

MATHEUS SIQUEIRA BARRETO

PRODUTO EDUCACIONAL

MÉTODO ANALÍTICO INOVADOR PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CAFÉ

Orientador: Marcelo Henrique dos Santos

Coorientador: Antônio Jacinto Demuner

VIÇOSA

MINAS GERAIS - BRASIL

2019

1 INTRODUÇÃO

O café é apontado como a bebida preparada mais consumida no Brasil e no mundo ocidental. No qual o Brasil é o país que mais produz e exporta e o segundo maior consumidor da bebida no mundo (BRASIL, 2018). De acordo com o Informe Estatístico do Café, do Departamento do Café – Dcaf, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Mapa, a partir de 1997, com a criação do Consórcio Pesquisa Café, a evolução da cafeicultura se deu de forma bastante expressiva. A área de cultivo nesse ano era de 2,4 milhões de hectares, a produção de 18,9 milhões de sacas de 60 kg e a produtividade de 8,0 sacas/hectare, com o consumo per capita de 4,3 kg de café. Passados 17 anos, de acordo com o Levantamento de Safra da Companhia Nacional de Abastecimento – Conab, houve redução da área de cultivo para 1,9 milhões de hectares e, em 2014, o País produziu 45,3 milhões de sacas, com produtividade de 23,3 sacas/há (BRASIL, 2015). E o consumo per capita, nesse mesmo período, também de acordo com o Informe Estatístico, aumentou para 6,12 kg. Em nível mundial, segundo a Organização Internacional do Café – OIC, em 1997, a produção foi de 99,7 milhões de sacas de 60 kg e o Brasil participou com 19% desse mercado. Em 2014, como a produção mundial evoluiu para 141,4 milhões de sacas e, a brasileira, para 45,3 milhões de sacas, nossa participação aumentou para 32% do mercado mundial, com redução de aproximadamente 20% da área de cultivo (EMBRAPA, 2015). Em sua composição química, o café apresenta alto teor de fenólicos, atribuídos ao seu potencial antioxidante. Esses compostos antioxidantes, como os polifenóis, são substâncias que se oxidam com facilidade, resultando em substâncias coradas. A cor desses produtos de oxidação deve-se ao elevado grau de conjugação. Oxidantes como o cloreto férrico (FeCl_3), são empregados para caracterização de polifenóis, utilizando o BHT (hidroxitolueno butilado) como padrão para análise de compostos fenólicos e de antioxidantes em amostras de café em diferentes estágios de maturação e grau de torrefação. Este assunto, é também uma forma de abordagem diferenciada para aulas de química no ensino médio. Em muitas regiões do país existem alunos de família de agricultores, diretamente ligados com o plantio de café, sendo assim, uma forma de contextualizar com suas realidades, o que é indicado a ser realizado pelos Parâmetros Curriculares para o Ensino Médio (PCNEM), onde consta que: “contextualizar o conteúdo nas aulas com os alunos significa primeiramente assumir que todo conhecimento envolve uma relação entre sujeito e objeto”. Nesses documentos,

a contextualização é apresentada como recurso por meio do qual se busca dar um novo significado ao conhecimento escolar, possibilitando ao aluno uma aprendizagem mais significativa (BRASIL, 1999). Essa prática também está de acordo com o ensino por investigação, onde alunos são colocados em situação de realizar pequenas pesquisas, combinando simultaneamente conteúdos conceituais, procedimentais e atitudinais (POZO, 1998).

A experimentação no ensino de Química constitui um recurso pedagógico importante que pode auxiliar na construção de conceitos (FERREIRA et al., 2010). A utilização de temas cotidianos, como a qualidade do café e sua importância na saúde humana, é um poderoso mecanismo para dar sentido aos conteúdos estudados em sala de aula pelo aluno, que muitas vezes não consegue relacionar o que se estuda a algo prático e próximo de sua realidade.

1.1 Determinação usando o aplicativo do celular

A determinação de compostos bioativos constitui uma análise de grande interesse, visto que, esses grupos fotoquímicos possuem reconhecida atividade antioxidante. Embora a caracterização qualitativa e quantitativa dos compostos fenólicos seja efetiva quando se utilizam métodos cromatográficos, a utilização da técnica espectrofotométrica permite uma rápida estimativa do teor total de compostos fenólicos em determinada amostra. No entanto, muitos desses métodos são trabalhosos, envolvem equipamentos caros, consomem grandes quantidades de reagentes e não podem ser usados para análises *in situ* devido à sua baixa portabilidade. Para superar essas desvantagens, um método simples e barato tem sido recentemente utilizado em análises químicas, empregando análise de imagem ou baseada em imagem digital. Nesta metodologia, câmeras (PAQUET-DURANT et al., 2012), bem como scanners (SOROURADDIN et al., 2015), webcams (LYRA et al., 2011; SANTOS et al., 2013) e celulares (INTARAVANNE et al., 2012) são geralmente usados para obter imagens correlacionadas a uma abordagem colorimétrica e/ou refletância, conforme apresentado em reações teste (BENEDETTI et al., 2015b). Nesta estratégia, a intensidade da radiação é diretamente proporcional à concentração do analito (KOHL et al., 2006). Reações colorimétricas envolvendo testes pontuais são extremamente simples, rápidas e baixo custo, aplicável a compostos orgânicos e inorgânicos (ZERAIK et al., 2008). Benedetti et al., (2015a) desenvolveram um procedimento analítico simples e de baixo custo para determinação de sulfito em bebidas. Amostras foram submetidas a análises baseadas na captura de imagens,

utilizando decomposição do sistema e da imagem no vermelho, verde e azul, Modelo RGB. Lyra et al., (2009) propuseram um método de espectrometria de emissão digital de chama (DIB-FES) para a análise química quantitativa empregando uma webcam para capturar a imagem digital. Monošík et al., (2015) apresentaram um simples estudo de cromatografia em papel baseado em ensaio colorimétrico para a análise de constituintes de alimentos usando uma câmera de smartphone. As imagens foram avaliadas em software, a fim de obter dados quantitativos. O uso de câmeras com dispositivo de carga acoplada (CCD), sensor e semicondutor de óxido de metal complementar (CMOS) foi introduzido em química analítica com objetivo de se obter aquisição rápida de sinal, baixa estabilidade e boa linearidade, proporcionando o desenvolvimento de novos métodos analíticos com alta sensibilidade, robustez, e também, rápido e baixo custo de implementação. Esses sensores são capazes de converter a intensidade de luz incidente em valores digitais para gerar resposta a partir de uma imagem baseada no modelo de cores RGB, no qual três matrizes são usadas para armazenar a informação (SENA et al., 2011). As imagens digitais podem ser representadas por cores de diferentes modelos. O modelo RGB é reconhecido como sistema de cores (LOPEZ-MOLINERO et al., 2010). Neste modelo, vermelho, verde, e azul, as cores primárias, transmitem luz para exibir cor, e as outras cores são geradas por combinação linear destas três cores, devido à aditividade do modelo utilizado. As intensidades da cor gerada são armazenadas em 256 níveis em uma escala de 0 a 255 para cada cor primária (R, G ou B), onde 0 é preto puro (0 para cada uma das 3 cores primárias) e 255 é branco puro (mistura de 255 níveis para cada cor primária; PACIORNIK et al., 2006). A combinação de imagens digitais e colorimétricas ou métodos cromogênicos, que podem ser analisados a partir da cor pelo modelo RGB é uma possibilidade atual de desenvolvimento direto e rápido de determinações quantitativas (LOPEZ-MOLINERO et al. 2010; SOUZA et al., 2016; PETERS et al., 2015; EVANS et al., 2014). Neste trabalho, as imagens digitais foram adquiridas de forma colorimétrica por meio da reação teste local entre FeCl_3 e quercetina e da reação teste local entre FeCl_3 com ferricianeto de potássio $\text{K}_3[\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6]$ e BHT, usando o modelo RGB. O método proposto para a determinação dos fenólicos totais e da atividade antioxidante do café mostrou-se rápido, sendo uma alternativa econômica para análise de controle de qualidade em processos industriais e / ou artesanais.

2 METODOLOGIA

2.1 Obtenção das amostras de café

As amostras de café foram obtidas através de cultivos realizados por alunos, em lavouras no município de Divino de São Lourenço, no sul do estado do Espírito Santo. Foram coletadas amostras em diferentes estádios de maturação, preparadas em graus de torrefação claro, médio e escuro.

2.2 Extração

Massas de aproximadamente 1 g das amostras de café, nos diferentes estádios de maturação e graus de torrefação, foram pesadas separadamente, trituradas e submetidas a extração com 100 mL de etanol e água na proporção de 50%. A seguir, os extratos foram filtrados e armazenados em frascos para as posteriores análises.

2.3 Determinação de fenólicos totais

A análise colorimétrica de compostos fenólicos nas amostras de café foi baseada nas reações de oxirredução, empregando o cloreto férrico (FeCl_3). O resultado positivo é evidenciado pelo desenvolvimento de coloração azul ou verde azulada, sendo as medidas realizadas a partir de um aplicativo para telefone celular (PhotoMetrix®) em um ambiente de luz controlada. Para preparação da curva analítica, foi utilizada quercetina como padrão nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg L^{-1} , sendo que a leitura foi realizada utilizando o smartphone e o espectrofotômetro de UV-Vis ($\lambda = 254 \text{ nm}$), tendo sido obtida uma curva analítica para cada um dos métodos utilizados. O preparo das amostras de café foi realizado conforme descrito para a curva analítica, sendo que o teor de fenólicos totais foi expresso em mg equivalentes de quercetina por g de amostra. Os resultados obtidos usando o aplicativo Photometrix® foram comparados aos obtidos utilizando o espectrofotômetro de UV-Vis de feixe único (SHIMADZU, MINI 1240), equipado com cubeta de vidro de caminho óptico de 1 cm, no comprimento de onda de 294 nm. Para isso, foram realizadas análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

2.4 Avaliação do poder redutor

A avaliação do poder de redução do café foi realizada de acordo com a metodologia citada por Yen e Chen (1995), com modificações. Foi construída uma curva analítica utilizando as seguintes concentrações do padrão BHT: 0; 0,1; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg mL^{-1} . Para isso, volumes adequados da solução estoque de BHT 100 mg L^{-1} foram transferidos para tubos de ensaio de 25 mL. A estes volumes foram adicionados: 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a 1% (p/v). A mistura foi

incubada a 45 °C por 20 min. A seguir, foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (p/v) à solução contida no tubo de ensaio, com posterior agitação. Um volume de 2,5 mL da mistura foi transferido para outro tubo de ensaio, no qual foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de FeCl₃ a 0,1% (p/v), /sob agitação. A leitura das soluções de BHT, nas diferentes concentrações, foi realizada usando o aplicativo Photometrix® e o espectrômetro UV-Vis ($\lambda = 706 \text{ nm}$), tendo sido obtidas duas curvas analíticas, uma para cada método. Para avaliação do poder redutor, as amostras de café foram preparadas da mesma forma que para a construção da curva analítica, destacando o fato de ter sido utilizada uma alíquota de 1,0 mL de cada amostra. A seguir, foi realizada a leitura no aplicativo Photometrix e no espectrofotômetro UV-Vis, em triplicata.

Da mesma forma que na determinação de fenólicos totais, testes estatísticos, análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, foram utilizados para comparar a similaridade entre os dois métodos utilizados com um intervalo de confiança de 95%.

2.5 Montagem do aparato para a realização das medidas usando Photometrix®

As reações do teste foram realizadas em uma placa de porcelana contendo nove vasos de reação. Pipetas automáticas (Eppendorf, Alemanha) foram usadas para transferir volumes exatos de reagentes e/ou amostras da placa de porcelana para cubetas de análise. Os produtos colorimétricos foram fotografados com uma câmera de telefone celular Motorola G6 play com resolução de 13.0 MP. Para garantir a reprodutibilidade das imagens digitais adquiridas, um aparelho semelhante ao descrito por Benedetti et al., (2015b) foi usado com alguns ajustes.

A cabine utilizada na obtenção de dados foi construída com dimensões de 22 cm de comprimento, 17 cm de largura e 23 cm de altura (Figura 1), com um suporte como estojo onde o smartphone Motorola G6 play com resolução de 13 MP é colocado, ficando em uma posição vertical. No centro da face da cabine, um orifício de 4 cm de diâmetro é posicionado a 12 cm da base do celular até centro da circunferência para posicionamento da câmera. O equipamento montado se mostrou compatível com outros modelos de aparelhos smartphones. Mais detalhes sobre a cabine coletora podem ser vistos no apêndice A.



Figura 1 - Equipamento utilizado para captação de imagens digitais

No interior fica alojada uma placa divisória de 21 cm de comprimento, 22 cm de altura e 15 cm de largura (Figura 2). A 12 cm da base da placa divisória foi aberta uma janela de 4 cm por 3 cm para a obtenção das imagens.



Figura 2 - Interior do equipamento de captação de imagens digitais

Na traseira da referida placa, acima da janela de imagem, foi colocado um suporte com um furo no centro feito com uma broca de 13 mm e que serve para colocar o tubo de ensaio contendo as amostras (Figura 3). Na parte inferior da janela instalou-se um suporte

que serve de limite, de forma a garantir que o tubo de ensaio seja colocado sempre na mesma posição e evitando, deste modo, a alteração dos dados fornecidos pela imagem.



Figura 3 - Parte do aparelho onde se localiza as amostras para obtenção das imagens digitais

Na tampa da cabine de coleta de dados foi fixado, na parte inferior (parte interna da cabine), um conjunto de LED (Light Emitting Diode) (Figura 4) retirado de uma lâmpada de 9 Watts.



Figura 4 - Lâmpada utilizada para obtenção do LED utilizado na iluminação do equipamento

Após fixada a placa de LED, a mesma foi ligada a um fio paralelo 2,5 mm, com uma extensão de 3 metros e um plugue de dois pinos, para ser ligado diretamente em tomadas mais distantes, com funcionamento em 220 ou 110 volts, uma vez que a lâmpada de LED é também bivolt (100~240 volts). Por fim, foi pintada toda a parte externa da cabine com tinta preta fosca, e a parte interna da parede de traz foi deixada na cor branca para contraste da imagem. A placa divisória e os suportes não foram pintados, permanecendo na cor branca. A tampa da cabine também foi pintada de preto fosco, tanto interna quanto externamente, sendo que a tinta usada foi própria a suportar alta temperatura (600 °C), com o objetivo de evitar a queima do material, tendo em vista o aquecimento intenso provocado pelas lâmpadas de LED.

2.6 Aplicativo usado para coleta de dados

O aplicativo PhotoMetrix® foi utilizado para a calibração e para determinação colorimétrica de fenólicos totais e do poder redutor. O aplicativo para telefone celular foi obtido gratuitamente no Google Play Store (HELPER, 2017). Na interface principal do aplicativo há opções de análise univariada e multivariada, além de configurações e informações sobre o aplicativo. A análise escolhida para aplicação no presente trabalho foi a univariada. A primeira execução foi a calibração, onde foi adicionado o número de concentrações do padrão para a construção da curva analítica. Após essa etapa, foi informada a concentração do padrão a ser medida e realizada a medida colorimétrica da solução posicionada no aparato. No final das medidas individuais de cada padrão, foram obtidos os resultados para as calibrações lineares com diferentes parâmetros de imagem (RGB, HSV, HSL e HSI). A segunda execução foi a medida da concentração na amostra a partir de um modelo de calibração previamente selecionado, ou seja, a melhor curva de calibração com coeficientes de regressão (R^2) próximo a um. As medidas foram realizadas semelhantemente à realizada com os padrões. No final das leituras, o aplicativo fornece a concentração do analito na amostra diluída. O celular Motorola G6 play 29 equipado com câmera fotográfica utilizado para as medições possui resolução de 13 MP.

2.7 Produtos Químicos

Cloreto férrico hexahidratado (99 – 102%) e ácido tricloroacético ($\geq 99\%$) foram adquiridos da Merck. Quercetina ($\geq 95\%$) e hidroxitoluenobutilado ($\geq 99\%$) foram comprados da Sigma Aldrich. Ferricianeto de potássio ($\geq 99\%$) foi adquirido da Vetec. Etanol comercial foi adquirido no comércio local. Solução estoque de quercetina (100 mg

mL⁻¹) em etanol : água ultrapura (1:1) foi preparada para determinação de fenólicos totais; Solução de ferricianeto de potássio 1% (p/v) em água ultrapura foi preparada para determinação de fenólicos totais e da solução estoque de quercetina; Soluções de hidroxitolueno butilado (BHT) 100 mg mL⁻¹, de ferricianeto de potássio 1% (p/v); de ácido tricloroacético 10% (p/v) e de tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹ (pH = 6,6) foram preparadas em etanol : água ultrapura (1:1) para determinação da atividade oxidante. As soluções foram preparadas com água ultrapura (resistividade > 18,0 MΩ cm) obtida de um sistema Millipore Milli-Q (EUA).

2.8 Tratamento de Imagem Digital

As imagens capturadas foram analisadas usando o software Photometrix®, disponível gratuitamente em lojas de aplicativos para smartphones. As imagens foram processadas por este software que as decompõem em uma matriz RGB. Para isso, uma equação linear foi empregada de forma semelhante ao cálculo de transmitância utilizado para reações colorimétricas descritas pela lei de Lambert-Beer. Nela, o sinal (S) é obtido subtraindo do nível máximo de intensidade cor permitido nos canais RGB (255) o valor de intensidade da cor primária (I) obtida durante o processamento das imagens pelo Photometrix®, conforme Equação 1:

$$S = 255 - I$$

Onde, S = sinal

I = intensidade da cor primária obtida pelo aplicativo

255 = nível máximo de intensidade

2.9 Calibração Colorimétrica das Reações

A calibração para determinação de fenólicos totais foi realizada baseada na reação de redução de Fe³⁺ a Fe²⁺ pelo composto fenólico quercetina, formando um complexo amarelo com absorção em $\lambda = 294$ nm. Um aumento na intensidade da cor desenvolvida na reação química (complexo formado com a quercetina) indica uma maior concentração do analito de interesse (fenólicos totais) no café avaliado. Dessa forma, a curva analítica para determinação de fenólicos totais em café foi construída utilizando quercetina em diferentes concentrações (Figura 5).

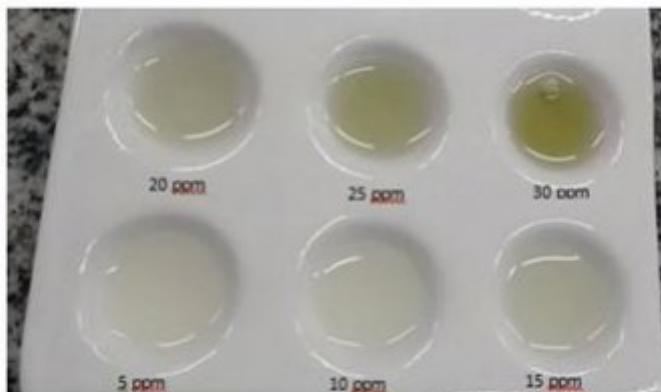


Figura 5 - Imagem da placa de porcelana com as concentrações de quercetina de 5 a 30 mg L⁻¹

Na Tabela 1, a seguir, estão registrados os valores das concentrações do padrão quercetina e suas respectivas intensidades de cores obtidas nos canais RGB 33 usando o programa Photometrix®. Esses dados foram utilizados para construção das curvas analíticas referentes aos canais RGB (Figura 6). Na coluna Blue (B), foi observado o valor de 206 para 0 mg L⁻¹ e de 89 para 30 mg L⁻¹, ou seja, quanto mais concentrado, menor o valor de intensidade de cor obtida no canal Blue.

No momento de fazer a leitura utilizando o smartphone é importante observar e sempre anotar esses valores.

Tabela 1 - Padrão quercetina em diferentes concentrações (mg L⁻¹) e seus respectivos valores de intensidade de cor registrados nos canais RGB.

Quercetina (mg L ⁻¹)	Red (R)	Green (G)	Blue (B)
0	207	206	206
5	201	199	183
10	187	183	160
15	167	162	135
20	167	159	127
25	144	137	108
30	124	120	89

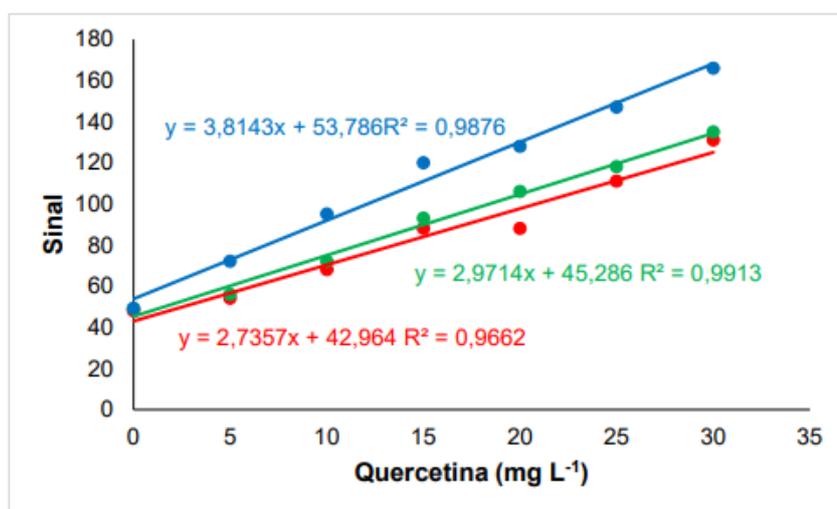


Figura 6 - Curvas analíticas obtidas nos canais red (R), green (G) e blue (B) para o padrão quercetina.

Avaliando as curvas analíticas (Figura 6) foi possível perceber que, apesar do canal B ter sido o mais sensível às alterações de concentração de quercetina (curva mais inclinada), a curva analítica por ele obtida é a menos linear que o canal R levando em consideração o coeficiente de correlação (R, $r^2 = 0,9662$; G, $r^2 = 0,9913$ e B, $r^2 = 0,9876$). Além do canal G ser o segundo mais sensível a curva analítica $y = 2,7357x + 42,964 R^2 = 0,9662$ $y = 2,9714x + 45,286 R^2 = 0,9913$ $y = 3,8143x + 53,786 R^2 = 0,9876$ 0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 0 5 10 15 20 25 30 35 Sinal Quercetina (mg L⁻¹) nele obtida (Figura 7) apresentou a melhor linearidade e, por isso, foi utilizada para determinação de fenólicos totais nos extratos de café.

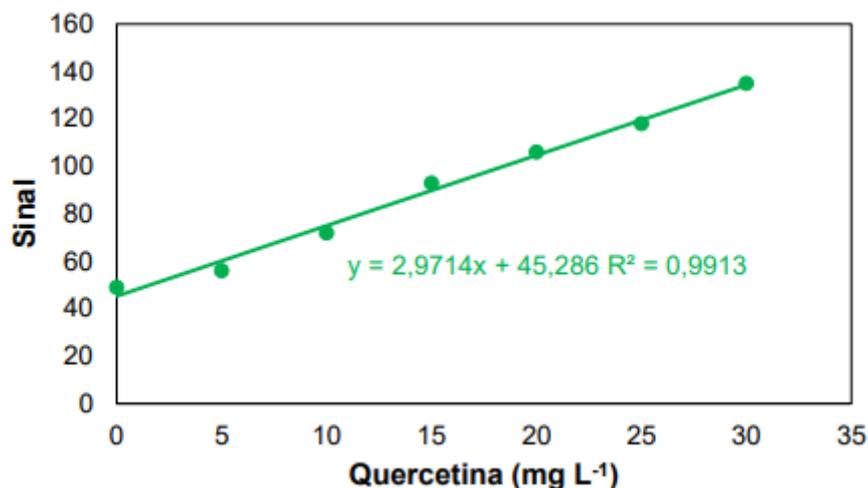


Figura 7- Curva analítica obtida no canal Green (G) para o padrão quercetina.

A curva analítica para determinação de fenólicos totais pelo tradicional método de espectrofotometria no UV-Vis (Figura 8) foi obtida plotando um gráfico contendo no eixo x a concentração de quercetina (mg L^{-1}) e no eixo y as absorvâncias obtidas no UV-Vis em $\lambda = 294 \text{ nm}$. Foram utilizadas as mesmas soluções de quercetina preparadas para construção da curva analítica usando o aplicativo Photometrix®.

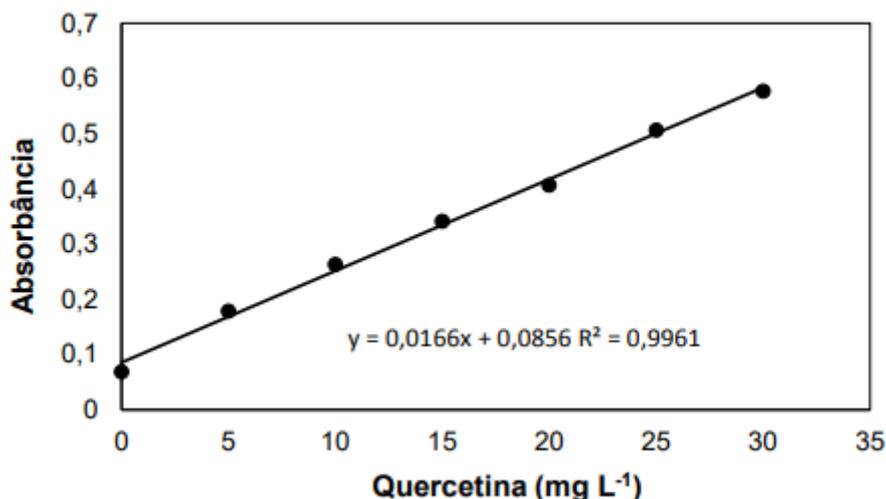


Figura 8 - Curva analítica do padrão quercetina obtida usando o espectrômetro UV-Vis.

A calibração para determinação do poder redutor foi realizada baseada na reação entre cloreto férrico (FeCl_3), ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) e $\text{y} = 2,9714x + 45,286$ $R^2 = 0,9913$ 0 20 40 60 80 100 120 140 160 0 5 10 15 20 25 30 35 Sinal Quercetina (mg L^{-1}) $\text{y} = 0,0166x + 0,0856$ $R^2 = 0,9961$ 0 0,1 0,2 0,3 0,4 0,5 0,6 0,7 0 5 10 15 20 25 30 35 Absorbância Quercetina (mg L^{-1}) hidroxitolueno butilado (BHT), gerando um

complexo verde-azulado com absorção em $\lambda = 706$ nm. A intensidade da cor desenvolvida na reação química (complexo formado) é diretamente proporcional à concentração de antioxidantes presentes no café avaliado. As concentrações de BHT (0,0 a 1,0 mg L⁻¹; n = 6 pontos) utilizadas na construção da curva analítica e suas respectivas intensidades de cores obtidas nos canais RGB, usando o programa Photometrix®, estão registradas na Tabela 2.

Tabela 2 - Padrão BHT em diferentes concentrações (mg L⁻¹) e seus respectivos valores de intensidade de cor registrados nos canais RGB

BHT (mg mL ⁻¹)	Red (R)	Green (G)	Blue (B)
0	197	196	197
0,10	188	187	190
0,25	178	177	186
0,50	164	163	171
0,75	156	152	157
1,0	140	137	147

Da mesma forma que para determinação de fenólicos totais, para avaliação do poder redutor do café também foi obtida uma curva analítica para cada canal RGB (Figura 17) usando o aplicativo Photometrix®.

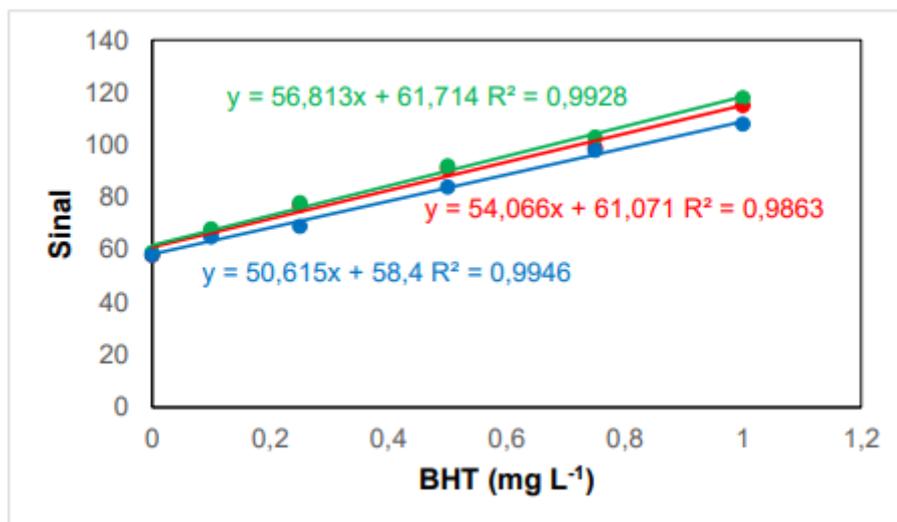


Figura 9- Curvas analíticas obtida nos canais red (R), green (G) e blue (B) para o padrão BHT usando o aplicativo Photometrix®.

A curva analítica obtida no canal G (Figura 9) foi escolhida para determinar o poder redutor nos extratos de café por apresentar a melhor sensibilidade em relação as diferentes concentrações de BHT quando comparada às demais. Além $y = 54,066x + 61,071 R^2 = 0,9863$ $y = 56,813x + 61,714 R^2 = 0,9928$ $y = 50,615x + 58,4 R^2 = 0,9946$ 20 40 60 80 100 120 140 0 0,2 0,4 0,6 0,8 1 1,2 Sinal BHT (mg L⁻¹) disso, ela apresentou

uma excelente linearidade ($r^2 = 0,9928$), superior à do canal R ($r^2 = 0,9863$) e praticamente igual à do canal B ($r^2 = 0,9946$) (Figura 10).

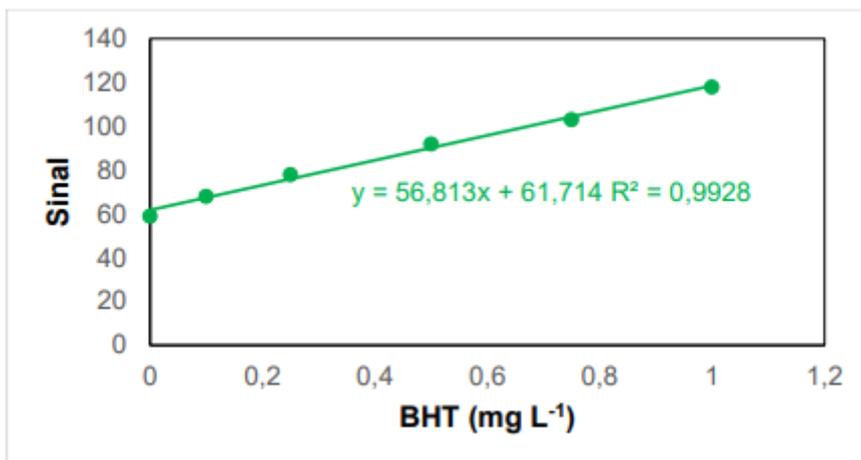


Figura 10 - Curva analítica obtidas no canal green (G) para o padrão BHT usando o aplicativo Photometrix®.

A curva analítica para determinação do poder redutor pelo método de espectrofotometria no UV-Vis (Figura 11) foi obtida plotando um gráfico contendo no eixo x a concentração de BHT (mg L^{-1}) e no eixo y as absorvâncias obtidas no UV-Vis em $\lambda = 706 \text{ nm}$. Foram utilizadas as mesmas soluções de BHT preparadas para construção da curva analítica usando o aplicativo Photometrix®.

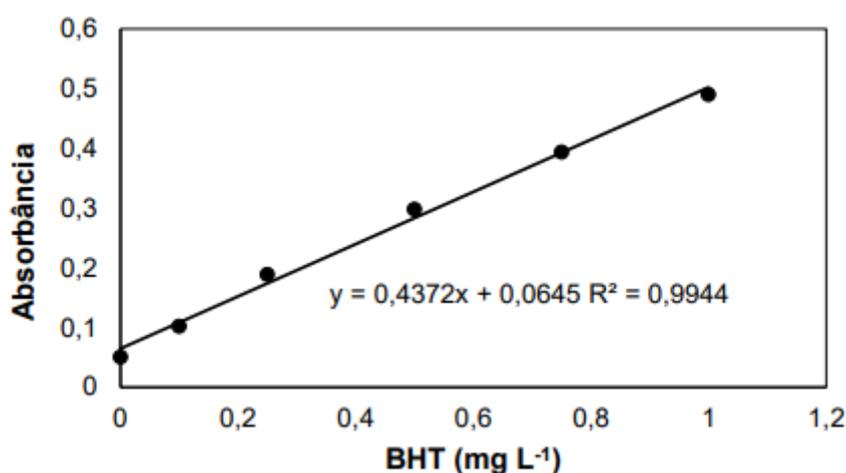


Figura 11 - Curva analítica para o padrão BHT obtida usando o espectrômetro UV-Vis.

2.10 Teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante nos diferentes estádios de maturação do café.

Com aplicativo PhotoMetrix® foi possível realizar determinações colorimétricas sem a necessidade de instrumentos analíticos, com a possibilidade adicional da realização de medidas in situ. Inicialmente foi avaliada uma faixa mais ampla de concentração dos padrões quercetina e BHT de forma a estabelecer a região linear para calibração. Após calibração, conforme descrito no item 2.9, a determinação de fenólicos totais e da atividade antioxidante nos extratos de café foi realizada através da captura de imagens com smartphone, seguida pela decomposição das cores obtidas, a partir das imagens, nas cores primárias vermelho (R), verde (G) e azul (B), usando o aplicativo Photometrix®.

Para o teste realizado com a bebida de café preparada, o aplicativo apresentou o gráfico com a curva analítica, em que o sinal mais sensível foi obtido pelo canal Green ($y = 7,587x + 53,723$, $R^2 = 0,977$). Essa prática facilitou a compreensão por parte dos alunos da importância da calibração para determinação de compostos em uma amostra, possibilitando a eles relacionar a coloração da amostra com sua concentração. Após compreensão da metodologia a ser desenvolvida, partiu-se para a determinação dos compostos fenólicos, através das amostras de grãos de café em diferentes estádios de maturação (Figura 12), fornecidas pelos alunos, das quais foram preparados os extratos pelos mesmos.



Figura 12 - Grãos de café colhidos pelos alunos em diferentes estádios de maturação

Na sequência utilizaram a solução de cloreto férrico para a determinação da concentração de flavonoides nas amostras, usando a cabine coletora de imagens e um celular Motorola G6 play, 13 MP de resolução, para captura das imagens digitais.

Depois de todo processo, foram apresentados aos alunos os resultados deste e de outros trabalhos, que demonstram que a maturação do grão e o processo de torrefação tem influência direta na concentração de flavonoides presentes no café. Então, os alunos relataram suas experiências sobre os processos de catação do café, da escolha realizada pelas empresas que negociam este produto e com relação ao valor final pago por essas empresas ao produtor. Os alunos também relacionaram todo processo aos diferentes sabores que a bebida apresenta, de acordo com a maturação do grão de café e seu processo de torrefação. Eles disseram que já haviam percebido essa diferenciação, mas que não tinham conhecimentos teóricos mais elaborados para explicar tal observação.

3 REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ (ABICA). 24 de maio: Dia Nacional do Café. 2019. Disponível em: <<https://www.graogourmet.com/blog/24-demaio-dia-nacional-cafe/>>, acesso em: 13 jun. 2019.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, v. 99, p. 191-203, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006

BENEDETTI, L.P.S.; DOS SANTOS, V.B.; SILVA, T.A.; BENEDETTI-FILHO, E.; MARTINS, V.L.; FATIBELLO-FILHO, O. A digital image analysis method for quantification of sulfite in beverages. *Anal Methods* v. 7, p. 7568–7573, 2015a.

BENEDETTI, L.P.S.; DOS SANTOS, V.B.; SILVA, T.A.; BENEDETTI-FILHO, E.; MARTINS, V.L.; FATIBELLO-FILHO, O. A digital image based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. *Anal Methods* v. 7, p. 4138-4144, 2015b.

BERKER, K.I.; GÜÇLÜ, K.; TOR, I.; APAK, R. Comparative evaluation of Fe (III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, v. 72, n. 3, p. 1157-1165, 2007.

BRASIL, Ministério da Educação. Parâmetros Curriculares Nacionais Ensino Médio (PCNEM), 2000.

_____, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Café no Brasil, 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politicaagricola/cafe/cafeicultura-brasileira>. Acesso em: 11 jun. 2019.

_____, Perspectivas para a agropecuária. Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). V. 3, Brasília, 2015.

CARVALHO, A.; MEDINA FILHO, H.P.; FAZUOLI, L.C.; GUERREIRO FILHO, O.; LIMA, M.M.A. Aspectos genéticos do cafeeiro. Revista Brasileira de Genética. 14: 135-183, 1991.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. J. Sci. Food Agric., v. 80, n. 7, p. 1033-1043, 2000.

CORTEZ, J. G. Efeito de espécies e cultivares e do processamento agrícola e industrial nas características da bebida do café. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. P. 71, 2001.

DOS SANTOS, M.H.; BATISTA.; B.L.; DUARTE, M.S.D.; DE ABREU, C.M.P.; GOUVÊA, C.M.A.P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

DUH, P.D. Antioxidant activity of budrock (*Arctium lappa* Linn); Its scavenging effect on free radical and active oxygen. Journal of the American Oil Chemists Society, v. 75, p. 455-461, 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Café é a segunda bebida mais consumida no Brasil. 2005. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2574254/cafe-e-a-segundabebida-mais-consumida-no-brasil/>, acesso em: 10 dez. 2018, 18:35.

_____. Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia. ISSN 0103-9865, 2004.

_____. Seis maiores estados produtores dos Cafés do Brasil atingiram 98% do volume da safra de 2017. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/31081641/seis-maioresetados-produtores-dos-cafes-do-brasil-atingiram-98-do-volume-da-safra-de-2017>, acesso em: 13 de jun. 2019, 09:24.

ENCARNAÇÃO, R.O.; LIMA, D.R. Café & Saúde Humana. Consórcio brasileiro de pesquisa e desenvolvimento do café. Empresa Brasileira de pesquisa agropecuária, ISSN 1678-1694, 2003.

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

EVANS, E.; GABRIEL, E.F.M.; BENAVIDEZ, T.E. Modification of microfluidic paper-based devices with silica nanoparticles. *Analyst*, v. 139, p. 5560-5567, 2014.

FAGGAN, E.B.; SOUZA, C.H.E.; PEREIRA, N.M.B.; MACHADO, V.J. Efeito do tempo de formação do grão de café (*Coffea sp*) na qualidade da bebida. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 27, n. 5, p. 729-738, Sept./Oct. 2011.

FERREIRA, L.H.; HARTWING, D.R.; OLIVEIRA, R.C. Ensino Experimental de Química: Uma Abordagem Investigativa Contextualizada. *Revista Química Nova na Escola*, v. 32, n. 2, p. 101-106, 2010.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. *Alim. Nutr.*, Araraquara v.18, n.2, p. 229-235, 2007.

GARRUTI, R.S.; GOMES, A.G. Influência do estágio de maturação sobre a qualidade da bebida do café na região do Vale do Paraíba. *Bragantia*, Campinas, v. 20, p. 989- 995, 1961.

GAWLIK-DZIKI, U., SWIECA, M.; DZIKI, D.; KOWALSKA, I.; PECIO, L.; DURAK, A.; SECZYK, L. Lipoxigenase inhibitors and antioxidants from green coffeemechanism of action in the light of potential bioaccessibility. *Food Research International*, v. 61, p. 48-55, 2014.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOTTELAND, M.; DE PABLO, S. Some trues concerning coffee. *Rev. chil. nutr.*, Santiago, v. 34, n. 2, p. 105-115, 2007. Disponível em: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071775182007000200002&lng=es&nrm=iso, acesso em: 13 jun. 2019.

HELPER G.A.; MAGNUS, V.S.; BÖCK, F.C.; TEICHMANN, A.; FERRÃO, M.F.; COSTA, A. B. PhotoMetrix: An Application for Univariate Calibration and Principal Components Analysis Using Colorimetry on Mobile Devices. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 28, n. 2, p. 328-335, 2017.

INTARAVANNE, Y.; SUMRIDDETKAJORN, S.; NUKEAW, J. Cell phone-based two-dimensional spectral analysis for banana ripeness estimation. *Sensors Actuators, B Chem*, v. 168, p. 390-394, 2012.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Coffee market report December 2016. Disponível em: <<http://www.reportlinker.com/market-report/Soft-Jacques,A.C.>>. Acesso em: 11 dez. 2018, 19:10.

ISMAIL, A.; MARJAN, Z.M.; FOONG, C.W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chem.*, v. 87, p. 581-586, 2004.

KOHL, S.K.; LANDMARK, J.D.; STICKLE, D.F. Demonstration of absorbance using digital color image analysis and colored solutions. *J Chem. Educ.*, v. 83, p. 644, 2006.

LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; BESSON, C.; SCALBERT, A.; J. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. *Nutr.*, 136, 1192. *Mellitus. Ann. Intern. Med.*, v. 1409, n.1, p. 1-8, 2006.

LOPEZ-MOLINERO, A.; LIÑAN, D.; SIPIERA, D.; FALCON R. Chemometric interpretation of digital image colorimetry. Application for titanium determination in plastics. *Microchem J* 96:380–385, 2010.

LYRA, W.S.; DOS SANTOS, V.B.; DIONIZIO, AGG. Digital imagebased flame emission spectrometry. *Talanta*, v. 77, p. 1584-1589, 2009.

LYRA, W.S.; DINIZ, P.H.G.D.; LEMOS, S.G. Indirect determination of sodium diclofenac, sodium dipyrone and calcium gluconate in injection drugs using digital image-based (webcam) flame emission spectrometric method. *Anal Methods*, v. 3, p. 1975-1980, 2011.

MACEDO DOS SANTOS, P; PEREIRA-FILHO, ER. Digital image analysis—an alternative tool for monitoring milk authenticity. *Anal Methods*, v. 5, p. 3669-3674, 2013.

MARTINS, D.; NUNEZ, C.V. Secondary Metabolites from Rubiaceae Species. *Molecules*, v. 20, p. 13422-13495, 2015.

MESSINA, G.; ZANNELLA, C.; MONDA, V.; DATO, A.; LICCARDO, D.; DE BLASIO, S.; CIBELLI, G. The beneficial effects of coffee in human nutrition. *Biology and Medicine*, v. 7, p. 1, 2015.

MONOŠÍK, R., DOS SANTOS, V.B.; ANGNES, L. A simple paper-strip colorimetric method utilizing dehydrogenase enzymes for analysis of food components. *Anal Methods*, v. 7, p. 8177–8184, 2015.

MONTEIRO, M.C.; TRUGO, L.C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quim. Nova*, v. 28, n. 4, p. 637-641, 2005.

MORAIS, S.A. L.; AQUINO, F.J.T.; NASCIMENTO, P.M.; NASCIMENTO, E.A.; CHANG, R. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido a diferentes graus de torra. *Quím. Nova* [online], v. 32, n. 2, p. 327-331, 2009.

NARDINI, M.; CIRILLO, E.; SCACCINI, C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 50, n. 20, p. 5735-5741, 2002.

NETO, G.F.S.; FONSECA, A.; BRAGA, J.W.B. Classificação de Águas Minerais Baseada em Imagem Digitais Obtidas por Smartphone. *Quim nova*, v. 39, n.7, p. 876-88, 2016.

OLIVEIRA, L.F.; CANEVARI, N.T.; JESUS, A.M.D.; PEREIRA-FILHO, E.R. Uso de

imagens digitais e Análise de Componentes Principais na identificação dos níveis de Cr (VI) em amostras de solos. *Revista Virtual de Química*. *Revista Virtual de Química*, v. 5, p. 169, 2013.

PARLIAMENT, T.H. An overview of coffee roasting. In: PARLIAMENT, T.H.; CHITANG, H.; SCHIBERLE, P. (Ed.) *Caffeinated beverages: health benefits, physiological effects and chemistry*. Washington, DC: American Chemical Society, p.188-201. (ACS Symposium Series, 754), 2000.

PAQUET-DURAND, O.; SOLLE, D.; SCHIRMER, M. Monitoring baking processes of bread rolls by digital image analysis. *J Food Eng.*, v. 111, p. 425–431, 2012.

PEREIRA, D.M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J.A.; ANDRADE, P.B. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, v.14, p.2202-2211, 2009.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M.E.;

PETERS, K.L.; CORBIN, I.; KAUFMAN, L.M. Simultaneous colorimetric detection of improvised explosive compounds using microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs). *Anal Methods*, v. 7, p. 63–70, 2015.

POZO, J.I. (Org.). *A solução de problemas*. Porto Alegre: Artmed, 1998.

RAMALAKSHMI, K.; RAO, L.J.M.; TAKANO-ISHIKAWA, Y.; GOTO, M. Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. *Food Chemistry*, London, v. 115, n. 1, p. 79-85, 2009.

ROGINSKI, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v. 92, p. 235-254, 2005.

SANDHAR, H.; KUMAR, B.; PRASHER, S.; TIWARI, P.; SALHAN, M.; SHARMA, P.A. Review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, v. 1, p. 25-41, 2011.

SCHWARZ, K.; BERTELSEN, G.; NISSEN, L.R.; GARDNER, P.T.; HEINONEN, M.I.; HOPIA, A.; LAMBELET, P.; MCPHAIL, D.; SKIBSTED, L.H.; TIJBURG, L. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur. Food Res. Technol.*, v. 212, n. 3, p. 319-328, 2001.

SENA, R.C.; SOARES, M.; PEREIRA, M.L.O. A simple method based on the application of a CCD camera as a sensor to detect low concentrations of barium sulfate in suspension. *Sensors*, v. 11, p. 864–875, 2011.

SOUZA, G.S.; SILVA, S.A.; LIMA, J.S.S.; FILHO, A.C.V.; INFANTINI, M.B.; KROHLING, C.A. Avanços na mecanização do cafeeiro conilon. *Incaper em Revista*, Vitória, v. 9, p. 31-41, jan/dez 2018. ISSN 2179-5304, 2018.

SOUZA, C. J.; PEZZA, H.R.; PEZZA, L. A simple and green analytical method for determination of copper (II) in whisky and sugarcane spirit by diffuse reflectance spectroscopy. *Anal. Methods*, v. 8, p. 1867-1875, 2016.

SOROURADDIN, M.; SAADATI, M.; MIRABI, F. Simultaneous determination of some common food dyes in commercial products by digital image analysis. *J Food Drug Anal.*, v. 23, p. 447-452, 2015.

STALMACH, A.; MULLEN, W.; NAGAI, C.; CROZIER, A. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. *Braz. J. Plant. Physiol.*, v. 18, n. 1, p. 253-262, 2006.

SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. *Unopar, Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, v. 14, p. 263-9, 2012.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. *Fisiologia vegetal*. Trad. SANTARÉM, E. R. et al., 3° ed., Porto Alegre: Artemed, 719, 2004.

TORRES, A.R.; LYRA, W.S.; ANDRADE, S.I.E.; ANDRADE, R.A.N.; SILVA, E.C.; ARAUJO, M.C.U.; GAIAO, E.N.A. Digital image-based method for determining of total acidity in red wines using acid - base titration without indicator. *Talanta*, v. 84, p. 601-606, 2011.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Food Chem.*, v. 43, p. 27-32, 1995.

Apêndice A

