
Frutose	11,40	915484	5,49 ± 0,05
Arabinose	11,83	678132	ND
Ribitol	12,87	261153	ND
Sorbitol	15,08	47142	ND
Ribose	16,37	115809	ND

*Valores médios ± DP (n=2); ND – não determinado

Nos cromatogramas obtidos identificaram-se picos com tempos de retenção característicos dos compostos assinalados a cinzento, no entanto não foram encontrados estudos que identifiquem estes compostos no grão de café verde.

Devido à semelhança estrutural de certos glúcidos e à proximidade dos seus tempos de retenção, o pico com t_r de 11,83 minutos tanto pode ser atribuído à arabinose, como à fucose ou à xilose, enquanto o de 12,87 minutos pode indicar a presença de ribitol ou glicerol, e o de 15,08 minutos pode corresponder a sorbitol ou a xilitol (Waters Corporation, 2017). Tendo em conta as características do grão de café, na tabela anterior são apresentados dos vários glúcidos possíveis

para os tempos de eluição obtidos, os que têm maior probabilidade de existirem na amostra. Este critério aplicou-se também aos restantes ensaios.

No extrato de MAE G10, não hidrolisado, a sacarose encontra-se em concentração superior aos restantes glúcidos, verificando-se também a existência de monossacáridos como glucose e frutose.

No que respeita ao mesmo extrato (MAE G10) hidrolisado com ácido sulfúrico (66,7 mg/mL), o perfil cromatográfico correspondente revelou áreas de picos muito baixas, o que inviabilizou a análise da sua composição. Assim, preparou-se uma solução do mesmo extrato mais concentrada (500 mg/mL), tendo-se obtido o cromatograma na figura 41.

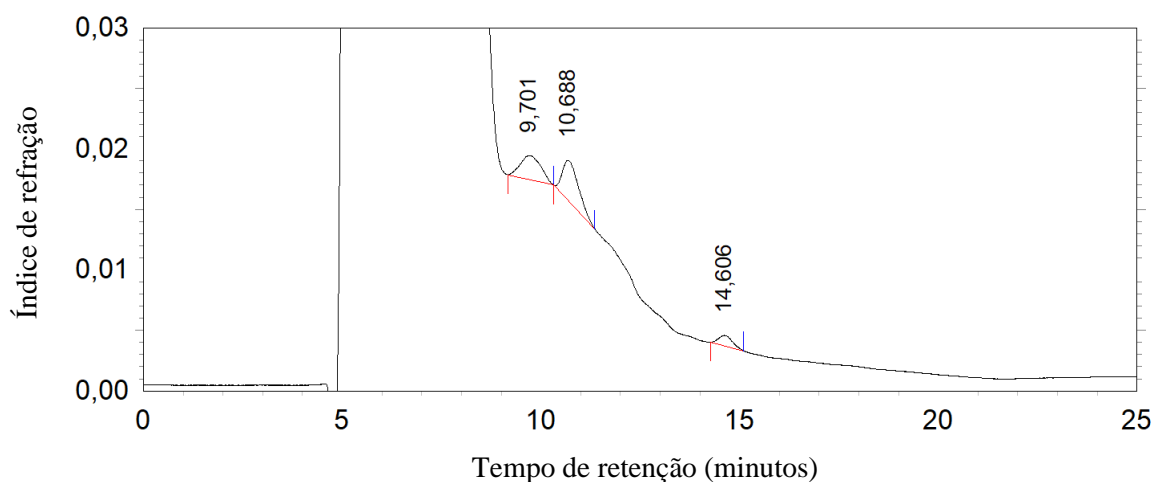


Figura 41 - Cromatograma obtido para o extrato de MAE da amostra G10 (hidrolisado com ácido sulfúrico e preparado a 500 mg/mL) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.

Através do cromatograma presente na figura 41, verifica-se que a concentração de amostra injetada na coluna satura a frente de solvente e os picos de interesse são bastante diminutos. No entanto, embora os glúcidos não sejam quantificáveis, através dos tempos de retenção, pode concluir-se que esta amostra contém glucose ($t_r=9,7$ minutos) e manose ($t_r=10,6$ minutos).

Devido ao insucesso da análise do extrato hidrolisado com ácido sulfúrico, analisou-se o mesmo extrato, mas hidrolisado com ácido trifluoroacético (TFA) e aplicado diretamente após filtração (figura 42 e tabela 11).

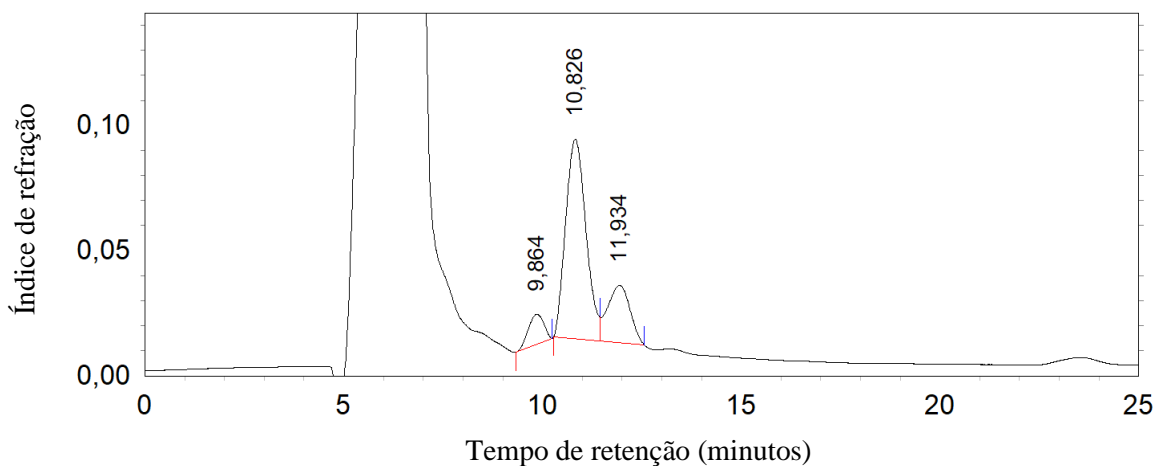


Figura 42 - Cromatograma obtido para o extrato de MAE da amostra G10 (hidrolisado com TFA) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.

Tabela 11 – Análise do cromatograma de MAE G10, hidrolisado com TFA, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.

Glúcido	Tempo médio (minutos)	Área média	Concentração (mg/g amostra)*
Glucose	9,86	334759	1,88 ± 0,08
Manose	10,82	2827424	21,65 ± 0,09
Arabinose	11,93	855654	ND

*Valores médios ± DP (n=2); ND – não determinado

Como seria esperado, este extrato não possui uma composição tão complexa como o seu análogo não hidrolisado, notando-se a ausência de sacarose e a sua substituição por glucose, produto da hidrólise ácida. Desta hidrólise, deveria obter-se também frutose, no entanto, esta não é identificada. Apesar de não ter sido identificada no extrato não hidrolisado, neste extrato identificou-se manose, já previamente identificada em amostras de café torrado por Poisson *et al.* (2017).

Posteriormente, analisou-se o extrato de MAE da amostra G37, não hidrolisado, aplicado diretamente na coluna, após filtração. O cromatograma obtido encontra-se na figura 43.

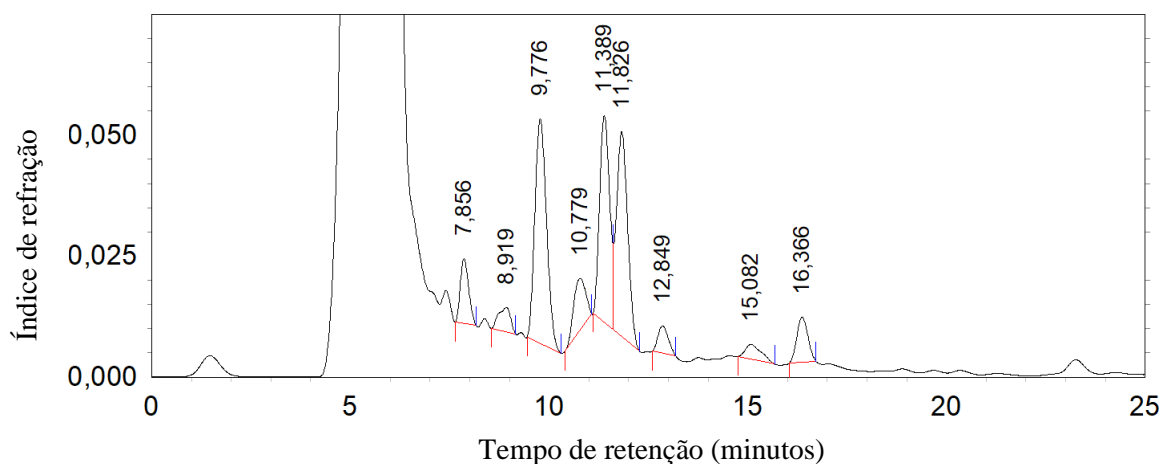


Figura 43 - Cromatograma obtido para o extrato de MAE da amostra G37 (não hidrolisado) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.

Embora a linha de base deste cromatograma apresente algumas interferências, foi possível identificar os picos mais evidentes, os quais estão caracterizados na tabela 12.

Tabela 12 - Análise do cromatograma de MAE G37, não hidrolisado, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.

Glúcido	Tempo médio (minutos)	Área média	Concentração (mg/g amostra)*
Sacarose	7,85	196081	ND ^{a)}
Lactulose	8,92	106297	ND
Glucose	9,78	938685	5,84 ± 0,05
Manose	10,78	229915	1,96 ± 0,01
Frutose	11,39	762422	5,08 ± 0,02
Arabinose	11,83	833430	ND
Ribitol	12,85	112052	ND
Sorbitol	15,08	86541	ND
Ribose	16,37	180568	ND

* Valores médios ± DP (n=2); ND – não determinado

^{a)} Concentração não determinada, uma vez que o segundo ensaio realizado para esta amostra produziu um cromatograma no qual os dois primeiros picos não foram separados.

Este extrato apresenta uma composição semelhante ao extrato de MAE da amostra G10 não hidrolisado (figura 40), com as diferenças de ter um conteúdo bastante menor em sacarose e apresentar manose. Os conteúdos em glucose e frutose são da mesma ordem de grandeza em relação aos verificados no extrato da amostra G10, no entanto, as áreas dos picos relativos à arabinose e sorbitol são superiores. Estas evidências podem indicar degradação da sacarose ao longo dos procedimentos de extração e preservação do extrato – a extração por MAE da amostra

G37 foi efetuada meses antes da extração da amostra G10 – mas podem também ser atribuídas ao próprio grão, que foi produzido a uma altitude superior. De referir também, a incerteza que pode estar associada à determinação de sacarose no extrato de MAE da amostra G10 (figura 40 e tabela 10), devida à sobreposição do pico desse dissacárido com os de outros compostos e que se traduz numa menor resolução dos mesmos. Ainda no cromatograma do extrato de MAE da amostra G37 (figura 43), é identificado um pico a 8,92 minutos, que para a coluna utilizada, é o tempo de retenção característico da lactulose, hidrato de carbono simples não detetável nos restantes cromatogramas, nem descrito por outros autores em amostras de grão verde de café (Cassamo *et al.*, 2022). Apesar de Cassamo *et al.* (2022) não terem verificado variações consistentes dos efeitos da altitude e do nível de sombreamento de cultivo da planta do café no teor de hidratos de carbono solúveis no grão verde da Gorongosa, obtiveram conteúdos de sacarose muito idênticos para as condições de sombreamento moderado a 650 m e a 935 m, ainda assim, ligeiramente superiores para a menor altitude. Da comparação dos resultados do presente trabalho com os obtidos por estes autores, conclui-se que a concentração de sacarose obtida é substancialmente inferior e que as concentrações de glucose e frutose são mais elevadas, o que pode sugerir, conforme anteriormente referido, uma degradação da sacarose nos seus monossacáridos constituintes, durante o período de armazenamento e/ou procedimento de extração ou dever-se a outros factores, como o facto das amostras serem de colheitas distintas.

Tal como obtido para o extrato hidrolisado de MAE da amostra G10, o extrato MAE da amostra G37 hidrolisado com ácido sulfúrico e preparado a 66,7 mg/mL originou cromatogramas de difícil interpretação, com linhas de base instáveis e picos com áreas muito baixas. A análise de uma concentração superior deste extrato hidrolisado (500 mg/mL) também não foi bem conseguida (figura 44).

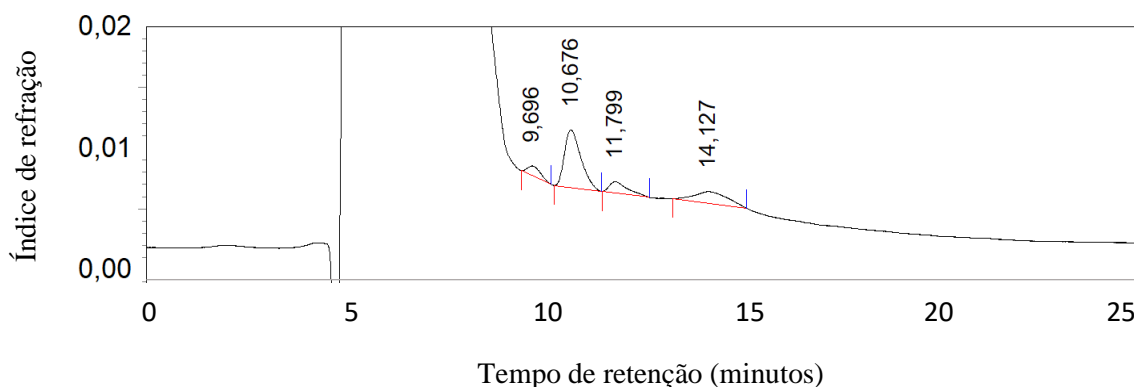


Figura 44 - Cromatograma obtido para o extrato de MAE da amostra G37 (hidrolisado com ácido sulfúrico, preparado a 500 mg/mL) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.

Apesar de se verificar no cromatograma a saturação da frente de solvente e novamente áreas de picos muito diminutas, através dos tempos de retenção é possível concluir que esta

amostra apresenta glucose ($t=9,696$ minutos) e manose ($t=10,676$ minutos). O pico eluído a 11,799 minutos poderá corresponder a arabinose, fucose ou xilose e o pico de 14,13 minutos, nesta coluna, para um caudal de 0,5 mL/min corresponde ao tempo de eluição do etanol (Waters Corporation, 2017), o que para estes ensaios é improvável, por não ter sido utilizado este solvente nas amostras em análise.

De modo semelhante ao procedimento adotado para a amostra G10, o extrato de MAE da amostra G37 foi hidrolisado com TFA e foi aplicado diretamente na coluna cromatográfica, após filtração, tendo-se obtido o cromatograma da figura 45.

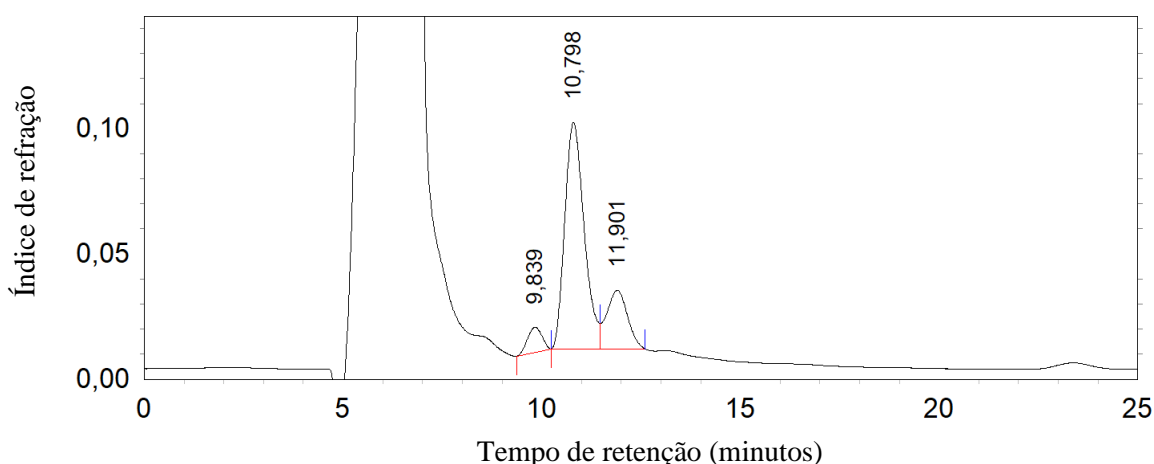


Figura 45 - Cromatograma obtido para o extrato de MAE da amostra G37 (hidrolisado com TFA) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.

Este perfil cromatográfico é muito idêntico ao obtido para o extrato de MAE G10 hidrolisado com TFA (figura 42), tendo permitido a quantificação dos glúcidos simples eluídos (tabela 13).

Tabela 13 – Análise do cromatograma de MAE G37, hidrolisado com TFA, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.

Glúcido	Tempo médio (minutos)	Área média	Concentração (mg/g amostra)*
Glucose	9,83	246389	1,53 ± 0,06
Manose	10,80	3074285	26,16 ± 0,01
Arabinose	11,90	466248	ND

*Valores médios ± DP (n=2); ND – não determinado

Novamente, a diferença da composição do extrato hidrolisado relativamente ao mesmo extrato não hidrolisado, é notável. O extrato MAE não hidrolisado da amostra G37 revelou uma composição mais complexa e um conteúdo em sacarose muito baixo (figura 43), enquanto no extrato hidrolisado, como expectável, não se identifica sacarose, sugerindo a sua hidrólise completa. No extrato tratado com TFA verifica-se um aumento da concentração da manose e um

decréscimo da concentração da arabinose, com uma área de pico reduzida sensivelmente para metade, face à obtida para o extrato não hidrolisado.

A fração FKOH obtida através de extração por multi-etapas da amostra G37 foi analisada em quatro condições: diretamente, liofilizada, após hidrólise com ácido sulfúrico e após hidrólise com TFA.

O cromatograma obtido para a análise da fração diretamente aplicada na coluna cromatográfica, após filtração, encontra-se na figura 46 e a caracterização dos picos na tabela 14.

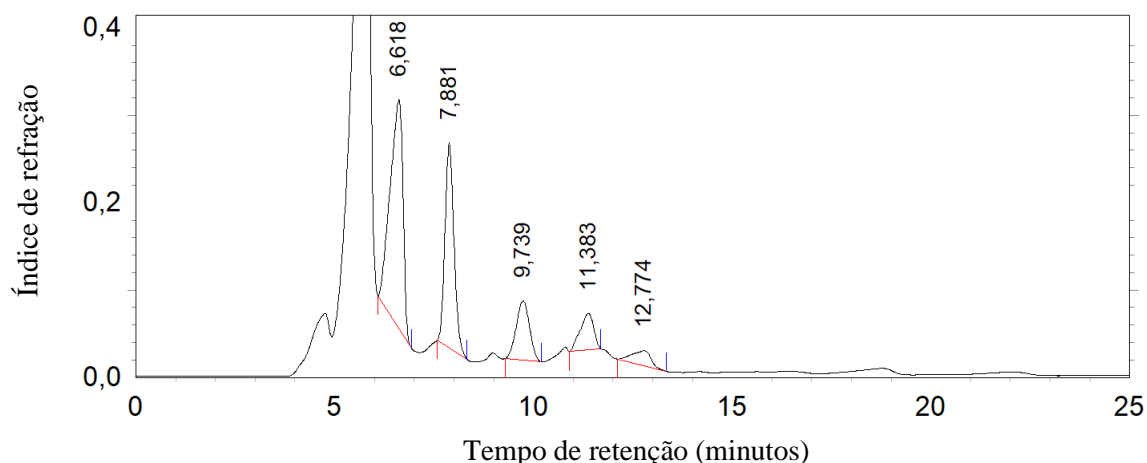


Figura 46 - Cromatograma obtido para a fração FKOH da amostra G37 (não hidrolisada) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.

Tabela 14 - Análise do cromatograma de FKOH G37, não hidrolisada, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.

Glúcido	Tempo médio (minutos)	Área média	Concentração (mg/g amostra)*
Estaquiose	6,63	5883401	ND
Sacarose	7,88	3754175	13,28 ± 0,31
Glucose	9,74	1504954	3,88 ± 0,29
Frutose	11,38	906473	2,50 ± 0,32
Ribitol	12,84	345777	ND

*Valores médios ± DP (n=2); ND – não determinado

Esta fração é menos complexa do que os extratos não hidrolisados de MAE, apresentando menor conteúdo dos monossacáridos glucose e frutose, no entanto, tem maior conteúdo em sacarose. Outra diferença evidente, é que apresenta estaquiose, um oligossacárido composto por galactose, glucose e frutose e mencionado também no trabalho desenvolvido por Poisson *et al.* (2017).

Parte desta fração foi liofilizada e o sólido recuperado foi analisado após dissolução em água Milli-Q (7,4 mg/mL). O cromatograma obtido apresenta alguns picos em comum com a

fração não liofilizada, no entanto, as áreas bastante menores, não permitiram a quantificação dos hidratos de carbono na fração em estudo. O mesmo foi verificado no cromatograma (não apresentado) da fração FKOH da amostra G37 hidrolisada com ácido sulfúrico e preparada a 66,7 mg/mL, que demonstrou concentrações baixas de glucose e de manose. A análise de uma solução mais concentrada desta amostra (500 mg/mL) também não permitiu obter melhores resultados, devido à saturação da frente de solvente (cromatograma não apresentado).

A fração FKOH de MSE foi ainda hidrolisada com TFA e aplicada na coluna cromatográfica após filtração. O cromatograma obtido encontra-se na figura 47.

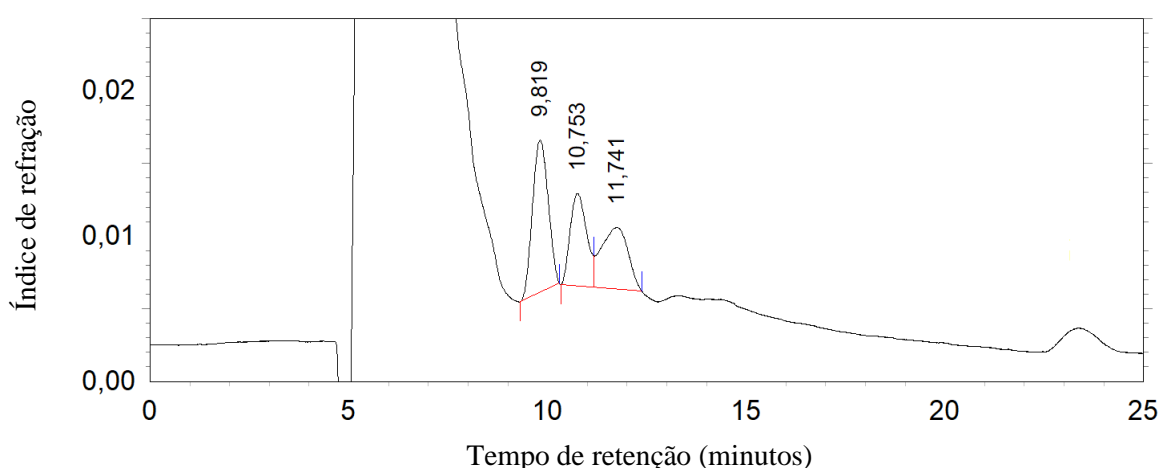


Figura 47 - Cromatograma obtido para a fração FKOH da amostra G37 (hidrolisada com TFA, aplicada diretamente) por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.

Neste cromatograma, apesar do baixo sinal, é possível identificar três picos principais, cujas características estão resumidas na tabela 15.

Tabela 15 – Análise do cromatograma de FKOH G37, hidrolisada com TFA, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.

Glúcido	Tempo médio (minutos)	Área média	Concentração (mg/g amostra)*
Glucose	9,82	293094	0,76 ± 0,02
Manose	10,76	182048	0,64 ± 0,01
Arabinose	11,76	192046	ND

*Valores médios ± DP (n=2); ND – não determinado

Após hidrólise, não se identifica estaquiose na fração, no entanto, também não se encontram duas das suas oses constituintes – galactose e frutose – e a glucose, embora seja detetada, encontra-se inesperadamente, em menor concentração do que na amostra não hidrolisada. Estas evidências podem ser indício de uma hidrólise demasiado agressiva, que degradou até monossacáridos. Como se verificou após as outras hidrólises, a sacarose está ausente, detetando-se manose e arabinose, apesar de em menores conteúdos comparativamente com os extratos de MAE hidrolisados.

De seguida, foi analisada a fração FW1 obtida por extração por multi-etapas da amostra G37. Devido ao pouco volume desta fração, foi realizada uma diluição de 1:10 da mesma, em água Milli-Q. O cromatograma obtido encontra-se representado na figura 48.

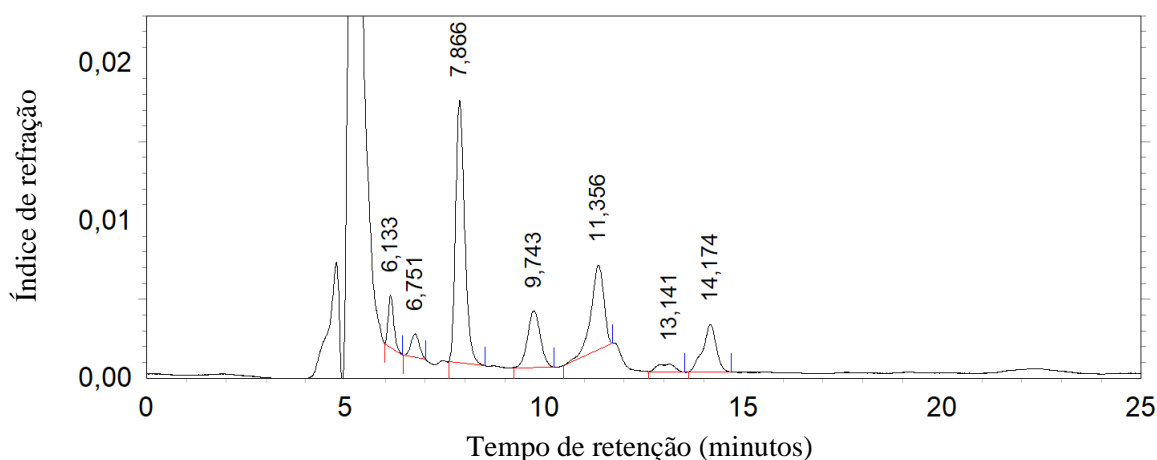


Figura 48 - Cromatograma obtido para a fração FW1 da amostra G37 por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.

A tabela 16 resume as características de cada pico identificado e a que se segue.

Tabela 16 – Análise do cromatograma de FW1 G37, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.

Glúcido	Tempo médio (minutos)	Área média	Concentração (mg/g amostra)*
6-fosfato de glucose	6,15	29628	ND
Estaquiiose	6,75	21068	ND
Sacarose	7,86	256113	0,07 ± 0,00
Glucose	9,73	70893	0,02 ± 0,00
Frutose	11,35	104629	0,02 ± 0,00
Glicerol	13,14	14904	ND
Etanol	14,16	69619	ND

*Valores médios ± DP (n=2); ND – não determinado

Apesar de apresentar uma composição semelhante aos extratos não hidrolisados anteriormente descritos, a fração FW1 exhibe concentrações muito menores de estaquiiose, sacarose, glucose e frutose, o que está de acordo com o menor conteúdo de outros hidratos de carbono (como polissacáridos) detetado face aos conteúdos das restantes frações (figura 23). Contrariamente ao que seria expectável, os resultados sugerem ainda a existência na fração FW1 de 6-fosfato de glucose, glicerol e etanol. A presença destes três compostos na fração FW1 é inesperada e inconsistente com todos os outros resultados obtidos.

Analisou-se a fração FW2, obtida também por extração por multi-etapas da amostra G37, cujos resultados se encontram na figura 49 e na tabela 17.

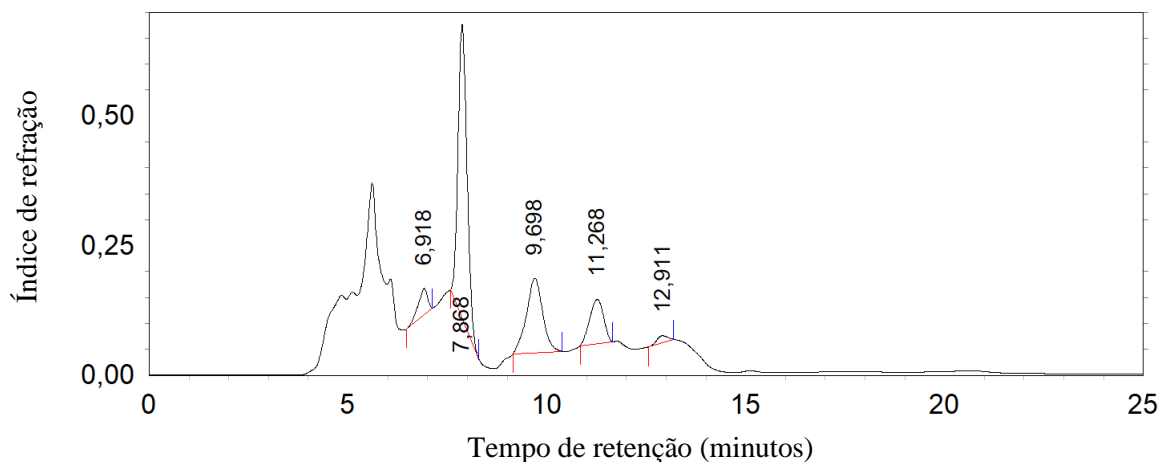


Figura 49 - Cromatograma obtido para a fração FW2 da amostra G37 por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.

Tabela 17 - Análise do cromatograma de FW2 G37, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.

Glúcido	Tempo médio (minutos)	Área média	Concentração (mg/g amostra)*
Estaquiiose	6,90	877093	ND
Sacarose	7,86	8716268	8,49 ± 0,20
Glucose	9,70	3377963	2,40 ± 0,68
Frutose	11,27	2127416	1,62 ± 0,08
Ribitol	12,91	235515	ND

*Valores médios ± DP (n=2); ND – não determinado

Nesta fração, deteta-se igualmente estaquiiose, sacarose, glucose e frutose – constituintes já encontrados nas frações FKOH e FW1 de multi-etapas da amostra G37. As razões entre os conteúdos de sacarose, glucose e frutose mantêm-se semelhantes às das amostras anteriores, sendo o conteúdo em sacarose superior, seguido de conteúdos idênticos de glucose e de frutose. Comparativamente com as restantes amostras, esta também apresenta um conteúdo em polissacáridos superior à fração FW1 mas inferior à fração FKOH e aos extratos de MAE (figura 23).

Posteriormente, injetou-se no sistema de HPLC a fração FHCl obtida através de extração por multi-etapas da amostra G37. Na figura abaixo está representado o cromatograma obtido.

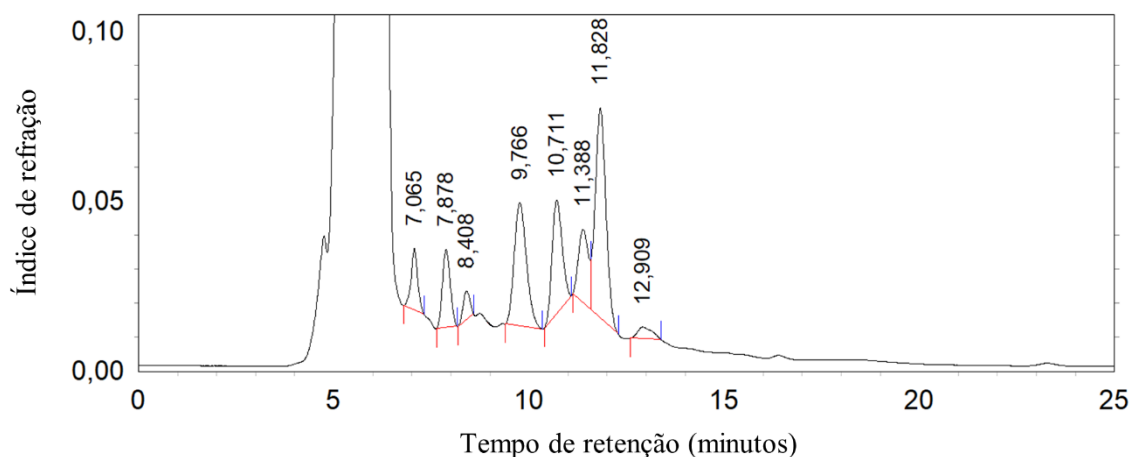


Figura 50 - Cromatograma obtido para a fração FHCl da amostra G37 por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.

Os vários picos identificados neste cromatograma estão resumidos e caracterizados na tabela 18.

Tabela 18 - Análise do cromatograma de FHCl G37, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.

Glúcido	Tempo médio (minutos)	Área média	Concentração (mg/g amostra)*
Maltotriose	7,02	189884	ND
Sacarose	7,87	308471	1,06 ± 0,04
Lactose	8,39	97690	ND
Glucose	9,74	1236555	3,10 ± 1,58
Galactose	10,70	564286	ND
Frutose	11,38	391435	1,05 ± 0,03
Arabinose	11,82	1185565	ND
Ribitol	12,91	76891	ND

*Valores médios ± DP (n=2); ND – não determinado

Relativamente aos picos identificados na figura 50, é de referir que para a coluna utilizada Sugar- Pak 1 com um caudal de 0,5 mL/min, 7 minutos corresponde ao tempo de eluição tanto da maltotriose – constituída por resíduos de glucose – como da rafinose – composta por resíduos de galactose, glucose e frutose – dois trissacáridos possíveis de encontrar neste tipo de amostra (Farah *et al.*, 2019). Já 10,7 minutos é o tempo de eluição comum a galactose, sorbose e ramnose – três glúcidos simples também habitualmente existentes no café (Farah *et al.*, 2019) e 8,39 minutos corresponde à lactose, dissacárido não caraterístico deste tipo de amostras. Em termos de concentrações, ao contrário do que se tem verificado nas frações de MSE G37, a sacarose apresenta menor conteúdo do que a glucose, e a área do pico correspondente à arabinose é a maior que se doseou em todas as amostras, indicando que esta é a que tem maior conteúdo deste monossacárido. A fração FHCl apresenta maior conteúdo total em polissacáridos do que a fração

FW1 e menor do que a fração FW2 (tabelas 16, 17 e 18), o que está de acordo com os doseamentos colorimétricos resumidos na figura 23.

Por último, apresenta-se o cromatograma resultante da análise da fração FNaOH obtida através de extração por multi-etapas da amostra G37.

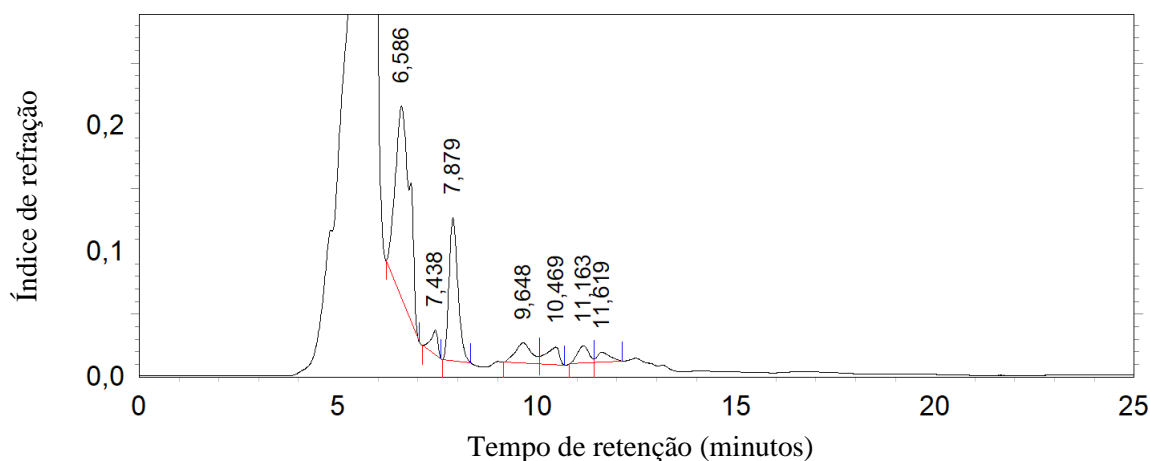


Figura 51 - Cromatograma obtido para a fração FNaOH da amostra G37 por HPLC-RI com coluna Sugar-Pak I, com EDTA de cálcio como eluente e um caudal de 0,5 mL/min.

Na tabela 19 encontram-se as características atribuídas a cada pico identificado.

Tabela 19 - Análise do cromatograma de FNaOH G37, obtido por HPLC-RI e concentrações médias dos glúcidos solúveis.

Glúcido	Tempo médio (minutos)	Área média	Concentração (mg/g amostra)*
Estaquiose	6,58	3828584	ND
Maltotriose	7,40	231294	ND
Sacarose	7,88	1755076	4,71 ± 0,02
Glucose	9,67	564336	1,11 ± 0,027
Galactose	10,36	286476	ND
Frutose	11,17	311385	0,65 ± 0,10
Arabinose	11,62	182883	ND

*Valores médios ± DP (n=2); ND – não determinado

Esta fração apresenta uma composição semelhante à da fração FHCl, no entanto, distingue-se pela quantidade elevada de estaquiose que apresenta, inferior apenas à da fração FKOH não hidrolisada. As razões entre conteúdos de sacarose, glucose e frutose mantêm-se semelhantes às reveladas pelas restantes frações, estando a sacarose em maior quantidade e a glucose e frutose em quantidades idênticas e menores. De acordo com os doseamentos colorimétricos representados na figura 23, a fração FNaOH também apresentou conteúdos de polissacáridos ligeiramente superiores aos da fração FHCl.

Lopes *et al.* (2020) analisaram por HPLC-DAD (cromatografia líquida de elevada eficiência com detetor de fotodiodos) extratos de café torrado comercial, obtidos por técnicas de MAE realizadas a temperatura e pressão elevadas. Nesses extratos, identificaram em maior concentração manose e galactose, seguidas de arabinose, glucose e ramnose. Apesar de, no presente trabalho não ter sido possível determinar as concentrações de todas as moléculas identificadas, em termos qualitativos foram identificados os mesmos glúcidos.

Cassamo *et al.* (2022) analisaram grãos verde de café *Coffea arabica* L. e identificaram sacarose, glucose, frutose e arabinose como principais glúcidos, sendo a sacarose o que se encontrava em maior concentração, e a glucose, frutose e arabinose em concentrações próximas, mas menores, resultados estes que são concordantes com os obtidos no presente estudo, embora estes investigadores tenham obtido conteúdos em sacarose superiores aos obtidos no presente trabalho.

3.5.4. Análise de hidratos de carbono por cromatografia em camada fina

De forma preliminar e de modo a complementar a identificação de hidratos de carbono nos extratos, recorreu-se a técnicas de cromatografia em camada fina (C.C.F.). Todas as frações obtidas por extração por multi-etapas da amostra G37, bem como os extratos de MAE das amostras G10 e G37 não hidrolisados e hidrolisados com TFA, e a fração FKOH da amostra G37 não hidrolisada e hidrolisada foram analisados.

A composição de cada amostra foi avaliada através de C.C.F., utilizando-se padrões de sacarose, frutose, glucose, manose, galactose e sorbose. Testaram-se vários sistemas eluentes, tendo sido selecionado o sistema clorofórmio:ácido acético:água (6:8:1), por ter permitido obter melhores resultados. Após a eluição, as placas foram visualizadas sob radiação UV (254 nm), e depois da aplicação da solução reveladora específica para hidratos de carbono.

Numa fase inicial, foram analisados os extratos de MAE e as frações de MSE (figura 52), tendo-se verificado que os extratos de MAE apresentam composições bastante idênticas, partilhando ainda alguma semelhança com a fração FW2.

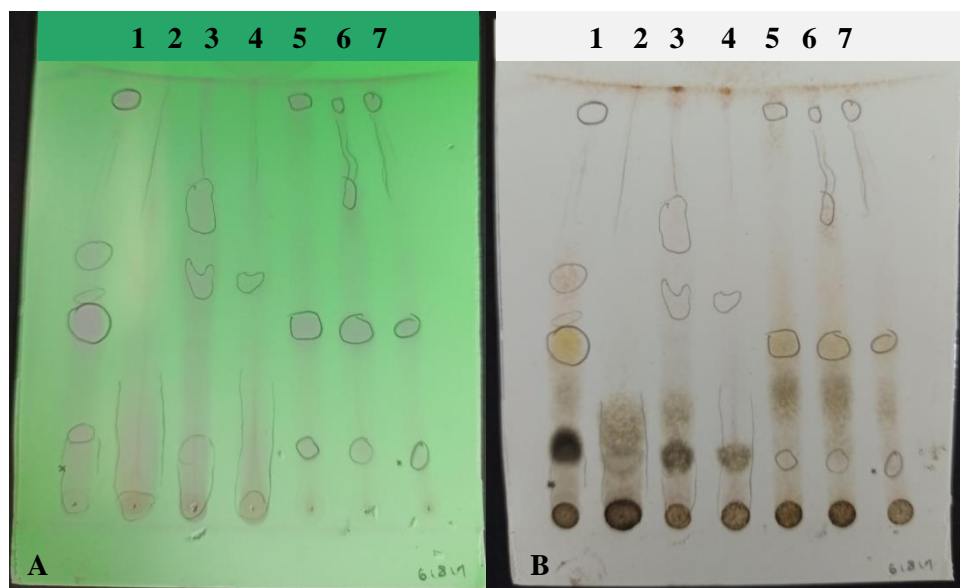


Figura 52 - Resultados de C.C.F. (sistema eluente clorofórmio:ácido acético:água) das frações obtidas por extração por multi-etapas da amostra G37, sob incidência de luz a 254 nm (A) e após aplicação da solução reveladora (B) (1: FW2; 2: FHCl; 3: FKOH; 4: FNaOH; 5: MAE G37; 6: MAE G10; 7: MAE G10 repetição)

Para os extratos de MAE e frações FW2, FKOH e FNaOH, é possível notar que algumas manchas observáveis na figura 52 A não foram acentuadas após o tratamento com a solução reveladora, o que indicia a ausência de hidratos de carbono e a presença de outras biomoléculas.

De modo a avaliar melhor cada extrato, procedeu-se à sua análise em paralelo com padrões. Na figura abaixo, encontram-se os resultados conseguidos para os extratos obtidos por MAE da amostra G10, não hidrolisado e hidrolisado com TFA.

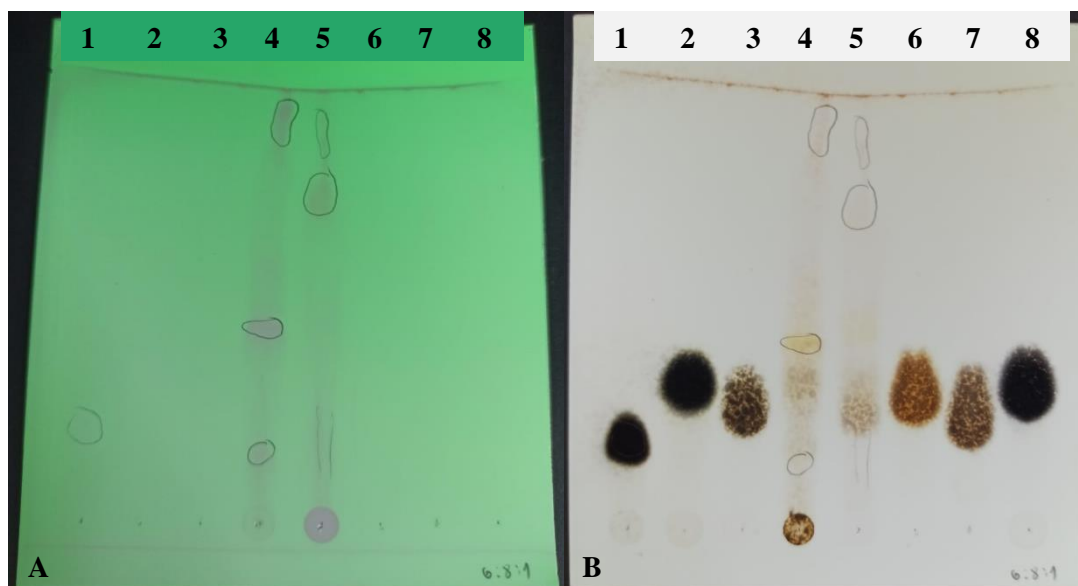


Figura 53 - Resultados de C.C.F. (sistema eluente clorofórmio:ácido acético:água) do extrato de MAE da amostra G10 hidrolisado e não hidrolisado, sob incidência de luz a 254 nm (A) e após aplicação da solução reveladora (B) (1: sacarose; 2: frutose; 3: glucose; 4: MAE G10 não hidrolisado; 5: MAE G10 hidrolisado; 6: manose; 7: galactose; 8: sorbose)

De acordo com os cromatogramas de HPLC-IR obtidos para estas amostras (figuras 40 e 42), era esperado que o extrato de MAE G10 não hidrolisado apresentasse manchas coincidentes com sacarose, glucose e frutose, enquanto o extrato hidrolisado deveria exibir manchas correspondentes a glucose, frutose e manose. No entanto, a baixa concentração dos extratos e as mobilidades semelhantes dos diferentes padrões, dificultam a análise correta dos resultados. Porém, é possível verificar a presença de sacarose no extrato MAE G10 e a sua ausência no extrato hidrolisado, o que indica um sucesso na hidrólise. A segunda mancha do extrato não hidrolisado assinalada poderá ser um hidrato de carbono – uma vez que se acentuou com a aplicação da solução reveladora – mas não corresponde à distância migrada por nenhum dos padrões aplicados. Como esta segunda mancha não se verifica no extrato hidrolisado, é possível que se trate de um dissacárido ou polissacárido que tenha sido hidrolisado. As manchas com maior mobilidade em ambos os extratos, apenas visíveis na figura 52 A, corresponderão não a hidratos de carbono, mas a outras biomoléculas pouco polares. Após a aplicação da solução reveladora é ainda visível uma mancha com mobilidade idêntica à da frutose, que não tinha sido detetada a 254 nm.

Os extratos hidrolisado e não hidrolisado de MAE da amostra G37 foram igualmente analisados por C.C.F. (figura 54).

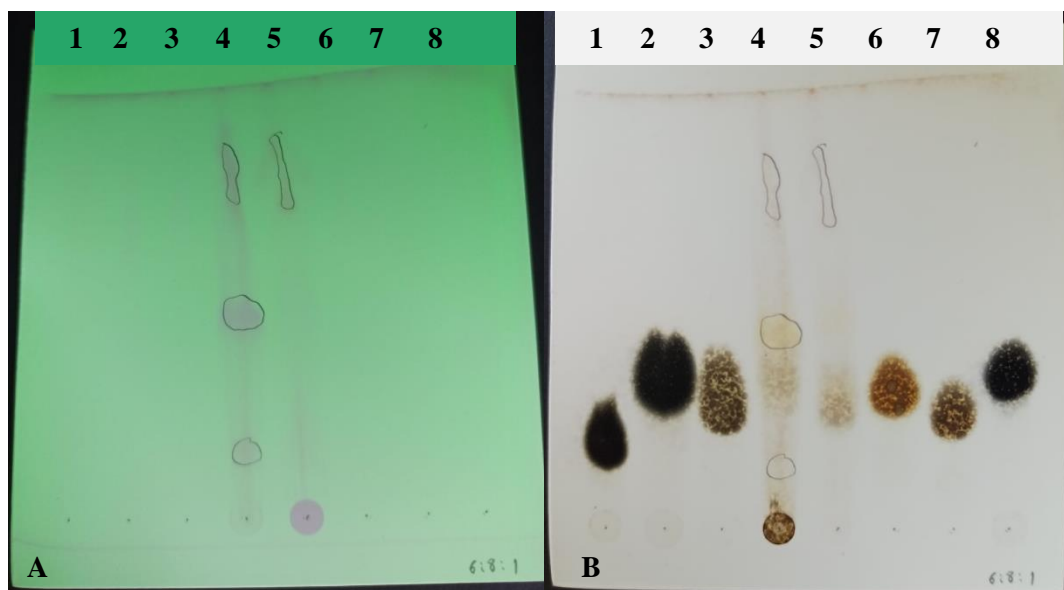


Figura 54 - Resultados de C.C.F. (sistema eluente clorofórmio:ácido acético:água) do extrato de MAE da amostra G37 hidrolisado e não hidrolisado, sob incidência de luz a 254 nm (A) e após aplicação da solução reveladora (B) (1: sacarose; 2: frutose; 3: glucose; 4: MAE G37 não hidrolisado; 5: MAE G37 hidrolisado; 6: manose; 7: galactose; 8: sorbose)

Este ensaio apresenta resultados bastante semelhantes ao anterior, bem como ao da análise conjunta dos extratos (figura 52) e são concordantes com os respetivos resultados de HPLC.

De seguida, foi analisada a fração FKOH obtida por extração por multi-etapas da amostra G37, não hidrolisada e hidrolisada, cujos resultados se encontram na figura 55.

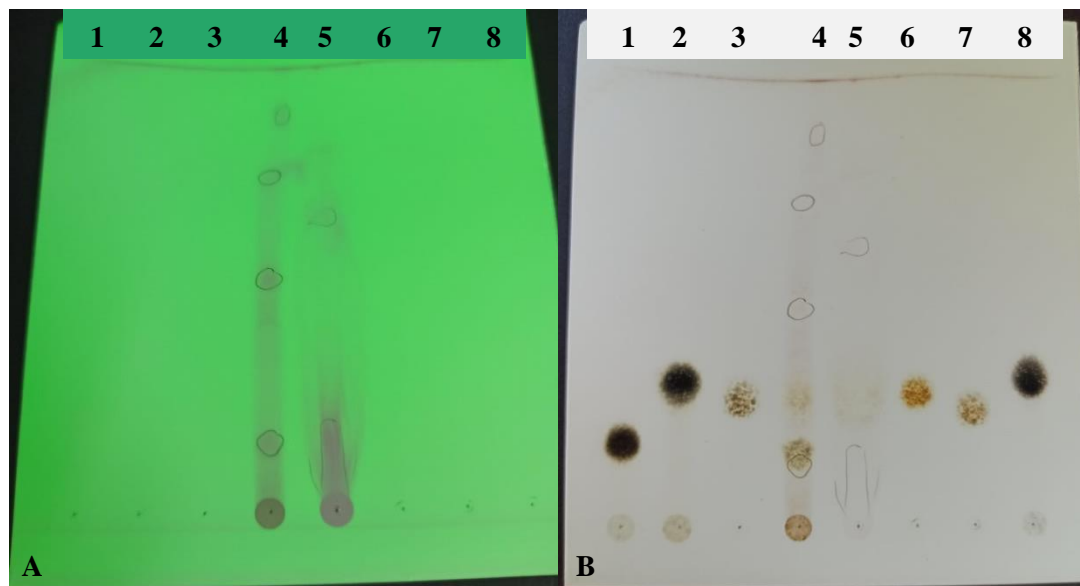


Figura 55 - Resultados de C.C.F. (sistema eluente clorofórmio:ácido acético:água) da fração FKOH obtida por extração por multi-etapas da amostra G37 hidrolisada e não hidrolisada, sob incidência de luz a 254 nm (A) e após aplicação da solução reveladora (B) (1: sacarose; 2: frutose; 3: glucose; 4: FKOH G37 não hidrolisada; 5: FKOH G37 hidrolisada; 6: manose; 7: galactose; 8: sorbose)

Apesar de se terem preparado várias placas para estas amostras, verificou-se sempre bastante arrastamento, que pode ser atribuído a amostras muito concentradas e/ou à presença de constituintes muito polares. Nas placas apresentadas na figura 55, os padrões foram aplicados em menor concentração, o que permitiu avaliar melhor a sua migração. O extrato FKOH não hidrolisado apresenta uma mancha que claramente corresponde à sacarose, que não se verifica no extrato hidrolisado, e que sobressai relativamente a todas as outras manchas marcadas na figura 55. A figura 55 B, revela a existência de um hidrato de carbono em menor concentração e com maior mobilidade do que a sacarose, que poderá corresponder a glucose ou manose.

As últimas três manchas marcadas para o extrato FKOH não hidrolisado na figura 55 A não são visíveis na figura 55 B, o que pode indicar que os respetivos compostos não eram hidratos de carbono. Já o extrato hidrolisado apresenta uma mancha bastante alargada perto da zona de aplicação na figura 55 A, o que pode sugerir a presença de moléculas muito polares, e exhibe apenas uma banda difusa na figura 55 B de maior mobilidade, que pode ser devida ao arrastamento ou à presença de hidratos de carbono simples em baixas concentrações, como glucose, manose ou galactose.

Posteriormente, analisaram-se as frações FW1 e FW2 obtidas através de extração por multi-etapas da amostra G37 e os resultados obtidos encontram-se na figura abaixo.

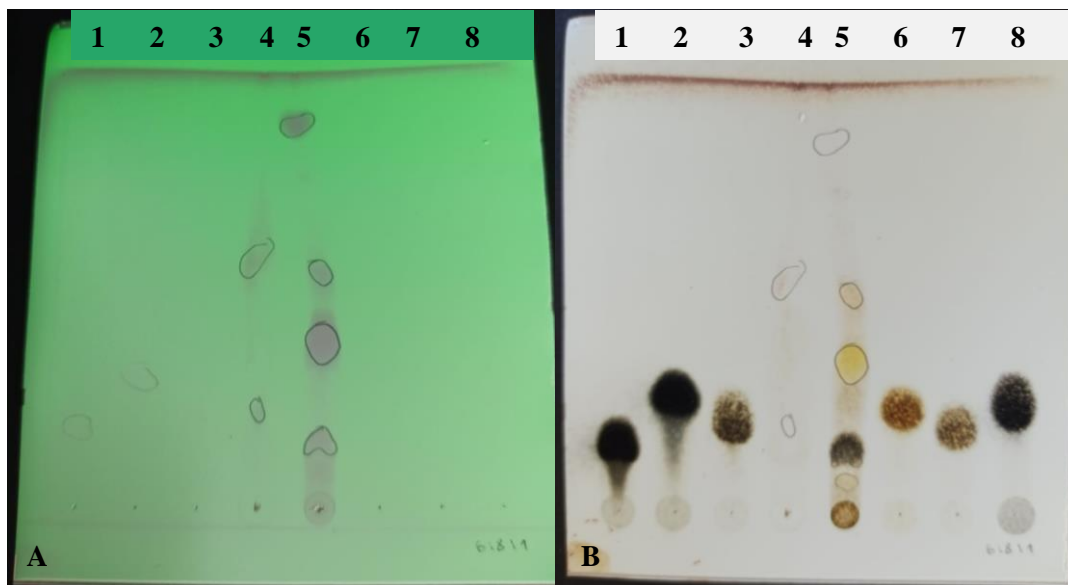


Figura 56 - Resultados de C.C.F. (sistema eluente clorofórmio:ácido acético:água) das frações FW1 e FW2 obtidas por extração por multi-etapas da amostra G37, sob incidência de luz a 254 nm (A) e após aplicação da solução reveladora (B) (1: sacarose; 2: frutose; 3: glucose; 4: FW1 G37; 5: FW2 G37; 6: manose; 7: galactose; 8: sorbose)

Na figura 56 é possível verificar diferenças na capacidade de extração de biomoléculas do primeiro passo de MSE – realizada com água à temperatura ambiente, em contacto com a amostra durante 5 minutos – e do segundo passo desta extração – efetuada com água a 100 °C, durante 3 horas. Como já se tinha verificado tanto nos doseamentos por métodos colorimétricos, como nos resultados obtidos através de HPLC-IR, a fração FW1 apresenta um conteúdo em biomoléculas bastante menor do que as restantes frações. No seu perfil, identificam-se duas manchas distintas, ambas bastante difusas, sendo que apenas a mancha com maior mobilidade é evidenciada pela solução reveladora, indicando a presença de hidratos de carbono menos polares, mas não identificáveis no presente trabalho, uma vez que nenhum dos padrões utilizados apresenta mobilidade semelhante.

No que respeita à fração FW2, na figura 56 A é visível uma primeira mancha que indica a presença de sacarose, uma mancha com elevada mobilidade que corresponde a outro tipo de biomolécula pouco polar (que não hidrato de carbono), e duas manchas intermédias que são posteriormente reveladas (figura 56 B), sendo então possivelmente hidratos de carbono menos polares que qualquer um dos padrões utilizados.

Na figura 57 encontram-se os resultados obtidos na cromatografia das frações FHCl e FNaOH obtidas por extração por multi-etapas da amostra G37.

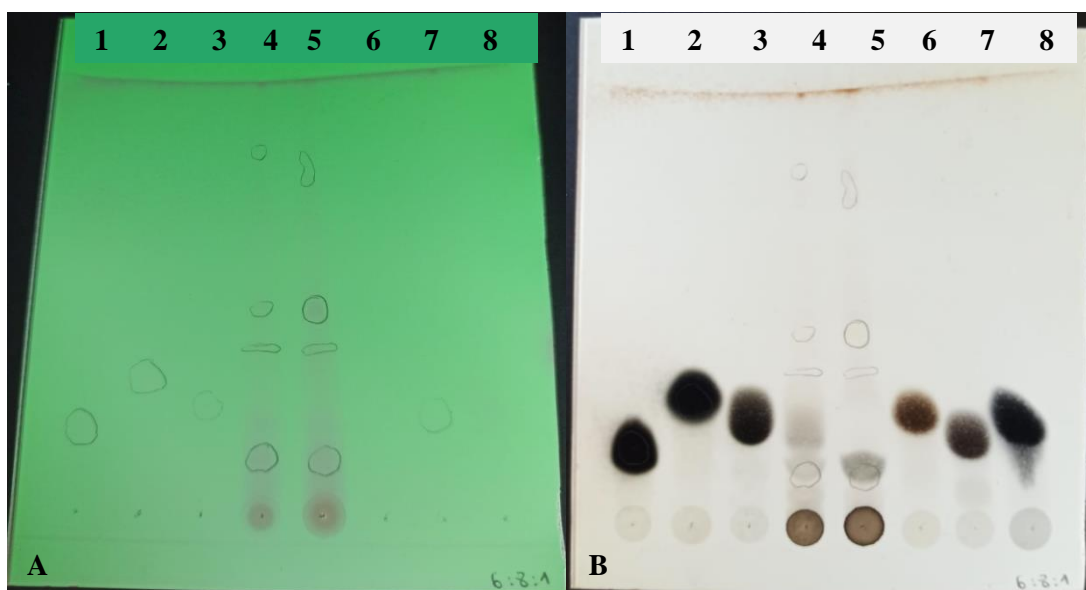


Figura 57 - Resultados C.C.F. (sistema eluente clorofórmio:ácido acético:água) das frações FHCl e FNaOH obtidas por extração por multi-etapas da amostra G37, sob incidência de luz a 254 nm (A) e após aplicação da solução reveladora (B) (1: sacarose; 2: frutose; 3: glucose; 4: FHCl G37; 5: FNaOH G37; 6: manose; 7: galactose; 8: sorbose)

As frações FHCl e FNaOH apresentaram nos doseamentos colorimétricos e na análise por HPLC-IR menores conteúdos em biomoléculas, o que justifica a pouca intensidade das manchas em C.C.F.. Mesmo assim, é possível identificar em ambas as frações sacarose e, possivelmente, galactose ou glucose na fração FHCl. Ambas as frações apresentam três outras manchas sob incidência de luz a 254 nm (figura 57 A), mas como não foram acentuadas com a solução reveladora, não serão hidratos de carbono.

Romdhane *et al.* (2017) analisaram por C.C.F. extratos hidrolisados de borras de café, utilizando o mesmo sistema eluente que foi aplicado no presente trabalho. Estes autores reportaram também dificuldade na diferenciação de alguns padrões aplicados, como glucose, galactose e manose, face à sua semelhança estrutural, mas concluíram, tendo por base outros trabalhos publicados sobre borras de café, que os extratos continham manose e galactose. A escassa bibliografia disponível relativa a extratos de grão verde de café, analisados por C.C.F., dificulta a identificação de hidratos de carbono presentes nos extratos em estudo, no entanto, os resultados obtidos no presente trabalho revelam semelhanças com os publicados por Romdhane *et al.* (2017).

3.5.5. Análise de polissacáridos e proteínas por eletroforese

Um dos métodos de caracterização mais conhecidos e aplicados a biomoléculas é a eletroforese.

Os extratos de interesse – MAE da amostra G10, MAE da amostra G37 e FKOH da amostra G37 – foram selecionados para ensaios eletroforéticos, tendo em vista o estudo de polissacáridos e proteínas. Os resultados obtidos nos ensaios eletroforéticos de polissacáridos encontram-se na figura 58.

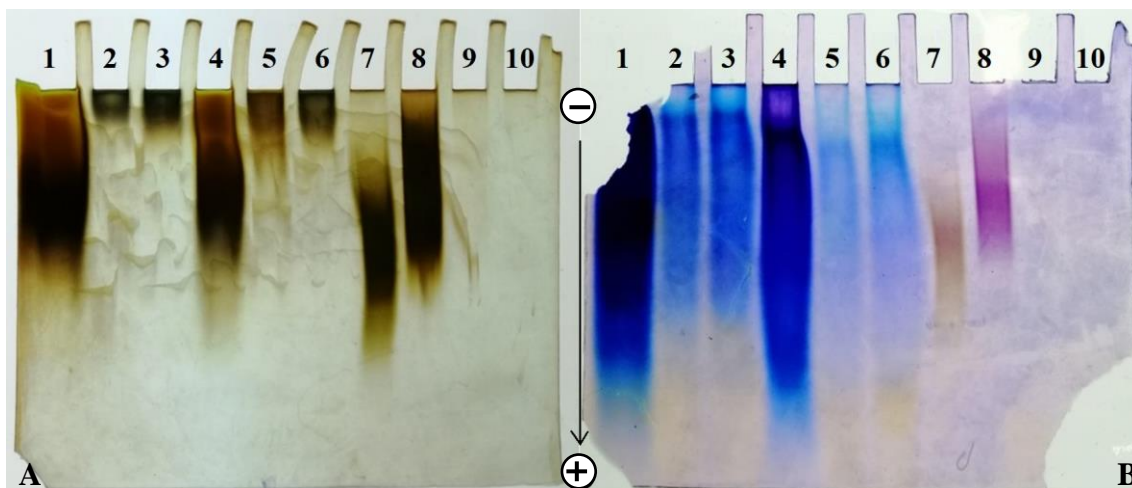


Figura 58 - Géis de poliacrilamida (6%) corados com Alcian blue e nitrato de prata (A) e com corante Stains-All (B) (1: FKOH G37; 2: MAE G37; 3: MAE G10; 4: FKOH G37 f.d. 1:2; 5: MAE G37 f.d. 1:2; 6: MAE G10 f.d. 1:2; 7: heparina da mucosa intestinal suína MR \approx 17 kDa; 8: sal de sódio de sulfato de dextrano MR \approx 40 kDa; 9: dextrano MR \approx 70 kDa; 10: dextrano MR \approx 100 kDa)

Da análise do gel corado com Alcian blue e nitrato de prata (figura 58 A), é possível verificar migração das amostras aplicadas (poços 1 a 8), exceto dos dextransos de Mr \approx 70 kDa e Mr \approx 100 kDa (poços 9 e 10). As amostras não diluídas (poços 1, 2 e 3) e as amostras diluídas com um fator de 1:2 (poços 4, 5 e 6) apresentam como expectável perfis muito semelhantes, notando-se apenas uma pequena diferença nos constituintes dos extratos de MAE que, quando diluídos, aparentam maior mobilidade. Dos resultados visíveis neste gel, é possível concluir que os polissacáridos presentes na fração FKOH apresentam dimensões bastante menores e/ou carga mais negativa quando comparados com os presentes nos extratos de MAE das duas amostras, uma vez que exibem uma distância migratória superior. No entanto, e considerando também os conteúdos em polissacáridos ácidos e polissacáridos sulfatados muito baixos ou inexistentes na fração FKOH (figuras 23 e 24), essa divergência na migração pode dever-se unicamente a diferenças de massas molares. Confrontando os perfis obtidos para a fração FKOH e para os padrões aplicados, conclui-se que, apesar do arrastamento verificado, os polissacáridos presentes nessa fração apresentam uma mobilidade próxima da do sulfato de dextrano de 40 kDa. Devido à reduzida distância de migração no gel, é possível concluir que os polissacáridos presentes nos extratos de MAE das amostras G37 e G10 têm elevadas dimensões,

no entanto, só é viável inferir que apresentam $M_r > 40$ kDa, uma vez que neste trabalho não foi possível obter qualquer banda para os padrões de maior massa molar.

No gel corado com corante *Stains-All* (figura 58 B), verificou-se a migração de todas as amostras aplicadas, exceto dos padrões de dextransos de $M_r \approx 70$ kDa e $M_r \approx 100$ kDa. Neste gel, nota-se uma maior diferença entre o perfis obtidos para os extratos não diluídos e os extratos diluídos 1:2, não só em termos de distância de migração bem como de intensidade das bandas. Surpreendentemente, o perfil de bandas nos poços 4, 5 e 6, sugere a presença de polissacáridos na fração FKOH da amostra G37 de maior dimensão e/ou diferente carga em comparação com os polissacáridos nos extratos de MAE, o que não está de acordo com o verificado no gel corado com *Alcian blue* e nitrato de prata. No entanto, as bandas do extrato de FKOH apresentam maior arrastamento que as dos extratos de MAE, o que pode sugerir uma mistura de mais polissacáridos de diferentes dimensões no extrato de FKOH.

Uma vantagem do método de coloração *Stains-All* é o facto de corar biomoléculas diferentes com tons distintos. Neste trabalho, os perfis correspondentes aos extratos de MAE apresentam uma cor azulada, enquanto os perfis respeitantes ao extrato de FKOH têm um tom azul mais intenso. Por sua vez a banda relativa à heparina apresenta uma coloração acastanhada e a correspondente ao sulfato de dextrano fica corada com um tom roxo.

De acordo com Andrade *et al.* (2018), o corante *Stains-All* aplicado a géis de poliacrilamida demonstrou reprodutibilidade de resultados, corando os mesmos tipos de biomoléculas com tons idênticos em todos os ensaios realizados. Apesar dos polissacáridos analisados por esses autores não se encontrarem no café, os resultados obtidos nesta dissertação (tom azulado, nos poços 2, 3 e também 5 e 6) sugerem a presença de polissacáridos no café com massa e carga semelhantes às do ácido hialurónico. Adicionalmente, a heparina apresenta coloração acastanhada e o sulfato de dextrano é visualizado com tom arroxeadado, tal como o sulfato de dermatan, estudado por esses autores.

Foram também realizados dois ensaios eletroforéticos dirigidos a proteínas, utilizando dois géis de resolução com diferentes porosidades – 12,5 % e 17 % - sendo apresentado o resultado do gel de porosidade 17 %, pela sua definição superior.

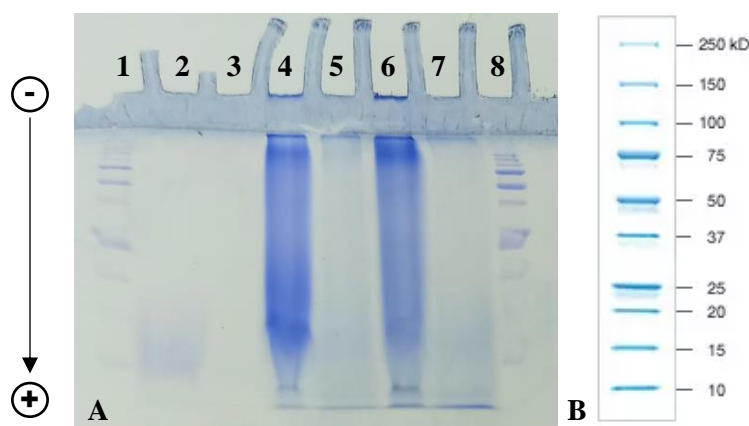


Figura 59 – SDS-PAGE (17 %) corado com azul de Coomassie (A) (1: Precision Plus Protein (10 µL); 2: extrato MAE amostra G10; 3: extrato MAE amostra G37; 4: FKOH amostra G37; 5: FNaOH amostra G37; 6: FKOH amostra G38; 7: FNaOH amostra G38; 8: Precision Plus Protein (20 µL)). Perfil de bandas do marcador Precision Plus Protein (Bio-Rad) (B)

Em todos os poços foram aplicados 20 µL, exceto no poço 1, onde foram aplicados apenas 10 µL do marcador *Precision Plus Protein*. Para as amostras aplicadas nos poços 2 e 3 não são visíveis bandas, e as amostras nos poços 5 e 7 apresentam bandas pouco intensas. As frações FKOH das amostras G37 e G38 (poços 4 e 6) revelaram arrastamento após a coloração, o que dificulta a identificação e comparação da migração das bandas. Apesar disso, é possível observar duas bandas nos poços 4 e 6, uma com menor mobilidade e outra mais próxima da frente de migração. Comparando as distâncias de migração dessas proteínas com as do marcador *Precision Plus Protein*, é possível deduzir que a de menor mobilidade terá massa molar entre 150 e 250 kDa e a outra aproximadamente 15 kDa. No perfil obtido para o extrato MAE da amostra G10 (poço 2), visualiza-se uma zona corada, que poderá corresponder a proteínas com aproximadamente 10 kDa. Estes resultados permitem apenas inferir que as concentrações de proteínas nos extratos de MAE são inferiores às das frações FKOH obtidas por MSE, o que está de acordo com os doseamentos anteriormente apresentados (figura 26), sugerindo assim que a extração de proteínas por MSE é mais eficaz do que por MAE. Apesar da dificuldade na análise dos perfis, as proteínas extraídas com KOH das amostras G37 e G38 aparentam semelhança, como expectável. De referir ainda, que o cromatograma do fracionamento da fração FKOH por cromatografia de exclusão molecular (figura 32) não permite confirmar os resultados aqui analisados.

Baú *et al.* (2001) analisaram extratos de grão verde de *Coffea arabica* L., que foram submetidos a condições de extração mais agressivas do que as aplicadas no presente trabalho – extração com hexano durante 12 horas, seguida de extração com solução de EDTA e saturação com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (80%). Após análise dos seus extratos por eletroforese em condições desnaturantes, identificaram duas bandas, uma com proteínas de aproximadamente 21 kDa e outra

de aproximadamente 38 kDa. A segunda banda identificada na figura 59 é concordante com estes resultados, no entanto Baú *et al.* (2001) não fazem referência a nenhuma banda que contenha moléculas de massa entre 150 e 250 kDa, o que pode ser devido às condições agressivas aplicadas nos seus métodos de extração, uma vez que em outros trabalhos (e.g. Amorim *et al.* (1975)) são identificadas bandas correspondentes a proteínas de 66 kDa, e também de 150 e 170 kDa, em concordância com os resultados obtidos no presente trabalho.

3.6. Análise da atividade antibacteriana

Existem vários compostos identificados em extratos de café que apresentam propriedades antibacterianas, entre os quais compostos fenólicos, flavonoides e polissacáridos β -(1,3)-glucanos (Grotewold *et al.*, 2006; Nakashima *et al.*, 2018; Nie *et al.*, 2018).

Com base nos resultados das análises anteriores, foram escolhidos os extratos mais promissores para avaliação da sua atividade antibacteriana.

Desta forma, o extrato de MAE e a fração FKOH da amostra G37 foram avaliados em testes de difusão com discos, contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Como controlo positivo, foi utilizada uma solução de gentamicina e como controlo negativo água. Os resultados apresentam-se na figura 60.

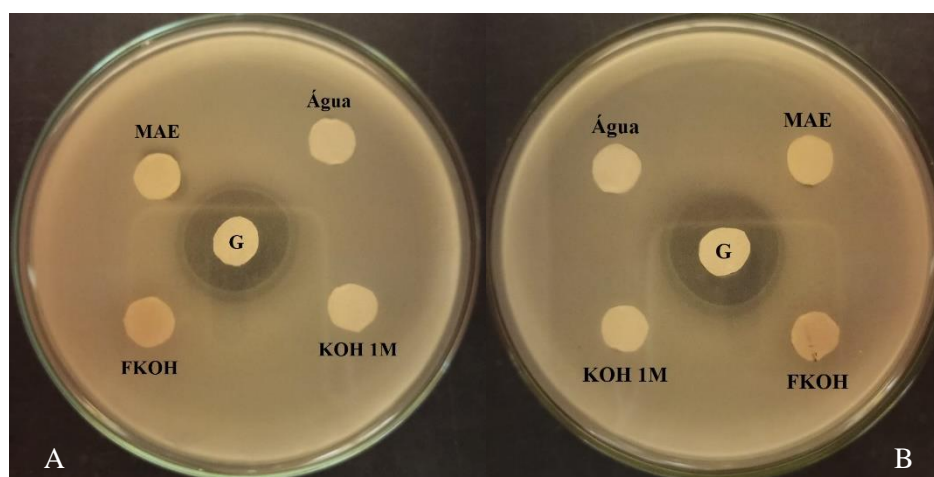


Figura 60 - Análise da atividade antibacteriana do extrato de MAE e da fração FKOH do grão verde de café G37 contra A) *S. aureus*; B) *E. coli*. Nos discos indicados foram aplicados 10 μ L de G – gentamicina (100 μ g), MAE – extrato MAE da amostra G37, FKOH – extrato FKOH da amostra G37, água destilada e solução de KOH (1M).

Em todos os discos foram aplicados 10 µL de amostra/controlo, que corresponde, no disco de controlo positivo, a 100 µg de gentamicina, no do extrato de MAE da amostra G37 a aproximadamente 40,0 µg de compostos fenólicos, 61,9 µg de compostos flavonóides e 6,6 µg de β -(1,3)-glucanos. No extrato FKOH da amostra G37, os 10 µL correspondem a aproximadamente 46,0 µg de compostos fenólicos, 55,0 µg de compostos flavonoides e 4,0 µg de β -(1,3)-glucanos.

Os diâmetros das zonas de inibição de crescimento da solução de gentamicina para *S. aureus* foi de 2,4 cm e para *E. coli* 2,7 cm, verificando-se a eficácia do controlo positivo (CLSI, 2021). No que respeita às amostras aplicadas, tal como para o controlo negativo, não se verificam zonas de inibição de crescimento, pelo que se conclui que o extrato de MAE e a fração FKOH da amostra G37 não apresentam, nas concentrações analisadas, atividade antibacteriana contra as espécies em estudo.

Foi realizado um segundo ensaio com o intuito de avaliar o potencial antibacteriano dos compostos presentes no extrato de MAE da amostra G10, utilizando as mesmas espécies bacterianas e o mesmo antibiótico como controlo positivo (ensaios de suscetibilidade não apresentados). Neste extrato, os 10 µL aplicados no disco correspondem a aproximadamente 42,9 µg de compostos fenólicos, 135,8 µg de compostos flavonóides e 6,5 µg de β -(1,3)-glucanos. Tal como no ensaio anterior, o controlo positivo apresentou um diâmetro de inibição de 2,5 cm para a *S. aureus* e 2,7 cm para a *E. coli*, e o controlo negativo não apresentou inibição, validando assim o ensaio. À semelhança dos resultados obtidos para a amostra G37, não se verificou atividade antibacteriana do extrato de MAE da amostra G10 para as bactérias estudadas.

Embora os resultados para a atividade antibacteriana dos extratos analisados tenham sido negativos, os seus conteúdos em compostos flavonoides, fenólicos e β -(1,3)-glucanos seriam indicadores de atividade antibacteriana, uma vez que estes são conhecidos por esta capacidade, entre outras, já previamente referidas neste trabalho.

Cushnie *et al.* (2005) realizaram um estudo compreensivo sobre atividade antibacteriana de flavonoides, reunindo resultados de vários trabalhos relativos à apigenina, um composto flavonoide presente em plantas como salsa, tomilho e camomila. Nesse trabalho, Cushnie *et al.* analisaram quatro artigos científicos, que referem a utilização do método da difusão em disco para análise da atividade antibacteriana desse composto. Três dessas publicações reportam a avaliação da atividade antibacteriana relativamente a *S. aureus* e *E. coli*, tendo concluído em todas que o flavonoide em questão não apresentou atividade contra *S. aureus*, e em duas, ausência de atividade contra *E. coli*, resultados que são concordantes com os obtidos no presente trabalho. Adicionalmente, em duas dessas publicações foi descrita atividade anti- *Bacillus subtilis*.

A atividade antibacteriana de extratos aquosos de café torrado da espécie *Coffea canephora* (Robusta) face a *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus plantarus* foi avaliada por

Akhlaghi *et al.* (2010), tendo-se verificado atividade bacterioestática para ambas as espécies e ainda atividade bactericida para *S. mutans*.

Almeida *et al.* (2006) estudaram também extratos aquosos de café torrado, mas da espécie *C. arabica* e obtiveram inibição do crescimento para diversas enterobactérias, entre as quais *E. coli*, não sendo conhecidas as composições dos extratos, de forma a permitir a comparação com os resultados desta dissertação. Posteriormente, Rawangkan *et al* (2022) reportaram atividade antibacteriana contra *Vibrio cholerae* de extratos da mesma espécie de café.

É de referir ainda a inexistência até à data de estudos publicados sobre a atividade antibacteriana de extratos de café verde.

4. Conclusões e Perspetivas futuras

4. Conclusões e Perspetivas futuras

Esta dissertação teve como objetivo principal a extração e caracterização parcial de polissacáridos com potencial atividade biológica, a partir de grão verde de café produzido a duas altitudes (650 m e 935 m) e sob sombreamento moderado na Serra da Gorongosa, em Moçambique.

Para extração de polissacáridos e de outros compostos bioativos foram seguidos o método de extração por multi-etapas (MSE) e o método de extração assistida por micro-ondas (MAE), tendo este último demonstrado ser uma alternativa eficaz e mais rápida a MSE. Assim, o uso de radiação micro-ondas permitiu extrair, na generalidade das amostras, conteúdos mais elevados de polissacáridos neutros, ácidos, sulfatados e β -(1,3)-glucanos. Contudo, para polissacáridos neutros e ácidos, os somatórios das concentrações nas diversas frações de MSE revelaram-se superiores às dos extratos de MAE. De referir ainda, que tanto os extratos de MAE como as frações FKOH, FHCl e FNaOH apresentaram colorações escuras, provavelmente resultantes das temperaturas a que o café verde foi submetido durante as respetivas extrações e que podem ter despoletado reações de Maillard, semelhantes às que se verificam no processo da torra do café, com influência nos resultados obtidos.

As concentrações de polissacáridos determinadas nos extratos de MAE sugerem também que a produção de café à altitude de 650 m favorece a acumulação de polissacáridos neutros e ácidos, em comparação com a produção a 935 m. No que respeita aos conteúdos de β -(1,3)-glucanos e de polissacáridos sulfatados, que se revelaram muito inferiores face aos anteriores, não foi evidente o efeito da altitude no grão verde produzido em condições de sombreamento moderado.

Tendo em vista a separação dos compostos no extrato de MAE e na fração FKOH da amostra G37 (grão produzido a 935 m, com sombreamento moderado) foram realizadas cromatografias por exclusão molecular. Os perfis cromatográficos obtidos sugerem a presença de β -(1,3)-glucanos de elevada massa molar, bem como a eventual existência de complexos proteína-polissacáridos e/ou proteoglicanos. Adicionalmente, foi possível distinguir polissacáridos de Mr muito elevada (> 2000 kDa), de outros de Mr inferior (ca. 40 kDa), estes últimos reportados para grão torrado (Redgwell *et al.*, 2002), o que indicia, como anteriormente referido, uma possível alteração estrutural dos compostos do grão verde durante as extrações. O extrato de MAE da amostra G10 (grão produzido a 650 m, com sombreamento moderado) foi igualmente sujeito ao mesmo tipo de cromatografia, tendo-se detetado nas frações cromatográficas polissacáridos com ca. 40 kDa, também na forma livre e/ou conjugada com proteínas.

A semelhança dos espectros FTIR do extrato de MAE da amostra G37 e das respetivas

frações cromatográficas selecionadas indicou que a cromatografia realizada não separou eficazmente as moléculas em análise. No entanto, a comparação dos espectros do extrato FKOH da amostra G37 e das frações escolhidas após a sua cromatografia revelou separação de algumas moléculas do extrato. Todos os espectros obtidos apresentaram bandas típicas de polissacáridos e características de moléculas com conformação β .

Através da análise por HPLC-RI foi possível identificar e quantificar hidratos de carbono nos extratos de MAE e de MSE. Os extratos das amostras G10 e G37 de MAE revelaram a presença de sacarose, bem como as frações de MSE da amostra G37, destacando-se a FKOH com 13,28 mg/g. Nos extratos de MAE G10 e G37 e nas frações de MSE foram determinadas concentrações menores de glucose e frutose, face às obtidas para a sacarose. Verificou-se também a existência de arabinose nos extratos de MAE e nas frações FHCl e FNaOH de MSE. A estaquiase foi detetada em algumas frações de MSE (FW1, FW2, FKOH, FNaOH), tal como a maltotriose (FHCl e FNaOH). Os cromatogramas obtidos para os extratos de MAE hidrolisados com ácido trifluoroacético não revelaram sacarose, demonstrando o sucesso da hidrólise, e permitiram a quantificação de glucose e manose, e detecção de arabinose. A análise dos extratos hidrolisados com ácido sulfúrico foi inconclusiva devido ao baixo sinal dos cromatogramas obtidos.

A semelhança da composição dos extratos de MAE das amostras G10 e G37 foi também avaliada por cromatografia em camada fina, tendo-se confirmado a presença de sacarose nos extratos não hidrolisados. As mobilidades idênticas exibidas por alguns dos padrões aplicados tornou a diferenciação de alguns monossacáridos presentes nos extratos hidrolisados e não hidrolisados complexa.

As análises eletroforéticas demonstraram que os polissacáridos nos extratos MAE das amostras G10 e G37 têm mobilidades idênticas entre si, contudo díspares das dos polissacáridos presentes na fração FKOH da amostra G37, sugerindo diferenças na sua massa molar e/ou carga. Já a SDS-PAGE revelou que os extratos de FKOH e FNaOH apresentam proteínas de massa molar entre 150 e 250 kDa, bem como proteínas de 10 a 15 kDa, enquanto o extrato de MAE da amostra G10 apenas proteínas de massa molar de 10 a 15 kDa.

O método do radical ABTS exibiu atividade antioxidante nas amostras de café da Gorongosa e Delta, especialmente nos extratos de MAE e nas frações FW2 e FKOH, o que foi evidenciado pelos doseamentos em compostos fenólicos e flavonóides.

Os extratos de MAE e FKOH da amostra G37 e o extrato de MAE da amostra G10 foram ainda sujeitos a ensaios preliminares de difusão com discos contra *E. coli* e *S. aureus*, não tendo revelado atividade antibacteriana.

Tendo em consideração os resultados obtidos no presente trabalho e a importância dos polissacáridos no grão verde de café nas propriedades da bebida final, futuramente, seria de todo o interesse otimizar o processo de purificação adotado, de forma a obter os polissacáridos do grão numa forma mais pura e aprofundar a sua caracterização estrutural, por exemplo por técnicas de espectroscopia de RMN 1D (^1H , ^{13}C) e 2D (COSY, HSQC, HBMC), e por ESI-MS.

Seria também interessante investigar a componente proteica dos extratos, dar continuidade, utilizando métodos alternativos, à avaliação da capacidade antioxidante dos extratos e moléculas isoladas, e alargar o estudo da atividade antimicrobiana a outros microrganismos.

Por último, sugere-se aplicar o estudo desenvolvido na presente dissertação a outras amostras de café verde produzidas em diferentes condições de cultivo na Serra da Gorongosa, de modo a aprofundar a influência dessas condições na composição do grão e inferir sobre o seu impacto nas propriedades finais da bebida de café.

5. Bibliografia

5. Bibliografia

Akhlaghi, N., *et al.*, “The antibacterial effects of coffee extract, chlorhexidine, and fluoride against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus plantarum*: An *in vitro* study”, *Dental Research Journal*, vol. 16, pp. 346-353, 2019.

Almeida, A., *et al.*, “Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, n° 23, pp. 8738-8743, 2006.

Amorim, H., Josephson, R., “Water soluble protein and nonprotein components of Brazilian green coffee beans”, *Journal of Food Science*, vol. 4, n° 6, pp. 1179-1184, 1975.

Andrade, J., Oliveira, C., Tovar, A., Mourão, P., Vilanova, E., “A color-code for glycosaminoglycans identification by means of polyacrylamide gel electrophoresis stained with the cationic carbocyanine dye Stains-all”, *Electrophoresis Journal*, vol. 39, pp. 666-669, 2018.

Anschau A., Caruso C., Kuhn R., Franco T., “Validation of the sulfo-phospho-vanilin (SPV) method for the determination of lipid content in oleaginous microorganisms”, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 34, pp. 19-27, 2017.

Aryal, S. “Mueller Hinton Agar (MHA) - Composition, Principle, Uses and Preparation”, *Microbiology Info*, 10 agosto 2022. [Online]. Available: <https://microbiologyinfo.com/mueller-hinton-agar-mha-composition-principle-uses-and-preparation/>. [Acedido em 20 setembro 2022].

Ballesteros, L., Teixeira, J., Mussatto, S., “Extraction of polyssacharides by autohydrolysis of spent coffee grounds and evaluation of their antioxidant activity”, *Carbohydrate Polymers*, pp. 258-266, 2017.

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S., “Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review”, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 6, n° 2, pp. 71-79, 2016.

Baú, S., Mazzafera, P., Santoro, L., “Seed storage proteins in coffee”, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, vol. 13, pp. 33-40, 2001.

Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P., “Food Chemistry”, Leipzig: Springer, 2009.

Blainski, A., Lopes, G., Mello, J., “Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolics content from *Limonium brasiliense* L.”, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Journals*, vol. 18, n° 6, pp. 6852-6865, 2013.

Bradford, M., “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254, 1976.

Brammer, S., “A técnica de eletroforese: importância e aplicações em análises genéticas”, Embrapa Trigo, vol. 6, dezembro 2001.

Cassamo, C., “Coffee crop sustainability in Mozambique and quality under agroforestry system on Gorongosa mountain”, 2022. [Tese de Doutoramento em Saber Tropical e Gestão, Universidade Nova de Lisboa].

Cassamo, C., *et al.*, “Shade and altitude implications on the physical and chemical attributes of green coffee beans from Gorongosa Mountain, Mozambique”. *Agronomy*, vol. 12, nº 10, 2022.

Catelani, T., Santos, J. R., Páscoa, R., Pezza, L., Pezza, H., Lopes, J., “Real-time monitoring of a coffee roasting process with near infrared spectroscopy using multivariate statistical analysis: A feasibility study”, *Talanta*, pp. 292-299, 2017.

Cesaretti, M., Luppi, E., Maccari, F., Volpi, N., “A 96-well assay for uronic acid carbazol reaction”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 54, nº 1, pp. 59-61, 2003.

Chen, L., *et al.*, “Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation – Efforts for eficiente exosome-based theranostics”, *Theranostics*, vol. 10, nº 8, pp. 3684-3707, 2020.

Chuo S., Nasir, H., Mohd-Setapar, S., Mohamed, S., Ahmad, A., Wani, W., Muddassir, M., Alarifi, A., “A glimpse into the extraction methods of active compounds from plants”, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 52, nº 4, pp. 667-696, 2022.

CLSI, “Performance standards for antimicrobial susceptibility testing”, CLSI supplement M100, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2023.

Cushnie, T., Lamb, A., “Antimicrobial activity of flavonoids”, *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 26, pp. 343-356, 2005.

Dong, M., “Modern HPLC for practicing scientists”, New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.

Erel, O., “A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generator, more stable ABTS radical cation”, *Clinical biochemistry*, vol. 37, nº 4, pp. 277-285, 2004.

Farah, A., “Coffee - production, quality and chemistry”, UK: Royal Society of Chemistry, 2019.

Fernandes, J., “Efeito da altitude e sombreamento na bioatividade do grão de café produzido na Serra da Gorongosa”, 2022. [Tese de Mestrado em Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa].

Figueiredo, A., Barroso, J., Pedro, L., Ascensão, L., “Histoquímica e Citoquímica em Plantas: Princípios e Protocolos”, Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2007.

Fischer, M., Reimann, S., Trovato, V., Redgwell, J., “Polysaccharides of green arabica and robusta coffee beans”, *Carbohydrate Research*, vol. 330, nº1, pp. 93-101, 2001.

“Future Learn”, [Online]. Available: <https://www.futurelearn.com/info/courses/everyday-chemistry/0/steps/22338>. [Acedido em 19 junho 2022].

Georgiou, C., Grintzalis, K., Zervoudakis, G., Papapostolou, I., “Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 391, nº 1, pp. 391-403, 2008.

Go, A., Conag, A., Cuizon, D., “Recovery of sugars and lipids from spent coffee grounds: a new approach”, *Waste and Biomass Valorization*, vol. 7, nº 5, pp. 1047-1053, 2016.

Gonçalves, C., Rodriguez-Jasso, R., Gomes, N., Teixeira, J., Belo, I., “Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates”, *Analytical Methods*, vol. 2, nº 12, pp. 2046-2048, 2010.

Gonzalez-Usigli, H., “Manual MSD versão para profissionais de saúde”, maio 2020. [Online]. Available: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/distúrbios-neurológicos/transtornos-de-movimento-e-cerebelares/doença-de-parkinson>. [Acedido em 19 junho 2022].

Grotewold, E., “The Science of Flavonoids”, New York: Springer, 2006.

Gundlach, M., Paulsen, K., Garry, M., Lowry, S., “Yin and yang in chemistry education: the complementary nature of FTIR and NMR spectroscopies”, Thermo scientific, 2015.

Hockett, K., Baltrus, D., “Use of the soft-agar overlay technique to screen for bacterially produced inhibitory compounds”, *Journal of Visualized Experiments*, vol. 119, 2017.

Hudsicki, J., “Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol”, *American society for microbiology*, vol. 15, 55-63, 2009.

Jain, V., Karibasappa, G., Dodamani, A., Mali, G., “Estimating the carbohydrate content of various forms of tobacco by phenol-sulfuric acid method”, *Journal of Education and Health Promotion*, vol. 6, nº 90, 2017.

Kostanski, L., D. Keller, D., Hamielec, A., “Size-exclusion chromatography - a review of calibration methodologies”, *Journal of Biomedical and Biophysical methods*, vol. 58, nº 2, pp. 159-186, 2004.

Li, J., Kisara, K., Danielsson, S., Lindstrom, M., Gellerstedt, G., “An improved methodology for the quantification of uronic acid units in xylans and other polysaccharides”, *Carbohydrate Research*, vol. 342, nº 11, pp. 1442-1449, 2007.

“Liga Portuguesa Contra o Cancro”, [Online]. Available: <https://www.ligacontracancro.pt/o-que-e-o-cancro/>. [Acedido em 13 junho 2022].

Lindsay, H., “A colorimetric estimation of reducing sugars in potatoes with 3,5-dinitrosalicylic acid”, *Potato Research*, vol. 16, nº 3, pp. 176-179, 1973.

Lopes, G., Passos, C., Rodrigues, C., Teixeira, J., Coimbra, M., “Impact of microwave-assisted extraction on roasted coffee carbohydrates, caffeine, chlorogenic acids and coloured compounds”, *Food Research International*, vol. 129, 2020.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R., “Protein measurement with the Folin phenol reagent”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, pp. 265-275, 1951.

Ludwig, I., Clifford, M., Lean, M., H. Ashihara, H., Crozier, A., “Coffee: biochemistry and potencial impact on health”, *Food & Function*, vol. 5, nº 8, pp. 1633-1978, 2014.

Lysiuk, R., Hudz, N., “Differential spectrophotometry: application for quantification of flavonoids in herbal drugs and nutraceuticals”, *International Journal of Trends in Food and Nutrition*, 1:e102, 2017.

Masuko, T., *et al.*, “Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format”, *Analytical Biochemistry*, vol. 339, nº 1, pp. 69-72, 2005.

Monsalve-Bustamante, Y., Rincón-Valencia, S., Mejía-Giraldo, J., Moreno-Tirado, D., Puertas-Mejía, M., “Screening of the UV absorption capacity, proximal and chemical characterization of extracts, and polysaccharide fractions of the *Gracilariopsis tenuifrons* cultivated in Colombia”, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 9, nº 10, pp. 103-109, 2019.

Muthukumar, J., Chidambaram, R., Sukumaran, S., “Sulfated polysaccharides and its commercial applications in food industries – a review”, *Journal of Food Science and Technology*, vol. 58, nº 7, pp. 2453-2466, 2021.

Nakashima, A. *et al.*, “ β -Glucan in foods and its physiological functions”, *Journal of nutritional science and vitaminology*, vol. 64, nº 1, pp.8-17, 2018.

Nie, S., Cui, S., Xie, M., “Bioactive Polysaccharides”, Academic Press, 2018.

Ogawa, K., Tsurugi, J., Watanabe, T., “Complex of gel-forming β -1,3-D-glucan with congored in alkaline solution”, *Chemistry Letters*, pp. 689-692, 1972.

Oosterveld, A., Harmsen, J., Voragen, A., Schols, H., “Extraction and characterization of polysaccharides from green and roasted *Coffea arabica* beans”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 52, pp. 285-296, 2003.

Pandey, K., Theagarajan, K., “Analysis of wood surfaces and ground wood by diffuse reflectance (DRIFT) and photoacoustic (PAS) Fourier transform infrared spectroscopic techniques”, Springer Verlag, vol. 55, n° 6, pp. 383-390, 1997.

Passos, C., Coimbra, M., “Microwave superheated water extraction of polysaccharides from spent coffee grounds”, *Carbohydrates Polymers*, vol. 94, pp. 626-633, 2013.

Poisson, L., Blank, I., Dunkel, A., & Hofmann, T., “The chemistry of roasting—Decoding flavor formation”, *The craft and science of coffee* (pp. 273-309), Academic Press, 2017.

Poole, C., “Thin-layer chromatography: challenges and opportunities”, *Journal of Chromatography A*, vol. 1000, n° 1-2, pp. 963-984, 2003.

Portillo, O., Arévalo, A., “Coffee’s carbohydrates. A critical review of scientific literature”, *Revista Bionatura*, vol. 7, n° 3, 2022.

Prandi, B., *et al.*, “Extraction and chemical characterization of functional phenols and proteins from coffee (*Coffea arabica*) by-products”, *Biomolecules*, vol. 11, 2021.

Preedy, V., “Coffee in health and disease prevention”, USA: Elsevier, 2015.

“Projeto Gorongosa Café – Produção sustentável de café em Moçambique, com apoio do Camões, I. P., na CNN”, Instituto Camões, 23 julho 2020. [Online]. Available: <https://www.instituto-camoes.pt/sobre/comunicacao/noticias/projeto-gorongosa-cafe-producao-sustentavel-de-cafe-em-mocambique-com-apoio-do-camoes-i-p-na-cnn>

Quammen, D., “Um novo dia no parque nacional da Gorongosa, Moçambique”, *National Geographic Portugal*, 24 junho 2019. [Online]. Available: <https://nationalgeographic.pt/natureza/grandes-reportagens/2140-um-novo-dia-em-gorongosa-mocambique>. [Acedido em 12 junho 2022].

Ramalho, J. *et al.*, “Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO₂]”, *PLoS ONE*, vol. 8, n° 12, 2013.

Rawangkan, A., *et al.*, “Potential antimicrobial properties of coffee beans and coffee by-products against drug-resistant *Vibrio cholerae*”, *Frontiers in Nutrition*, vol. 9, 2022.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., “Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization assay”, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, n°9, pp. 1231-1237, 1998.

Redgwell, R., Fischer, M., “Coffee carbohydrates”, *Brazilian journal of plant physiology*, vol. 1, nº 18, pp. 165-174, 2006.

Reis F., Martins A., Barros L., Ferreira I., “Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between in vivo and in vitro samples”, *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, nº 5, pp. 1201-1207, 2012.

“Retention times for sugar and carbohydrates”, Waters Corporation, maio 2017. [Online]. Available: <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006023en.pdf> [Acedido a 16 outubro 2023].

Romdhane, M., *et al.*, “Effect of extraction methods on chemical composition, angiotensin i-converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of coffee residue”, *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 41, 2015.

Sigma Aldrich, “Nuclear Magnetic Resonance (NMR)”, 2020.

Sigma Aldrich, “What is FTIR Spectroscopy”, 2022.

Semedo, M., Karmali, A., Fonseca, L., “A high throughput colorimetric assay of β -1,3-D-glucans by Congo red dye”, *Journal of Microbiological Methods*, vol. 109, pp. 140-148, 2015.

Sridharan, G., Shankar, A., “Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility”, *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, vol. 16, nº 2, pp. 251-255, 2012.

Sualeh, A., “Biochemical composition of green and roasted coffee beans and their association with coffee quality from different districts of southwest Ethiopia”, *Heliyon*, pp. 1-2, 2020.

Subedi, R., “Comparative analysis of dry and wet processing of coffee with respect to quality and cost in Kavre district, Nepal: a case of Panchkal village”, *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, vol. 2, nº 5, pp. 181-193, 2011.

Sutherland, P., Hallett, I., MacRae, E., Fischer, M., & Redgwell, R. “Cytochemistry and immunolocalisation of polysaccharides and proteoglycans in the endosperm of green Arabica coffee beans”, *Protoplasma*, vol. 223, pp. 203–211, 2004.

Tajik, N., “The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature”, *European Journal of Nutrition*, pp. 2215-2244, 2017.

Taylor, T., Patterson, H., “Determination of aqueous aluminum with the fluorescent chelating ligand, 2-hydroxy-1-carbazol carboxylate: Part I. A model for speciation and stability constants”, *Analytica Chimica Acta*, vol. 278, pp. 249-257, 1993.

Tsegay, G., “Effect of altitude of coffee plants on the composition of fatty acids of green coffee beans”, *BMC Chemistry*, pp. 14-36, 2020.

Vázquez, C., *et al.*, “Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method”, *Food Chemistry*, vol. 176, pp. 480-486, 2015.

Waters Corporation, “Sugar-Pak I Column Care and Use Manual”, 2020.

Yang, D., *et al.*, (2020). “Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - Efforts for efficient exosome-based theranostics”, *Theranostics*. 2020.

Yeh, J., Hsieh, L., Wu, K., Tsai, C., “Antioxidant properties and antioxidante compounds of various extracts from the edible basidiomycete *Grifola frondosa* (Maitake), *Molecules*, vol. 16, nº 4, pp. 3197-3211, 2011.