



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DOS RESÍDUOS (CASCA E PÓ ORGÂNICO) DE
CAFÉ (*Coffea arabica* L.) COMO PROVÁVEL FONTE DE
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

Janaina Baggio

Florianópolis

2006

Janaina Baggio

**AVALIAÇÃO DOS RESÍDUOS (CASCA E PÓ ORGÂNICO) DE
CAFÉ (*Coffea arabica* L.) COMO PROVÁVEL FONTE DE
SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos, da Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito final
para a obtenção do Grau de Mestre em
Ciência dos Alimentos.**

**Orientador: Prof^a. Dra. Roseane Fett
Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Mancini Filho**

Florianópolis

2006

Quero-te não só por como és, mas por como sou quando estou contigo.

Ao amor da minha vida, Pablo,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Roseane Fett, minha orientadora, por ter me recebido em seu laboratório, pela confiança e orientação.

Ao Prof. Jorge Mancini Filho, meu co-orientador, por ter me aberto incondicionalmente as portas de seu laboratório, pela dedicação, entrega e atenção. Pelo grande exemplo de pessoa e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de ensino outorgada.

À Maria de Lourdes Giada, por me receber tão abertamente no Laboratório de Lípidos da USP, e por ajudar a direcionar meu trabalho.

A todos do Laboratório de Lípidos da USP, pela sempre carinhosa recepção e colaboração, em especial ao Alessandro, pela realização das análises cromatográficas, e à Fabiana, que por diversas vezes atendeu prontamente as minhas dúvidas e trabalhou em minhas análises, inclusive aos domingos! Obrigada pelo carinho e amizade.

Aos meus queridos amigos da pós-graduação, em especial a Bianca, Nei, Michele, Erika, Paula, Fábio e Leti, pelos momentos divertidos durante as aulas, os almoços no RU, as festinhas na cozinha, os cafezinhos no bar repletos de risadas, reclamações e lamúrias! Foram ótimos momentos em meio a tanto trabalho, que irei sempre lembrar com muito carinho...

A Luciano Gonzaga, que caiu no Laboratório de Química de Alimentos como um anjo da guarda, socorrendo a todos com sua imensa experiência na área de análise de alimentos, com sua atenção, conselhos e também, claro, pondo a mão na massa!

Ao seu Bento, o nosso honrado “quebra-galhos”, que sempre nos atende com presteza e bom humor.

Aos Cupani, Dr. Alberto e dona Alícia, meus sogros, Gabi, Alícia, Gustavo e Beto, por me receberem com um dos seus, por substituírem meu lar, no momento distante. Obrigada pela torcida!

À Babi, minha grande e verdadeira amiga, desde os velhos tempos de calouras, parceira em todos os momentos... por me abrigar em sua casa durante minha passagem por São Paulo, pela força, pelo interesse, pela entrega. Somos a maior prova de que uma amizade verdadeira supera qualquer tempo e distância!

Aos meus amados pais, Wagner e Máires, por terem acreditado e financiado meus estudos, pela paciência digna apenas dos pais, pelo amor incondicional, pelo orgulho que tenho da minha formação... obrigada por me fazerem sentir especial.

À pessoa mais especial da minha vida, Pablo, pelas inúmeras chances dadas, pela compreensão, pelo ombro acolhedor, pela paciência, por me fazer acreditar em mim, nas minhas capacidades, e por fazer cada dia ao teu lado mais especial. Obrigada pelos conselhos, pela companhia, pela ajuda direta em todos os meus trabalhos, e pelos momentos prazerosos que vivemos juntos nesses anos.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1	3
1.1 Radicais livres	4
1.2 Antioxidantes	7
1.3 Substâncias Bioativas	9
1.3.1 Flavonóides	9
1.3.2 Polifenóis	11
1.4 Métodos para a Avaliação da Atividade Antioxidante	12
1.5 Café (Rubiaceae, gênero <i>Coffea</i>)	14
1.6 Beneficiamento	17
1.7 Rebenefício	19
1.8 Casca de café	20
CAPÍTULO 2	23
2.1 Amostras	24
2.2 Caracterização Físico-química da Matéria-prima	24
2.2.1 Umidade	24
2.2.2 Resíduo Mineral Fixo (Cinzas)	25
2.2.3 Fração Protéica	25
2.2.4 Lípidos Totais	25
2.2.5 Fibra Total	25
2.2.6 Carboidratos	26
2.2.7 Cafeína	26
2.3 Preparação das amostras	26
2.4 Obtenção dos extratos da casca e do pó	26
2.5 Método Sistema β-caroteno/ ácido linoléico (sistema aquoso)	28
2.6 Método ABTS	28
2.7 Fenólicos Totais	29
2.8 Determinação dos Principais Compostos Fenólicos	29
2.8.1 Extração de Ácidos Fenólicos Livres	30
2.8.2 Extração de Ácidos Fenólicos de Ésteres Solúveis	30
2.8.3 Extração de Ácidos Fenólicos de Ésteres Insolúveis	32
2.9 Identificação dos Ácidos Fenólicos por Cromatografia Gasosa	32

2.10 Análise Estatística dos Dados	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO 3	41
CAPÍTULO 4	59
CONCLUSÕES	77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mecanismo de oxidação lipídica.....	5
Figura 2. Mecanismo antioxidante dos compostos fenólicos.....	8
Figura 3. Família dos maiores grupos de flavonóides da dieta.	10
Figura 4. Consumo interno de café em sacas e per capita - Brasil.....	15
Figura 5. Evolução do consumo interno de café no Brasil.....	16
Figura 6. Seqüência de operações por via seca.	18
Figura 7. Seqüência de operações por via úmida.	18
Figura 8. Cascas de café das Cooperativas Cooxupé, Garcafé e Pó orgânico (esquerda para direita).....	24
Figura 9. Processo de extração seqüencial.	27
Figura 10. Processo de extração dos ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e insolúveis.....	31
Figura 11. Estrutura química dos ácidos fenólicos utilizados como padrão para a análise cromatográfica.....	33
Tabela 1. Composição Bromatológica da Casca de Café.....	21
Tabela 2. Composição em Minerais da Casca de Café.....	22
Tabela 3. Ácidos fenólicos utilizados para o preparo da solução padrão para análise cromatográfica.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	[2,2' - azinobis – (3-etilbenzotiazonelina-6-ácido sulfônico)]
BHT	Butil Hidroxi Tolueno
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
GAE	Gallic Acid Equivalent
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

BAGGIO, J. **Avaliação dos resíduos (casca e pó orgânico) de café (*Coffea arabica* L.) como provável fonte de substâncias bioativas**. 2006. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis - SC.

RESUMO

Os extratos aquoso, alcoólico e etéreo de dois subprodutos gerados pela indústria cafeeira (cascas e pó orgânico) foram avaliados quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, com o objetivo de observar a influência de cada solvente extrator. Para isto, os resíduos, cedidos pelas Companhias Cooxupé (Guaxupé - MG) e Garcafé (Garça - SP), foram submetidos ao método de Folin-Ciocalteu, que quantifica os fenólicos totais, ao método radicalar ABTS [2,2'-azinobis - (3-etilbenzotiazonelina-6-ácido sulfônico)] e ao sistema de co-oxidação β -caroteno/ ácido linoléico, que medem a atividade antioxidante de cada extrato, tendo sido o último também utilizado para verificar o sinergismo entre as amostras e o antioxidante sintético BHT (butil hidroxi tolueno). Os resultados indicaram uma alta atividade antioxidante nos extratos aquosos das cascas de café; o pó orgânico apresentou capacidade antioxidante em todos os extratos, e a ordem foi: etéreo > alcoólico > aquoso. Foi observada uma correlação linear entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante ($R^2 = 0,9897$). Também foi demonstrado o sinergismo entre o extrato aquoso da casca da Companhia Cooxupé a 200 ppm e o BHT, que mostrou uma inibição da oxidação de 88%. Por ter sido a única amostra a apresentar atividade em todos os extratos, o pó orgânico de café foi submetido a um fracionamento, com o intuito de identificar quais os ácidos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante. Estas frações foram submetidas à análise cromatográfica, além da avaliação da atividade antioxidante e do conteúdo de fenólicos totais. Verificou-se que as frações do pó orgânico têm alto conteúdo de fenólicos, variando de 2.013,26 a 4.620,94 mg GAE (equivalentes em ácido gálico) por 100g de amostra (peso seco). As frações de ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e ésteres insolúveis de ácidos fenólicos foram submetidas à cromatografia gasosa, e a quantificação foi baseada nos tempos de retenção dos padrões de ácidos fenólicos. O ácido salicílico foi predominante em todas as frações, com valores acima de 90%. Apesar disto, estas altas concentrações não parecem ser as responsáveis pela atividade antioxidante total. Os resultados apresentados por estes estudos *in vitro* indicam a possibilidade da utilização destes subprodutos como substituintes dos antioxidantes sintéticos amplamente empregados pelas indústrias, considerando-se a atual preocupação dos consumidores com os efeitos deletérios destes compostos.

Palavras-chave: resíduos agroindustriais, café, polifenóis, atividade antioxidante

BAGGIO, J. **Evaluation of coffee (*Coffea arabica* L.) residues (peels and organic dust) as a probable source of bioactive compounds.** 2006. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis - SC.

ABSTRACT

The aqueous, alcoholic and etheric extracts of two by-products generated by the coffee industry (peels and organic dust) had their total phenolic content and antioxidant activity evaluated, and the objective was to observe the influence of each extraction solvent. Thus, the residues given by the Companies Cooxupé (Guaxupé - MG) and Garcafé (Garça - SP), were submitted to the method Folin-Ciocalteu, which quantifies the total phenolics, to the method ABTS [2,2'-azinobis - (3-etilbenzotiazonelina-6-ácido sulfônico)] and to the co-oxidation system β -carotene/linoleic acid, which measure the antioxidant activity of each extract, have been the last also used to verify the synergism between the samples and the synthetic antioxidant BHT (butylated hydroxytoluene). The results indicated a high antioxidant activity in the aqueous extracts of coffee peels; the organic dust displayed antioxidant capacity in all extracts, and the order was: etheric > alcoholic > aqueous. A linear correlation was observed between the total phenolic content and the antioxidant activity ($R^2 = 0.9897$). It was also demonstrated the synergism between the aqueous extract of the coffee peels from Cooxupé at 200 ppm and BHT, showing 88% of inhibition of oxidation. Since the organic dust was the only sample presenting activity in all extracts, it was submitted to a fractionation, with the aim of identifying which phenolic acids were responsible for the antioxidant activity. These fractions were submitted to chromatographic analysis, and also for the evaluation of antioxidant activity and total phenolics. It was verified that the organic dust fractions have high contents of phenolics, ranging from 2,013.26 to 4,620.94 mg GAE (gallic acid equivalents) per 100g dry matter. The free phenolic acid, soluble esters and insoluble-bound fractions were submitted to gas chromatography, and the quantification was based on the retention times of the phenolic acids standards. Salicylic acid was predominant in all fractions, presenting values over than 90%. However, these high concentrations don't seem to be responsible for the total antioxidant activity. The results presented in these *in vitro* studies indicate the possibility of using these by-products as substitutes for the synthetic antioxidants widely used by the industries, concerning the consumers preoccupation related to their deleterious effects.

Keywords: industrial residues, coffee, polyphenols, antioxidant activity

INTRODUÇÃO

Os subprodutos agrícolas contêm uma variedade de espécies biologicamente ativas, ricas em polifenóis antioxidantes, que na maioria das vezes é descartada (RICE-EVANS 2001). O processamento de alimentos derivados de plantas resulta na produção de subprodutos, os quais são fontes de compostos bioativos, incluindo os compostos fenólicos (SCHIEBER, STINTZING, CARLE, 2001). Muitos processos de oxidação indesejados, incluindo a deterioração de alimentos e uma variedade de doenças, envolvem radicais livres. Os polifenóis presentes nos subprodutos agroindustriais são produtos com potencial valor agregado, com aplicação como aditivos alimentícios naturais e agentes que previnem doenças. Antioxidantes naturais dos extratos de plantas têm se tornado atrativos devido ao interesse dos consumidores com relação à segurança dos antioxidantes sintéticos nos alimentos. Extratos de frutas, vegetais e cereais (KÄHKÖNEN, HOPIA e HEINONEN, 2001; TSUSHIDA, SUZUKI e KUROGI, 1994; VELIOGLU et al., 1998) e seus subprodutos, tais como as cascas dos cereais (AMAROWICZ, NACZK e SHAHIDI, 2000) e cascas de maçã (WOLFE, WU e LIU, 2003) mostraram atividade antioxidante efetiva em sistema modelo.

Antioxidantes naturais foram também testados em sistemas alimentícios reais. Por exemplo, as catequinas dos chás retardaram significativamente a oxidação lipídica em carne de frango (TANG et al., 2002).

O Brasil é o maior produtor de café no mundo, com uma produção anual em torno de 30 milhões de sacas. O processamento do café gera grandes quantidades de resíduo sólido (casca ou polpa, dependendo do processo). Atualmente, não existe nenhuma aplicação para a casca dos grãos de café, o que a torna um grande problema ambiental. Mesmo sendo um excelente adubo orgânico, uma parcela da casca de café vem sendo desprezada por agricultores que não têm conhecimento do seu grande fornecimento de matéria orgânica (BADOCHA, COSTA, LEÔNIDAS, 2003; VANDERBERGHE et al., 1999). Segundo dados da Associação Brasileira de Exportadores de Café (Abecafé), o Brasil é o maior consumidor e exportador mundial de café. Considerando-se que a casca constitui cerca de 50% do grão seco, grandes volumes são gerados anualmente no país. Estes resíduos apresentam alto potencial para uso na alimentação animal ou para uso como substrato na obtenção de produtos e biomoléculas de elevado valor agregado (SOCCOL et al., 1999).

O grão do fruto do café da espécie *Coffea arabica* L. caracteriza-se pelo alto conteúdo de polifenóis e, em particular, dos ácidos clorogênicos (BARCELOS et al., 2001). Embora os antioxidantes sintéticos sejam amplamente utilizados pelas indústrias alimentícias, existem algumas discussões sobre a segurança e os efeitos adversos destas substâncias quando usadas como aditivos alimentícios. Um grande número de plantas medicinais e aromáticas contém compostos químicos que exibem propriedades antioxidantes, bem como vitaminas e polifenóis, e estes apresentam papel importante na prevenção das doenças associadas aos radicais livres (SOARES, ANDREAZZA, SALVADOR, 2003; MILIAUSKAS, VENSKUTONIS, VAN BEEK, 2004).

Procurando contribuir para o conhecimento do potencial dos resíduos sólidos da agroindústria do café (*Coffea arabica* L.), o presente trabalho teve como objetivos:

Objetivo Geral

Avaliação da atividade antioxidante dos resíduos sólidos da agroindústria do café (*Coffea arabica* L.).

Objetivos Específicos

- Caracterização físico-química dos resíduos sólidos do café (casca e pó orgânico).
- Avaliar e comparar a atividade antioxidante *in vitro* destes resíduos através de dois sistemas distintos: sistema β -caroteno/ ácido linoléico e ABTS, bem como o sinergismo entre os extratos dos resíduos e um antioxidante sintético, o BHT.
- Quantificar e identificar os compostos fenólicos e suas frações: ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e insolúveis, presentes na casca e no pó orgânico de café.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Radicais livres

Radical livre é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos. Isso determina uma atração para um campo magnético, o que pode torná-lo altamente reativo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo a sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (HALLIWELL, 1994).

O elétron livre, que caracteriza o radical livre, pode estar centrado em um átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição. Pelo fato da molécula de oxigênio ser um bi-radical (possuir dois elétrons livres nos orbitais *p* antiligantes), o oxigênio reage preferencialmente com moléculas de configuração eletrônica semelhante. Como a maioria das biomoléculas não são bi-radicais, possuindo grande número de ligações covalentes, o oxigênio fica impedido (por restrição de “spin”) de reagir com as mesmas, evitando assim que alvos celulares importantes sejam lesados. No entanto, o oxigênio pode dar origem a diversas espécies reativas, seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. Na forma de oxigênio singlete a restrição de “spin” desaparece, conferindo-lhe um maior poder oxidante (HALLIWELL e GUTTERDGE, 1991; SIES e STAHL, 1995).

Na estrutura de átomos e moléculas, os elétrons normalmente associam-se em pares, com cada par movimentando-se dentro de uma região definida no espaço ao redor do núcleo. Este espaço refere-se a um orbital atômico ou molecular. Um radical livre é qualquer espécie capaz de existir independentemente, e que contém um ou mais elétrons não-pareados; são os principais responsáveis pela peroxidação lipídica (Figura 1) (HALLIWELL, 1994).

Os principais radicais formados *in vivo* são:

- Radical hidroxil: proveniente da exposição dos organismos vivos à radiação ionizante, reage em uma taxa de difusão controlada com quase todas as moléculas das células vivas, como proteínas, carboidratos, DNA e lipídios.
- Óxido nítrico: sintetizado pelas células endoteliais vasculares, fagócitos e certas células cerebrais. Pode estar envolvido na morte de parasitas por macrófagos.

- Superóxido: pode ser gerado pela autooxidação; algumas destas reações *in vitro* dependem da presença de traços de íons metálicos catalíticos. É mais reativo em meio lipídico, e é capaz de gerar outras espécies de maior reatividade.
- Peróxido de hidrogênio: não-radical formado pela reação da SOD (superóxido dismutase), que na presença de metais de transição, como ferro e cobre, pode produzir o radical hidroxil, altamente reativo (HALLIWELL, 1994; RAYMUNDO, 2003).

Destes, o radical hidroxila é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares e o peróxido de hidrogênio, apesar de não ser considerado um potente radical livre, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA (ANDERSON, 2000).

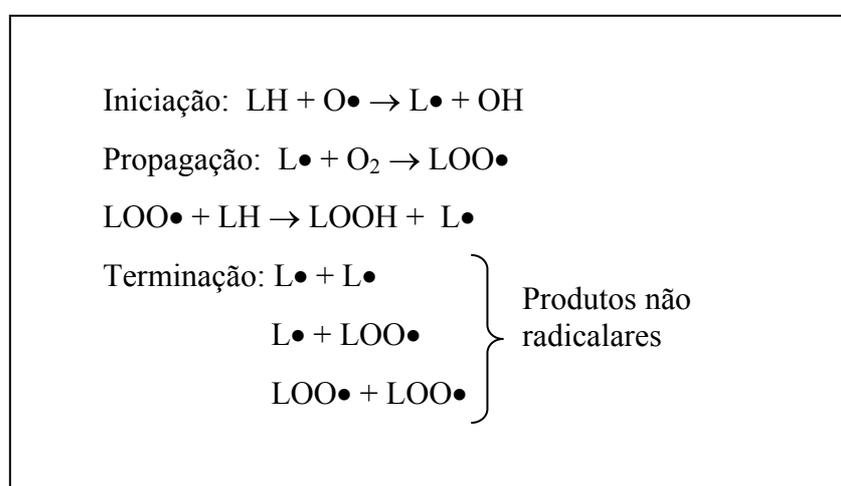


Figura 1. Mecanismo de oxidação lipídica

Fonte: FENNEMA, 2000.

É difícil explicar a origem dos primeiros radicais livres necessários para iniciar o processo de lipoperoxidação; é pouco provável que esta iniciação aconteça mediante um ataque direto do oxigênio, na sua forma mais estável (triplete), às duplas ligações dos ácidos graxos (RH), já que as duplas C = C dos RH e hidroperóxidos estão no estado singlete, e desta forma esta reação não obedeceria à lei de conservação do spin. Uma explicação mais satisfatória é a de que o oxigênio singlete (1O_2), uma das espécies ativas no processo de deterioração fotooxidativa, seja o responsável pela iniciação. O oxigênio no estado singlete é mais eletrofílico do que o mesmo no estado triplete, portanto, pode reagir mais rapidamente (1.500 vezes mais rápido que o 3O_2) com zonas de densidade eletrônica alta, como as ligações C = C (FENNEMA, 2000).

Apesar dos seres humanos dependerem da oxidação biológica como fonte de energia para a sobrevivência e atividade, a ação do oxigênio é realmente ambígua. A reatividade poderosa das espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^{\bullet}), pode causar danos funcionais ao homem, pois são constantemente formadas no corpo humano (HAMID et al., 2002). Os danos oxidativos aos tecidos biológicos são modulados por muitos fatores, incluindo a composição do substrato, concentração de oxigênio e pró-oxidantes. O desbalanço homeostático entre a produção de EROs e os sistemas de defesa antioxidantes determina o grau do estresse oxidativo sofrido pelas células. A produção de muitas EROs pode resultar em danos para as proteínas, lipídios e DNA celular, enquanto a baixa produção pode interromper os efeitos fisiológicos necessários dos oxidantes para a proliferação celular e defesa do organismo (DÁVALOS, GOMEZ-CORDOVÉS, BARTOLOMÉ, 2003).

A produção excessiva de radicais livres pode conduzir a diversas formas de dano celular e sua cronicidade pode estar envolvida com a etiogênese ou com o desenvolvimento de numerosas doenças (SPEISKY e JIMÉNEZ, 2000).

Os radicais livres estão associados às doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, queda do sistema imunológico, disfunções cerebrais, catarata, entre outras, devido aos danos oxidativos que estes provocam no DNA, proteínas e outras macromoléculas que são acumuladas com a idade; são geralmente menos estáveis do que os compostos não-radicaais, embora suas reatividades variem (HALLIWELL, 1994; ARUOMA, 1994; CHEUNG, CHEUNG, OOI, 2003).

Os sistemas biológicos controlam estes fatores oxidativos via diversos mecanismos antioxidativos que restringem a reatividade dos radicais livres. Muitos componentes da dieta, essenciais ou não, podem contribuir para estes sistemas de defesa antioxidante (DECKER, 1997). Embora os organismos tenham seus próprios sistemas para destruir as EROs, suas funções são limitadas, especialmente em condições de estresse oxidativo severo (HAMID et al., 2002; ARUOMA, 1998).

O papel das reações dos radicais livres nas doenças humanas, biologia, toxicologia, e na deterioração de alimentos tornou-se uma área de intenso interesse. Em destaque, a reação de lipoperoxidação dos radicais livres como um ponto importante na indústria alimentícia, onde a oxidação é minimizada em alimentos contendo gorduras através do uso de antioxidantes durante a industrialização (ARUOMA, 1994).

Os mecanismos endógenos de defesa (ou mediadores de redox tais como: superóxido dismutase, catalase, peroxidase e metaloproteínas) podem ser auxiliados favoravelmente com a introdução de antioxidantes por meio da dieta (BRENNAN e PAGLIARINI, 2001; YILDIRIM, MAVI e KARA, 2001).

1.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (NAMIKI, 1990; SIMIC e JAVANOVIC, 1994).

Um antioxidante é um composto que, em baixas concentrações, protege os sistemas biológicos contra os potenciais efeitos nocivos dos processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (ARNAO, CANO, ACOSTA, 2001).

Estes compostos podem agir sinergicamente devido às diferenças na reatividade com os diferentes oxidantes, gerando assim uma melhor proteção em combinação do que cada um individualmente; o sinergismo pode ser também devido à interação direta entre os antioxidantes (MORTENSEN, SKIBSTED, 1997). Os antioxidantes podem estar em combinação com quelantes de metais, como o ácido cítrico, o fosfórico, os polifosfatos e o ácido ascórbico. Este último, como sinergista, pode desempenhar mais de um papel, e atuar como doador de elétrons, quelante de metais, seqüestrador de oxigênio singlete, além de contribuir para a formação de produtos do escurecimento com atividade antioxidante (FENNEMA, 2000).

Um grande número de plantas aromáticas e medicinais contém compostos químicos que exibem propriedades antioxidantes, e estes efeitos são devidos principalmente aos compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos fenólicos (PIETTA, SIMONETTI, MAURI, 1998; MILIAUSKAS, VENSKUTONIS, VAN BEEK, 2004).

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (Figura 2). Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel

aromático apresentada por estas substâncias (NAWAR, 1985). Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes na prevenção da oxidação lipídica; entretanto, poucos são os permitidos para o uso em alimentos, devido principalmente a sua toxicidade (SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992).

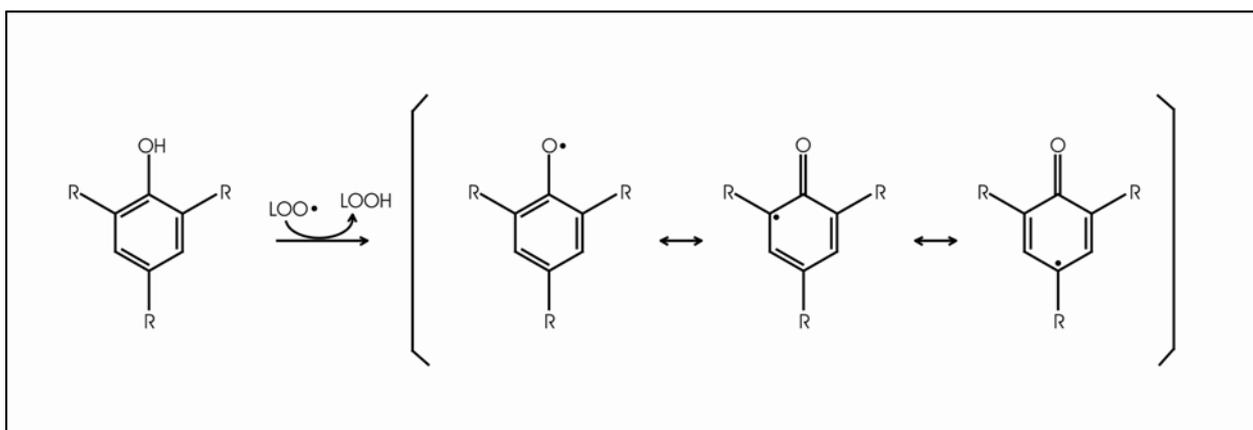


Figura 2. Mecanismo antioxidante dos compostos fenólicos

Fonte: WONG, 1995.

Eles estão sendo crescentemente reconhecidos como importantes promotores da saúde em condições tais como os problemas cardiovasculares, muitas formas de câncer e até mesmo o envelhecimento. Os antioxidantes são capazes de reduzir os efeitos dos radicais livres formados no organismo, tanto pela exposição aos poluentes ambientais, quanto pela queda das defesas do organismo ao tentar lidar com a produção natural destes compostos (GOH, BARLOW e YONG, 2003).

Fontes potenciais de compostos antioxidantes têm sido estudadas em diversos tipos de plantas, como vegetais, frutas, folhas, sementes, cereais e raízes, pimentas e ervas, além de fármacos derivados de plantas (KÄHKÖNEN et al., 1999); o consumo de frutas, vegetais, vinhos tintos e sucos fornece proteção contra várias doenças, incluindo o câncer, doenças cardio e cerebrovasculares. Esta proteção pode ser explicada pela capacidade que os antioxidantes das plantas têm de seqüestrar radicais livres, que são responsáveis pelos danos oxidativos aos lípidios, proteínas e ácidos nucleicos (CHEUNG, CHEUNG, OOI, 2003).

Nos últimos anos, a preocupação constante de proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade levou à adoção de medidas que permitem reduzir a oxidação durante as fases de processamento e armazenamento dos produtos. Deste conjunto de ações, a adição de compostos antioxidantes é, sem dúvida, uma prática corrente, razão que justifica o atual interesse pela

pesquisa de novos compostos com capacidade antioxidante (MOREIRA, MANCINI FILHO, 2003).

Embora os antioxidantes sintéticos sejam amplamente utilizados pela indústria alimentícia, existem alguns argumentos com relação a sua segurança e efeitos adversos destas substâncias quando usadas como aditivos alimentares; os antioxidantes naturais, como as vitaminas e os polifenóis, podem apresentar papéis importantes na prevenção de doenças associadas aos radicais livres (SOARES, ANDREAZZA, SALVADOR, 2003).

1.3 Substâncias Bioativas

As substâncias bioativas podem ser definidas como nutrientes e/ ou não nutrientes com ação metabólica ou fisiológica específica. Apresentam também estas funções os probióticos, compostos por microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. Algumas destas substâncias bioativas já possuem alegações aprovadas: Ácidos fenólicos, ácidos graxos (monoinsaturados, ω -3 e ω -6), bicarbonato de sódio, cafeína, estearato de sódio, frutooligossacarídeos (FOS) e inulina, fibras, fibra da aveia (β -glucanas), fitoesteróis, lactulose, licopeno, manitol, Psilium (*Plantago ovatae*), sorbitol, quitosana e xilitol (ANVISA, 2004).

Estas substâncias bioativas podem exercer seus efeitos agindo como antioxidantes, ativando enzimas de detoxificação hepática, bloqueando a atividade de toxinas virais ou bacterianas, inibindo a absorção do colesterol, diminuindo a agregação plaquetária, ou destruindo bactérias gastrintestinais nocivas. Existem aproximadamente 120 alimentos naturais identificados que contém compostos bioativos, e podem assim ser chamados de “funcionais” (PENNINGTON, 2002).

1.3.1 Flavonóides

Os flavonóides das plantas são derivados difenilpropano que exercem uma gama de efeitos bioquímicos e farmacológicos (SKIBOLA, SMITH, 2000), e podem existir como agliconas, glicosídeos e derivados metilados. A glicosilação dos flavonóides reduz sua atividade quando comparados com suas agliconas correspondentes. Dependendo do grau de oxidação do anel

pirano central, eles podem ser divididos em diversas classes de flavonóides e compostos relacionados (Figura 3): flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavanas, flavanóis e antocianinas (SKERGET et al., 2004).

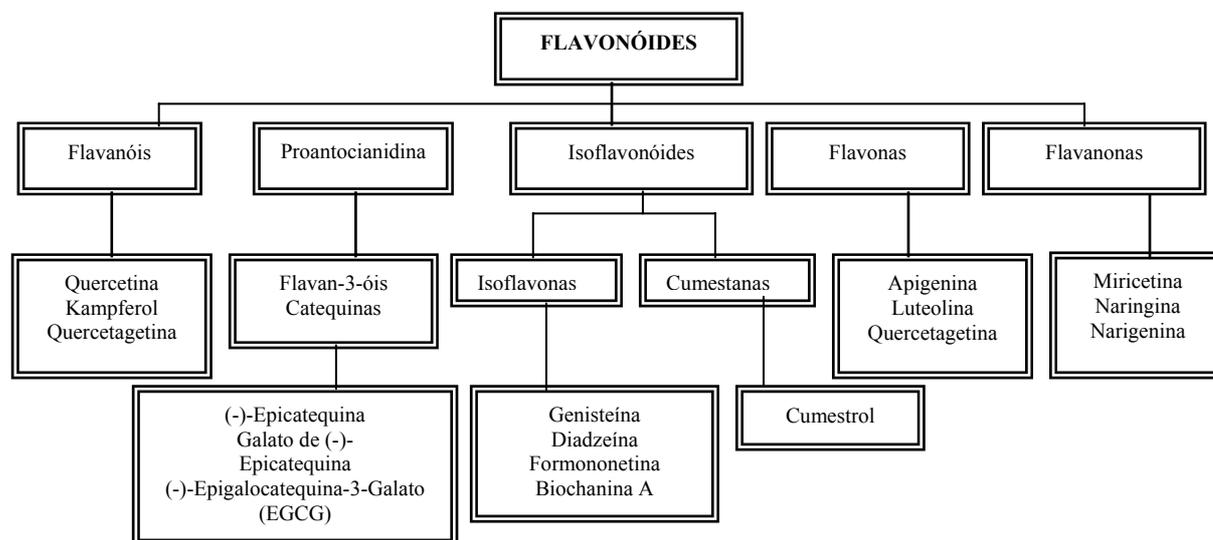


Figura 3. Família dos maiores grupos de flavonóides da dieta.

Fonte: SKIBOLA, SMITH, 2000.

Os flavonóides são uma classe de fenólicos secundários das plantas com propriedades antioxidantes e quelantes significativas. Na dieta humana, estão mais concentrados nas frutas, vegetais, vinhos, chás e cacau. Seus efeitos cardioprotetores são devido a sua habilidade de inibir a peroxidação lipídica, quelar metais e atenuar outros processos que envolvem as espécies reativas de oxigênio.

Os efeitos farmacológicos dos flavonóides são devidos à inibição de certas enzimas e ao seu poder antioxidante; embora exista um acordo geral sobre o excelente poder dos flavonóides em quelar metais e apresentar capacidade de ligar radicais, existe muita discussão e contradição sobre a relação entre a sua contribuição relativa e estrutura na atividade antioxidante (VAN ACKER et al., 1996).

A propriedade antioxidante dos flavonóides foi o primeiro mecanismo de ação estudado, particularmente com relação ao seu efeito protetor contra as doenças cardiovasculares. Os flavonóides têm se mostrado grandes seqüestradores dos principais tipos de moléculas oxidantes,

incluindo o oxigênio singlete e vários radicais livres envolvidos em diversas doenças (MONTORO et al., 2005).

1.3.2 Polifenóis

Os compostos fenólicos são um dos maiores grupos de componentes dietéticos não-essenciais que têm sido associados com a inibição da aterosclerose e do câncer (CHEUNG, CHEUNG, OOI, 2003).

Os ácidos fenólicos estão presentes em todos os alimentos derivados de plantas na maioria das dietas. A média de consumo de ácidos fenólicos de homens e mulheres foi indicada ser na ordem de 200 mg/ dia dentro dos limites de uma ampla faixa, dependendo das preferências e dos hábitos nutricionais. A maioria dos ácidos fenólicos presentes na dieta estão esterificados com açúcares, ácido quínico e outros compostos (NARDINI et al., 2002). Os fenólicos são considerados os componentes antioxidantes mais importantes das especiarias e outros materiais derivados das plantas, e uma grande correlação entre a concentração de fenólicos e a capacidade antioxidante total foi reportada (HU e SKIBSTED, 2002).

Porém, outros compostos da dieta, como as proteínas e metais, podem teoricamente prejudicar sua absorção por formarem complexos com os polifenóis. Devido à afinidade dos grupamentos hidroxil dos flavonóides pelos resíduos de prolina, a capacidade antioxidante dos galatos de catequina *in vitro* é atenuada pela presença de proteínas, tais como as β -caseínas (HEIM, TAGLIAFERRO, DENNIS, 2002).

Estes compostos compartilham da mesma estrutura básica que consiste de dois anéis aromáticos unidos numa estrutura cromanol por uma unidade com três carbonos; carregam uma ou mais hidroxilas, e podem também apresentar ésteres ou metil ésteres, sendo esta estrutura ideal para a captura de radicais livres (MEYER, HEINONEN, FRANKEL, 1998; RAYMUNDO, 2003).

As propriedades químicas dos polifenóis como sequestradores de radicais doadores de hidrogênio sugerem sua atividade antioxidante. Para que um polifenol possa ser definido como antioxidante é necessário satisfazer duas condições básicas: primeiro, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato, bloquear, retardar ou prevenir a autooxidação ou a oxidação mediada por um radical livre; segundo, o radical resultante formado após o sequestro deve ser estável nas ligações de hidrogênio intramoleculares. A atividade antioxidante dos

ácidos fenólicos e de seus ésteres depende do número de grupos hidroxila da molécula, e é reforçada pelo impedimento estérico (RICE-EVANS, MILLER, PAGANGA, 1996).

Os ácidos hidroxicinâmicos, tais como o ácido *p*-cumárico (4-ácido hidroxicinâmico), ácido caféico (3,4-ácido hidroxicinâmico), e o ácido ferúlico (4-hidroxi-3-ácido metoxicinâmico), são amplamente derivados de frutas, vegetais, grãos e café, e podem ocorrer na forma esterificada com ácido quínico ou glicose. Os mais familiares são os ácidos monocateoilquínico e dicafeoilquínico, sendo o ácido clorogênico predominante, particularmente nas frutas. Para o ácido clorogênico, foram relatados efeitos inibitórios da carcinogênese no intestino grosso, fígado e língua, além dos efeitos protetores sobre o estresse oxidativo *in vivo* (AZUMA et al., 2000).

1.4 Métodos para a Avaliação da Atividade Antioxidante

A determinação da capacidade antioxidante de uma amostra pode depender da tecnologia e do radical livre gerador ou oxidante utilizado nesta medida. Além disso, a comparação de diferentes métodos analíticos constitui um fator chave para ajudar os pesquisadores a escolherem um método e entender os resultados obtidos através do mesmo (CAO, PRIOR, 1998).

Poucos destes métodos cumprem os requisitos para a aplicabilidade em todas as maiores matrizes: compostos puros; misturas simples de compostos em solução; extratos alimentícios ricos em antioxidantes e bebidas; fluidos biológicos, especialmente plasma e saliva; em certas circunstâncias, o potencial antioxidante total pode ser realmente mais informativo do que os resultados dos constituintes antioxidantes individuais *per se* (RICE-EVANS, 1999).

Um método ideal para avaliar a atividade antioxidante de um composto deve ser rápido, reprodutível, requerer pequenas quantidades de reagentes, e não ser influenciado pelas propriedades físicas do composto (MARCO, 1968). Vários métodos têm sido aplicados para avaliar as atividades antioxidantes, mas deve-se notar que não existe um método universal simples através do qual as atividades antioxidantes possam ser medidas precisa e quantitativamente. Os métodos mais amplamente utilizados para avaliar a capacidade antioxidante são aqueles que envolvem a geração de espécies radicais, na presença de antioxidantes que determinam o desaparecimento destes radicais (ARNAO, 2000; NIKI, 2002).

Nos últimos anos, pesquisas mostraram que o consumo de alimentos ricos em polifenóis pode reduzir o risco do desenvolvimento de várias doenças. Entretanto, a grande diversidade química existente torna estes compostos com atividade antioxidante difíceis de separar, bem como

quantificar individualmente, o que levou ao aparecimento de vários ensaios para avaliação da atividade antioxidante em diferentes tipos de amostras biológicas *in vitro*, particularmente em matrizes complexas como vinhos e vegetais (GIADA e MANCINI-FILHO, 2004).

Vários métodos para avaliar a capacidade antioxidante são disponíveis. Eles incluem: métodos de espectroscopia de absorção no visível, medida da atividade seqüestradora de radicais livres em sistemas aquosos ou lipídicos (DPPH, ABTS), métodos de fluorescência, métodos de quimioluminescência, métodos eletroquímicos, que medem o consumo de oxigênio por lipídios peroxidáveis eletroquimicamente, e determinação do potencial redox dos antioxidantes (HU, SKIBSTED, 2002).

Muitos destes sistemas são ensaios de inibição, onde um radical livre é gerado e sua resposta é ligada a um ponto final, o qual pode ser observado e quantificado. A adição de um antioxidante suprime a resposta, em uma extensão e numa escala de tempo que depende da atividade antioxidante. Quando o consumo de um radical livre é medido através de uma reação dependente do tempo, o resultado obtido é relacionado com fatores estequiométricos, e não passa informações com respeito à atividade dos compostos testados. Esta falta de informação cinética é particularmente observada quando o método ABTS é empregado. O valor do índice obtido dependerá do antioxidante referência utilizado; para os antioxidantes solúveis em água, o inibidor mais empregado é o Trolox, um composto hidrossolúvel análogo à vitamina E (LLESUY et al., 2001).

Dois principais pontos devem ser considerados. Primeiro, a eficácia da ligação com o radical é determinada não apenas pela reatividade do antioxidante frente ao radical, mas também pela sua concentração. Segundo, esta eficácia depende da localização do antioxidante; assim, a atividade medida em soluções homogêneas deve ser tratada cuidadosamente. Deve-se considerar também o número de radicais que pode ser ligado, a destruição de radicais derivados de antioxidantes, a mobilidade, a interação com outros antioxidantes e o local de geração e reatividade do radical (NIKI, 2002).

A determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS está baseada em RE et al. (1999), usando o cátion radical $ABTS^{+\bullet}$. A determinação é feita por espectrofotometria e a atividade antioxidante é expressa em TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), isto é, micromoles de equivalentes Trolox por grama de amostra. Este método é simples, rápido, altamente reproduzível, e também é útil para determinar a atividade de ambas as espécies hidrofílicas e lipofílicas, cobrindo assim uma ampla faixa de aplicações possíveis (SACCHETTI et al., 2005).

No método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) a dosagem do poder antioxidante se baseia na medida da diminuição da concentração de um substrato oxidável, a fluoresceína, no decorrer do tempo, por fluorescência. Esta metodologia está baseada em OU, HAMPSCHEWOODILL e PRIOR (2001) e adaptado por HUANG et al. (2002) para análises em microplacas. A atividade antioxidante é expressa em micromoles de equivalentes Trolox por grama de amostra.

1.5 Café (Rubiaceae, gênero *Coffea*)

As áreas originais do café Arábica são as terras altas da Etiópia e Sudão; os árabes foram, portanto, os responsáveis pela domesticação do café Arábica, e os primeiros a difundir seu cultivo no continente asiático, possivelmente até a Índia. Porém, foram os holandeses que, a partir do final do século XVII, levaram mais longe a expansão desta cultura: na Ásia, a Ceilão e Java e, desta última ilha, ao continente americano, onde a introduziram no Suriname em 1718, utilizando o Jardim Botânico de Amsterdã como ponto de escala técnica. Efetivamente, de 1715 a 1718, a França estabeleceu, com sementes e material vegetativo obtido em Mocha, na Arábia, a primeira plantação na ilha de Reunião e em 1723, a partir de algumas plantas do Jardin des Plantes de Paris, descendentes das que a Holanda possuía no Amsterdam Botanical Garden, os primeiros cafeeiros na Martinica, de onde os portugueses levaram a cultura para o Brasil por volta de 1727. Ingleses e espanhóis completaram posteriormente, no decurso dos séculos XVIII e XIX, a propagação do café Arábica no continente americano (CARDOSO, 1994).

O café pertence à família botânica *Rubiaceae*, a qual tem 500 gêneros e mais de 6.000 espécies. A maioria são árvores tropicais que crescem na parte mais baixa da floresta. Outros membros da família incluem as gardênia e plantas que produzem quinino e outras substâncias úteis, mas *Coffea* é o membro economicamente mais importante. As duas espécies mais importantes economicamente de café são *Coffea arabica* L. (café Arábica) – que representa mais de 70% da produção mundial, e *Coffea canephora* P. (café Robusta). Duas outras espécies que crescem numa escala muito menor são *Coffea liberica* (café Libérica) e *Coffea dewevrei* (café Excelsa) (OIC, 2004).

O café é um produto agrícola cuja qualidade final do grão beneficiado é resultado da interação de vários fatores, tais como condições climáticas, adubação, tratos fitossanitários, estágio de

maturação dos frutos, cuidados na colheita, secagem, beneficiamento e armazenamento (MALTA, CHAGAS, OLIVEIRA, 2003).

O governo brasileiro estimou para a terceira colheita de 2004/ 2005 uma produção total de 38,26 milhões de sacas, das quais 30,46 milhões são de Arábica e 7,80 milhões de Robusta (OIC, 2004).

Um levantamento semestral da produção e consumo de café torrado e moído no Brasil, realizado pela ABIC e encerrado em abril de 2005, revelou um crescimento significativo quando comparado aos padrões mundiais (Figuras 4 e 5). Os brasileiros já estão consumindo 15,49 milhões de sacas por ano, um crescimento de 3,68% em relação ao último período de apuração da ABIC. O consumo per capita também evoluiu, atingindo 4,15 Kg de café em pó torrado e moído por habitante ao ano, o que aproxima ainda mais o consumo brasileiro aos padrões europeus e americano (ABIC, 2005).

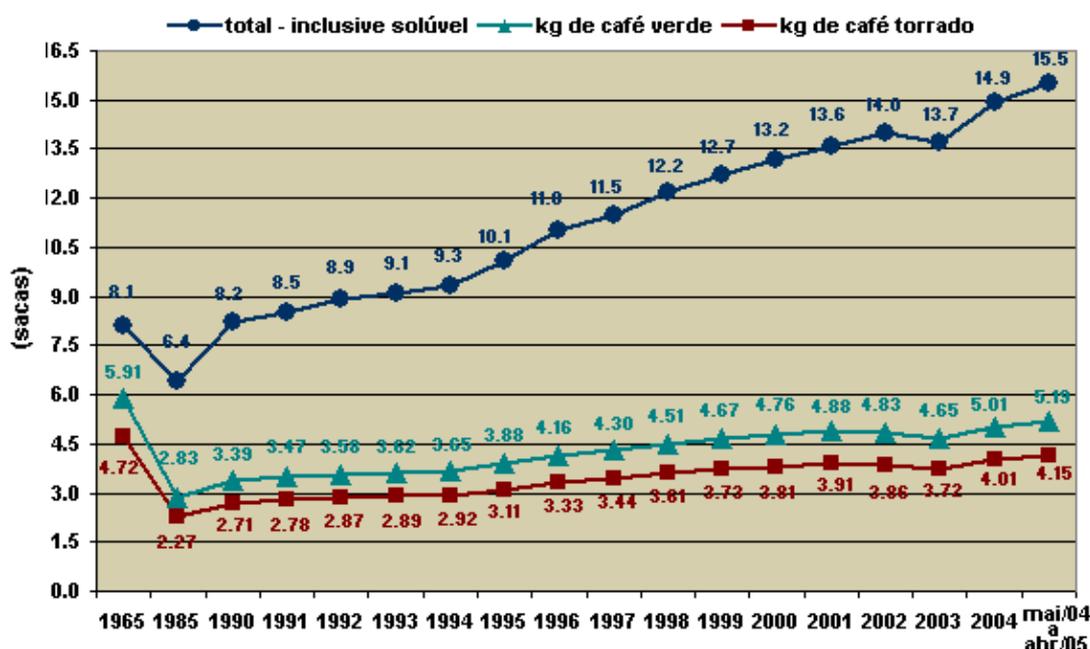


Figura 4. Consumo interno de café em sacas e per capita - Brasil.

Fonte: ABIC, 2005

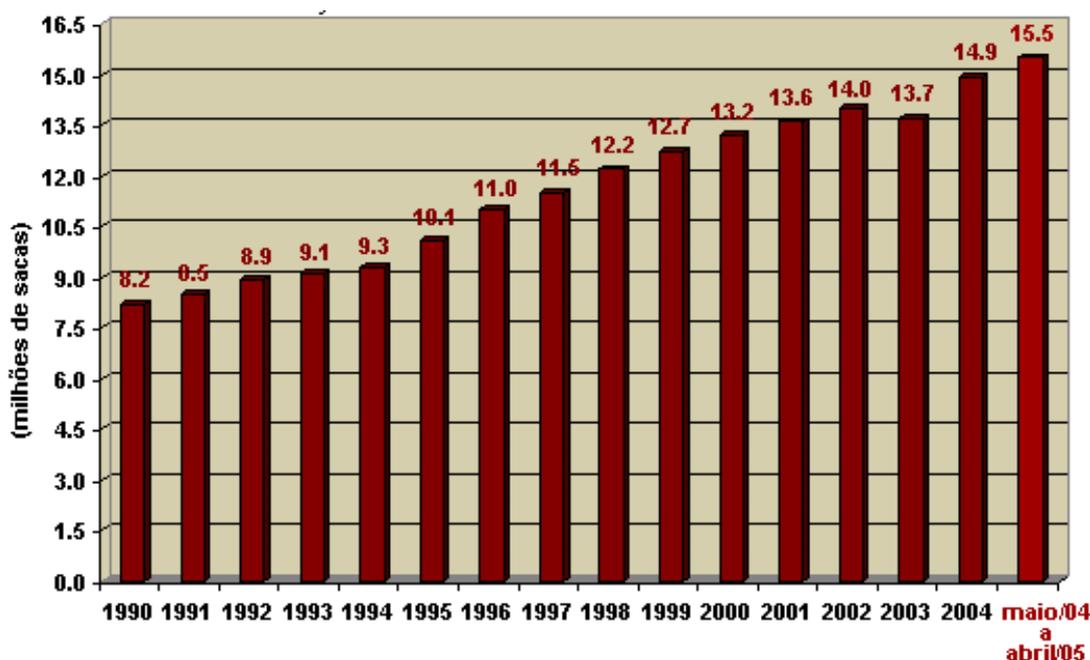


Figura 5. Evolução do consumo interno de café no Brasil.

Fonte: ABIC, 2005

A qualidade do café, além dos atributos sensoriais, pode ser avaliada através da quantificação de componentes, tais como a cafeína, que está associada à saúde humana, a trigonelina e os ácidos clorogênicos que são responsáveis pela formação do flavor durante a torrefação (TRUGO, MACRAE, 1989).

Referindo-se às atividades fisiológicas e metabólicas, o café é conhecido por suas qualidades tonificantes, as quais ativam o sistema nervoso, melhora a percepção e reduz a fadiga. A maioria destas atividades está relacionada com a cafeína. Sabe-se que o café possui propriedades antioxidantes, assim como a cafeína, que apresenta um efeito protetor maior nos tecidos (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, JIMÉNEZ-ESCRIG, SAURA-CALIXTO, 2005).

A cafeína é encontrada em todas as partes do cafeeiro, sendo mais abundante nas flores, nas sementes e nas folhas mais novas (RAJU e GOPAL, 1979). O teor de cafeína nas sementes do cafeeiro depende da espécie: no *C. arabica*, o conteúdo médio é de 12g/ kg; já no *C. canephora*, em torno de 22g/ kg, e o *C. bengalensis* não produz esse alcalóide (SCREENATH, 1997).

O fruto do cafeeiro é formado pelo grão (endosperma + embrião), que é envolvido pelo pergaminho ou endocarpo, também pela polpa ou mesocarpo, e finalmente pela casca ou epicarpo; o pergaminho representa cerca de 12% do grão de café. A mucilagem está aderida ao pergaminho e é constituída por água, pectinas, açúcares e ácidos orgânicos, razão pela qual possibilita a deterioração dos grãos de café. A polpa é composta pelo epicarpo e por parte do

mesocarpo, sendo o resíduo da despolpa úmida dos frutos (MATOS, LO MONACO e GARCIA, 2005).

A qualidade do café usado para bebidas é estritamente relacionada à composição química dos grãos torrados, a qual é afetada pela composição do grão verde e pelas condições de processamento pós-colheita (secagem, estocagem, torrefação e moagem) (FRANCA et al., 2005). O café verde, torrado e a bebida preparada deste são misturas muito complexas de diversos compostos químicos que ocorrem tanto naturalmente, bem como podem ser induzidos pelo processo de torrefação. Recentemente, o café verde mostrou possuir atividade antioxidante *in vitro* contra a peroxidação lipídica (DAGLIA et al., 2000).

Nogueira (2000) constatou que o processo de torrefação reduz os teores de ácidos clorogênicos totais e de trigonelina e aumenta os de cafeína.

1.6 Beneficiamento

O beneficiamento é a operação que tem por finalidade retirar a polpa seca do grão de café. O fruto do café deve ser submetido, após a colheita, a uma série de operações tecnológicas destinadas a prepará-lo para seu lançamento no mercado. Pretende-se essencialmente com elas separar, o quanto possível, as sementes, que constituem o produto comercializável, das partes do fruto que as envolvem (polpa, mucilagem e endocarpo ou pergaminho) e do seu próprio tegumento (película), assim como de impurezas e defeitos, conferindo-lhes boas características para a confecção do produto final a ser consumido, boas condições de conservação e transporte e boa aparência comercial (CARDOSO, 1994). A retirada da casca é feita por uma peça cilíndrica giratória, que atrita os grãos, descascando-os. A separação das impurezas e a classificação são efetuadas através de peneiras, ventilação, catadores de pedras e separadores magnéticos (SANTA CLARA, 2004).

Depois de colhidos, os frutos do café podem ser preparados de duas formas: por via seca e úmida (Figura 6 e 7). As operações comuns a ambos compreendem limpeza, separação, secagem, armazenamento, beneficiamento e classificação. Especificamente, o método por via úmida inclui trabalhos de separação de café em cereja, despulpamento, remoção da mucilagem e lavagem do produto. No processo por via seca, utilizado para o preparo dos chamados cafés de terreiro, as fases de seu processamento poderão prescindir do emprego da água. No processo por via úmida, para obter os cafés lavados ou despulpados, é indispensável o uso da água (CRIAREPLANTAR, 2004).

Na forma de preparo por via seca, o fruto é seco na sua forma integral (com casca, polpa e mucilagem), dando origem aos cafés denominados coco ou de terreiro. Na forma de preparo por via úmida, originam-se os cafés despulpados, descascados e desmucilados. O preparo por via úmida consiste na retirada da casca e/ ou mucilagem do fruto maduro ou cereja, que são substratos propícios ao desenvolvimento de microrganismos que podem provocar a ocorrência de fermentações prejudiciais à qualidade final do produto (MALTA, CHAGAS, OLIVEIRA, 2003). A separação poderá ocorrer por dois processos: um, a seco, por meio de ar e peneiras, que são os seletores; o outro, por meio de água, que são os lavadores.

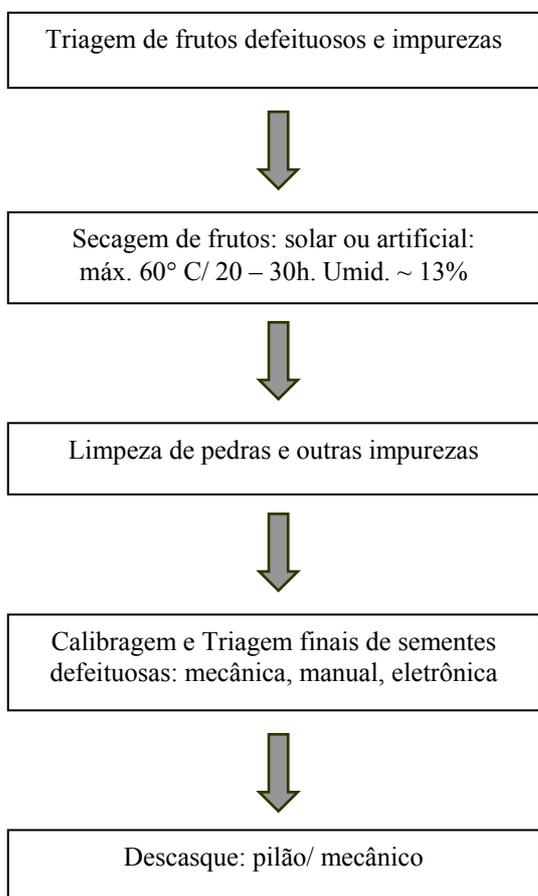


Figura 6. Seqüência de operações por via seca.
Fonte: CARDOSO, 1994.

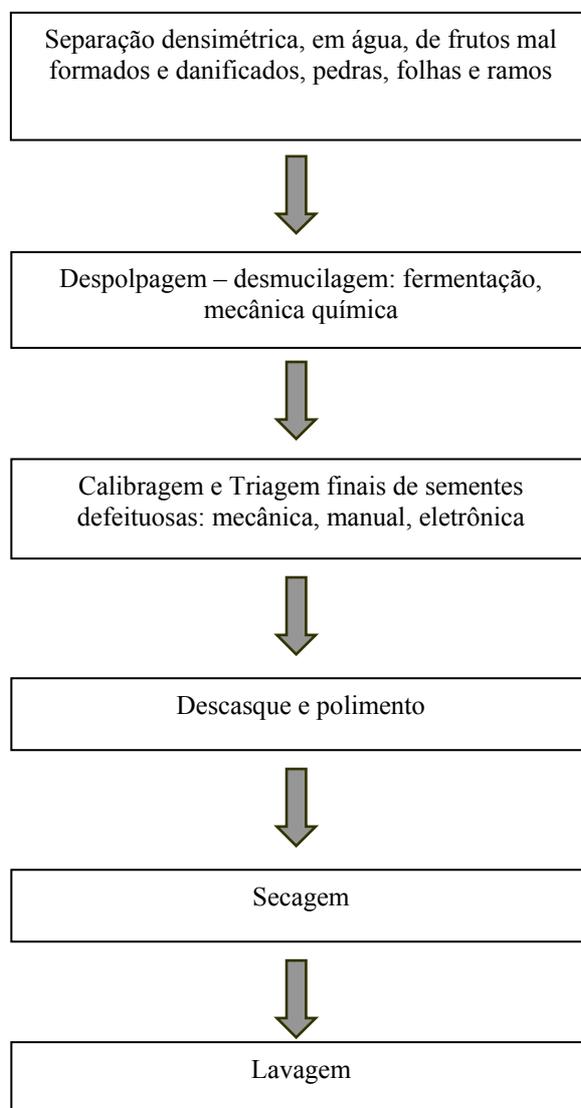


Figura 7. Seqüência de operações por via úmida.
Fonte: CARDOSO, 1994.

A seleção dos grãos é feita em máquinas constituídas de peneiras e ventiladores que retiram do café as impurezas, tais como: casquinhas, coquinhos, terra, pedras, paus, etc.

O produto da separação efetuada pelos seletores se constitui de verdes misturados com "cereja", devido à pequena diferença de densidade; seco, chocho, coquinho e impurezas.

Nos vários tipos de lavadores em que a água é o veículo para a condução do "café da roça", é indispensável que o tanque receba suprimento extra de água, a fim de que seja mantido o nível conveniente. São necessários três litros de água por litro de café, em média. A secagem natural ou artificial, é uma das operações de maior importância no preparo de um produto de boas características, devendo-lhe ser dispensada bastante atenção, dada a influência na coloração do café e, provavelmente, da qualidade da "bebida".

Uma boa secagem deve ser conduzida de modo que sejam observados os seguintes pontos:

- evitar fermentação durante o processo;
- evitar excessos de temperatura;
- secar até obter o teor de umidade conveniente;
- obter um produto que depois de beneficiado se apresente uniforme quanto à cor.

(CLIFFORD, WILSON, 1985).

1.7 Rebenefício

Quando se deseja um café com melhores características comerciais, faz-se o rebenefício, que padroniza o tipo, aspecto e tamanho de fava. Isto é feito pela separação manual, mecânica ou eletrônica, segundo os princípios de tamanho e forma do grão, peso específico e cor (SANTA CLARA, 2004).

Este repasse pode ser feito pelas mesmas máquinas usadas no beneficiamento ou por meio de seletores a ar flutuante, que consta de uma peneira inclinada, dotada de movimento vibratório intenso, recebendo uma injeção de ar por baixo. O café beneficiado é despejado na parte superior da peneira e recebendo a corrente de ar por baixo, adquire características de fluidez; os grãos pesados vão para o fundo e os leves tendem a permanecer em cima da camada.

Os cafés pesados alcançam a posição inferior da camada, entram em contacto com a peneira, que através de seu movimento oscilatório transmite a este grão um caminhar inverso ao dos grãos leves; os pesados tendem a caminhar para a parte superior da peneira, enquanto os leves são

recolhidos na inferior. É o sistema chamado "Air Float", que elimina os defeitos por diferença de densidade. A catação manual é um meio que pode ser executado em mesas coletivas ou individuais, sendo que estas últimas permitem um melhor controle do serviço executado pelas catadeiras.

Existem no mercado catadeiras de café eletrônicas, nas quais o grão é submetido ao exame feito por células fotoelétricas, sendo rejeitado o grão que esteja em desacordo com o padrão de cor pré-estabelecido na máquina. O rendimento das máquinas encontradas atualmente no mercado varia de 1 a 1,5 sacas de café beneficiado por hora (CRIAREPLANTAR, 2004). O pó orgânico do café é gerado durante o processo de padronização do café beneficiado (descascado). Este processo consiste em uma pré-limpeza (retirada dos defeitos extrínsecos), catação de pedras (que não gera pó), rebenefício (separação por tamanho dos grãos, – gera pó), catação densimétrica (separação por peso específico de cada grão, que separa os mais leves e os mal formados - gera pó) e catação eletrônica (realizada por máquina que analisa os grãos pela coloração) (BACCETI, 2004).

Na catação eletrônica, células fotoelétricas fazem a leitura de grão por grão separando os grãos verdes, pretos e brancos (úmidos) que, se torrados junto com os grãos saudáveis, podem deixar no café um sabor desagradável (SANTA CLARA, 2004).

Cada 300.000 sacas de café beneficiadas por mês produzem aproximadamente 25 toneladas de pó. Experimentalmente, o pó está sendo utilizado em pequenas quantidades em rações animais (ruminantes). Também é empregado como adubo orgânico. Quando destinado a adubo orgânico, mostra-se mais eficiente quando é agregado ao solo durante o processo de aragem e gradeação (BACCETI, 2004).

1.8 Casca de café

A casca de café é considerada antinutricional, devido à presença de substâncias tóxicas para os ruminantes, como a cafeína (1,2%), taninos (6,3%) e polifenóis (SOCCOL et al., 1999).

A casca e a polpa de café têm sido recomendadas e utilizadas na alimentação de ruminantes, até 30% no concentrado de vacas em lactação e 40% no concentrado de novilhos confinados. Pesquisas para buscar formas de utilização desses materiais devem-se basicamente a sua grande disponibilidade nas regiões cafeeiras (BARCELOS et al., 2001).

Dada a diversidade de informações sobre a composição bromatológica da casca de café, seguem-se médias de teores mínimos e máximos de nutrientes encontrados na literatura (Tabela 1).

Tabela 1. Composição Bromatológica da Casca de Café.

Nutrientes	Concentração
Matéria Seca (MS)	84,2% a 92,8%
Proteína Bruta (PB)	7,25% a 11,7%
Fibra Bruta (FB)	17,7% a 21,0%
Fibra em Detergente Neutro (FDN)	34,5% a 70%
Fibra em Detergente Ácido (FDA)	30,4% a 55,14%
Extrato Etéreo (EE)	1,4% a 6,0%
Extrato Não Nitrogenado	43,0% a 44,0%
Celulose	14,7% a 42,0%
Energia Bruta (EB)	3,675 Kcal/Kg a 4,251 Kcal/Kg
Matéria Mineral (MM)	6,5% a 7,8%
Cafeína	0,48% a 1,31%
Taninos	1,31% a 2,97%
Lignina	9,3% a 13,56%
Hemicelulose	4,3% a 15,37%

Fonte: RIBEIRO FILHO et al., 2000.

A proporção de 1:1 entre o grão beneficiado e a casca de café durante o beneficiamento origina uma grande quantidade de casca de café, que pode ser utilizada como cobertura morta para recuperação de solos intensamente cultivados, além de outros destinos (BADOCHA, COSTA, LEÔNIDAS, 2003).

A Tabela 2 apresenta as características da casca de café em minerais:

Tabela 2. Composição em Minerais da Casca de Café.

Nutrientes	Concentração
Nitrogênio	1,78 dag.Kg ⁻¹
Pentóxido de Fósforo	0,14 dag.Kg ⁻¹
Óxido de Potássio	3,75 dag.Kg ⁻¹
Cálcio	0,41 dag.Kg ⁻¹
Magnésio	0,13 dag.Kg ⁻¹
Enxofre	0,15 dag.Kg ⁻¹
Boro	34 mg.Kg ⁻¹
Cobre	18 mg.Kg ⁻¹
Ferro	150 mg.Kg ⁻¹
Manganês	29 mg.Kg ⁻¹
Molibdênio	0,07 mg.Kg ⁻¹
Zinco	70 mg.Kg ⁻¹
MS	90%

Fonte: BADOCHA, COSTA, LEÔNIDAS, 2003.

CAPÍTULO 2

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

As amostras de casca de café foram gentilmente cedidas pelas cooperativas Cooxupé, Guaxupé – MG, e pela Garcafé (Cooperativa dos Cafeicultores da Região de Garça), Garça – SP. O pó orgânico foi enviado juntamente pela Cooxupé. Os resíduos são provenientes do processo de beneficiamento por via seca.

Após o recebimento, as cascas foram acondicionadas em embalagens plásticas e armazenadas em freezer a -18°C , até o início das análises.



Figura 8. Cascas de café das Cooperativas Cooxupé, Garcafé e Pó orgânico (esquerda para direita).

2.2 Caracterização Físico-química da Matéria-prima

2.2.1 Umidade

Determinou-se a umidade da casca e do pó orgânico de café através do método gravimétrico em triplicata, submetendo-se as amostras ao aquecimento em estufa de secagem a 105°C até peso constante. Os resultados foram expressos em g/ 100g de amostra (KIRK e SAWIER, 1991).

2.2.2 Resíduo Mineral Fixo (Cinzas)

Segue o método 920.93. Baseia-se na determinação da perda de peso do material submetido à incineração em mufla a 550°C. As medidas foram feitas em triplicata, e as pesagens até peso constante. A perda de peso forneceu o teor de matéria orgânica, e a quantidade de cinzas é dada em g/ 100g (AOAC, 2005).

2.2.3 Fração Protéica

O conteúdo em proteína bruta (método 991.20) é dado através do conteúdo em nitrogênio, após devida aplicação do fator de conversão (6,25). Determinou-se através do método de Kjeldahl, que é basicamente dividido em três etapas: digestão, destilação e titulação.

O resultado foi expresso em g/ 100g da amostra integral (AOAC, 2005).

2.2.4 Lípides Totais

A quantidade de substâncias lipídicas (método 920.39) foi determinada pelo método de Soxhlet, pela extração descontínua com o solvente éter etílico, e conseqüente solubilização da gordura. Após dessecação, o material extraído foi pesado, e a diferença entre este e o peso inicial da amostra corresponde à quantidade de extrato etéreo da amostra. Este valor foi dado em g/ 100g de amostra integral (AOAC, 2005).

2.2.5 Fibra Total

A fração fibra (método 920.98) fundamenta-se em uma digestão ácida seguida de uma digestão em meio alcalino. Após filtrar as amostras, estas foram submetidas ao aquecimento em estufa a 105°C até peso constante, e o peso da fibra total foi dado pela diferença entre o peso do papel, em g/ 100g de amostra integral (AOAC, 2005).

2.2.6 Carboidratos

O teor de carboidratos foi obtido por diferença através da somatória das determinações de umidade, lípidos, proteína, cinzas e fibra, subtraídas de 100, completando a análise da composição centesimal (AOAC, 2005).

2.2.7 Cafeína

Primeiramente, foi feita a extração da cafeína da amostra em meio ácido, seguida de uma separação com clorofórmio (método 950.40). A dosagem foi feita por colorimetria, em espectrofotômetro. A concentração de cafeína foi dada em porcentagem (AOAC, 2005).

2.3 Preparação das amostras

As cascas de café foram armazenadas em freezer a -18°C , trituradas em moinho (IKA A11 Basic) à temperatura ambiente e tamisadas (Tamis 60 *mesh*). As farinhas obtidas foram acondicionadas em frascos âmbar e estocadas em freezer a -18°C , até a realização das determinações.

2.4 Obtenção dos extratos da casca e do pó

Os extratos etéreo, alcoólico e aquoso das cascas e do pó de café foram obtidos através do processo de extração seqüencial (Figura 9).

Cerca de 20g da farinha de cada amostra foi adicionada de 100mL de éter etílico e agitada em homogeneizador por 1 hora à temperatura ambiente ($24 \pm 1^{\circ}\text{C}$). Em seguida as suspensões foram filtradas em funil de Büchner, e o volume completado para 100mL com éter etílico. Os resíduos foram recuperados através de secagem em estufa a 60°C , pesados e calculados para a obtenção dos demais extratos alcoólico e aquoso; o mesmo procedimento foi realizado para a obtenção dos demais extratos, na mesma proporção 1:5.

Foi realizada a gravimetria dos extratos, para que os resultados fossem expressos em massa seca. Estes extratos foram utilizados para a avaliação da atividade antioxidante e para a quantificação dos fenólicos totais (MOREIRA, MANCINI FILHO, 2003).

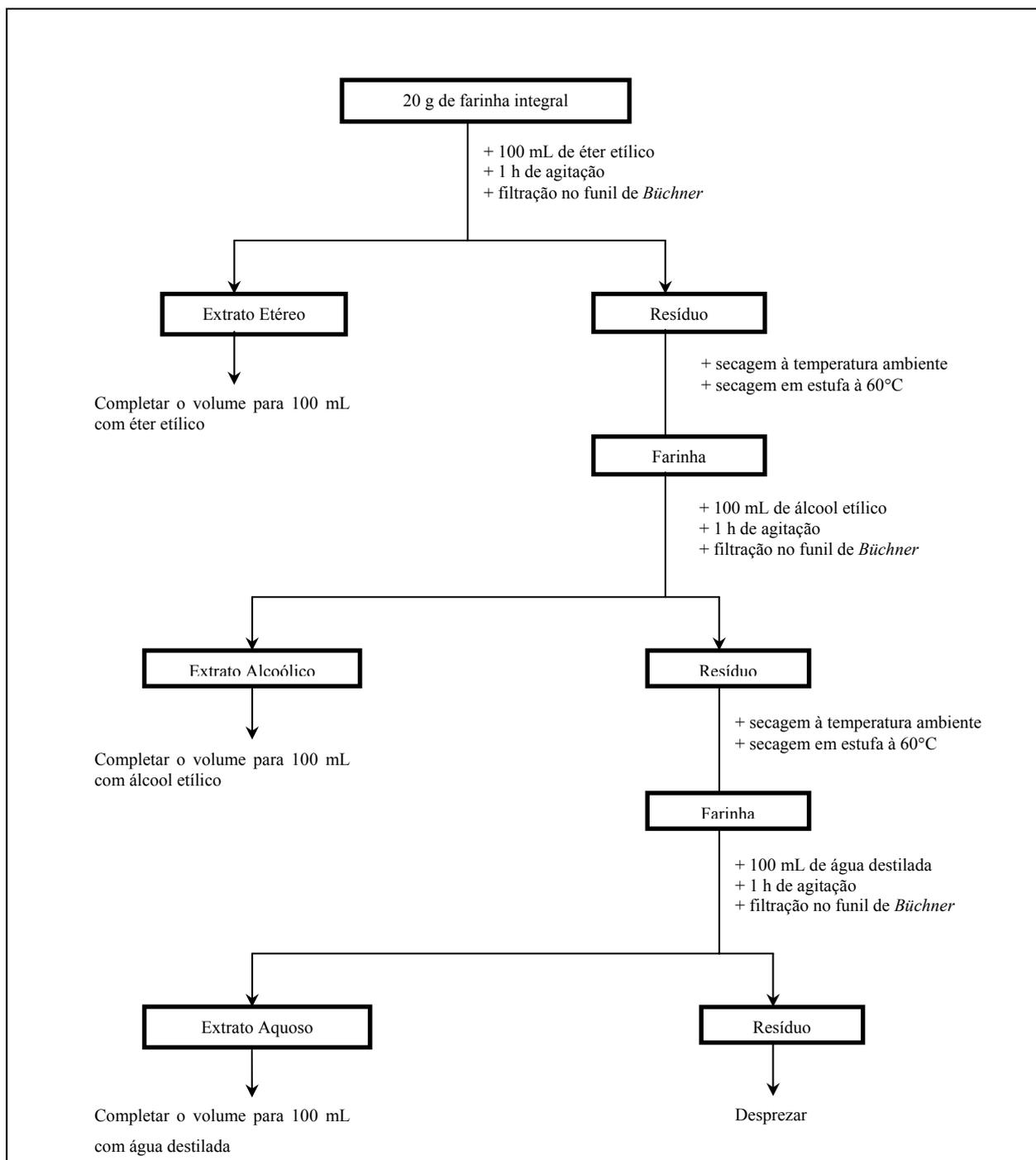


Figura 9. Processo de extração sequencial.

Fonte: MOREIRA, MANCINI FILHO, 2003

2.5 Método Sistema β -caroteno/ ácido linoléico (sistema aquoso)

A atividade antioxidante foi determinada *in vitro* pelo método desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971), empregando-se como substrato a solução de β -caroteno/ ácido linoléico, preparada com 30 μ L de β -caroteno + 60 μ L de ácido linoléico + 1,5mL de clorofórmio + 12 gotas de Tween 40 como emulsificante. Este sistema foi mantido a 50°C, e medidas espectrofotométricas de absorvância a 470nm foram monitoradas a cada quinze minutos, durante duas horas. Diferentes volumes de extratos para as concentrações de 50, 100 e 200ppm foram adicionados a 5mL da solução de β -caroteno/ ácido linoléico, e o solvente evaporado sob atmosfera de nitrogênio. A seguir adicionou-se 150mL de água oxigenada (tratada com O₂ por trinta minutos). A solução foi diluída até apresentar densidade ótica entre 0,6 e 0,7 na absorvância de 470nm. Todas as determinações foram feitas em triplicata e acompanhadas por um controle sem antioxidante (branco) e outro com solução de BHT nas mesmas concentrações. Além disso, foi avaliado o sinergismo entre as amostras e o antioxidante sintético BHT, tendo as misturas as mesmas concentrações dos extratos puros (50, 100 e 200 ppm). As porcentagens de inibição da oxidação são calculadas através da fórmula: D.O. inicial – D.O. final, que representa o decaimento da densidade ótica do controle, e considerado 100% de oxidação. A queda da densidade ótica das amostras correlaciona-se com o controle, e assim pode-se estabelecer uma porcentagem de inibição da oxidação, subtraindo-se a porcentagem de inibição de cada amostra de 100, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%AA = 100 - (\text{decaimento de absorvância da amostra}) / \text{decaimento de absorvância do controle} \\ \times 100$$

Onde:

% AA = porcentagem de atividade antioxidante

2.6 Método ABTS

O radical monocátion pré-formado ABTS^{•+} (2,2-azino-bis-[3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico]; Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) é gerado pela oxidação química do ABTS, e é reduzido na presença dos antioxidantes doadores de hidrogênio (ex. flavonóides, hidroxicinamatos, carotenóides e antioxidantes do plasma). As influências de ambas as concentrações de antioxidante e duração da reação na inibição da absorção do cátion radical são

levadas em consideração quando se determina a atividade antioxidante. O método é aplicável para o estudo de soluções antioxidantes hidro e lipossolúveis, compostos puros e extratos de alimentos.

Utilizou-se o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico; Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) como antioxidante referência, que foi preparado em etanol e estocado como solução padrão. O ABTS foi dissolvido em água até a concentração de 7,4 mM, e submetido à reação com persulfato de potássio para a formação do radical. A mistura deve ficar no escuro à temperatura ambiente de 12 a 16 horas antes do uso. A solução do radical ABTS^{•+} é diluída em etanol até uma absorbância de $0,70 \pm 0,02$ a 734nm.

As leituras foram feitas no espectrofotômetro Hewlett-Packard 8425A seis minutos após a adição da amostra (extratos obtidos no item 2.4) na solução de ABTS^{•+}. Todas as determinações foram feitas em duplicata. A porcentagem de inibição do radical é calculada e plotada em função da concentração de antioxidantes e de Trolox para os dados do padrão: % inibição = $1 - (\text{Abs}_f / \text{Abs}_0) \times 100$, devendo esta porcentagem estar dentro da faixa de 20 a 80% de inibição (RE et al., 1999).

Os resultados foram expressos em TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) por grama de amostra (peso seco).

2.7 Fenólicos Totais

Para a quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos e nas frações, foi empregado o método de Folin-Ciocalteu (BUDINI, TONELLI, GIROTTI, 1980), baseado na capacidade redutora do reagente em contato com compostos que contenham grupos capazes de serem oxidados. Este é um ensaio colorimétrico de oxi-redução que mede todas as moléculas fenólicas sem diferenciar entre ácido gálico, monômeros, dímeros, e compostos fenólicos grandes. Uma curva padrão de ácido gálico (Vetec, Rio de Janeiro) foi construída com diferentes concentrações para expressar os resultados em mg GAE (Gallic Acid Equivalent) por 100g de peso seco.

2.8 Determinação dos Principais Compostos Fenólicos

Para a identificação dos ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e ésteres insolúveis de ácidos fenólicos (Figura 10) por cromatografia a gás, seguiu-se a técnica de KRYGIER, SOSULSKI e

HOGGE (1982), com algumas modificações (SOTERO, 2002). A gravimetria das frações foi realizada para a determinação das concentrações em ppm.

2.8.1 Extração de Ácidos Fenólicos Livres

Um grama da amostra previamente desengordurada de cada amostra foi extraído seis vezes com porções de 20mL de tetrahydrofurano, seguido de homogeneização por 5 minutos em vortex. Os sobrenadantes das seis extrações foram filtrados e desidratados com sulfato de sódio anidro. As frações resultantes dos filtrados foram evaporadas em evaporador rotativo (Fisatom 802), sob vácuo, à temperatura de 40°C e ressuspensas em 5mL de tetrahydrofurano. Os extratos contendo as frações de ácidos fenólicos livres foram armazenados em congelador e em atmosfera de nitrogênio.

2.8.2 Extração de Ácidos Fenólicos de Ésteres Solúveis

Os resíduos provenientes das extrações dos ácidos fenólicos livres foram submetidos a novos processos de extração. Os fenólicos solúveis de cada amostra foram extraídos seis vezes com 20mL de solução de metanol:acetona:água (7:7:6). As amostras foram homogeneizadas por cinco minutos. No final de cada extração, os sobrenadantes foram evaporados sob vácuo, à temperatura de 40°C, até a fase aquosa. Para a liberação dos ésteres solúveis, que se encontram esterificados com proteínas ou polipeptídeos, foram adicionados iguais volumes de hidróxido de sódio 4N. Após três horas de hidrólise, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, os pHs foram corrigidos para 2, com HCl 6N. Os sobrenadantes foram então transferidos para funis de separação e extraídos com volume igual de hexano (1:1), para eliminação de ácidos graxos livres e outros contaminantes, e para extração dos fenólicos da fase aquosa com a mistura de éter etílico – acetato de etila – tetrahydrofurano (1:1:1), na proporção de 1:1 solvente – água, por seis vezes, através de agitação no próprio funil de separação. As frações extraídas foram filtradas e desidratadas com sulfato de sódio anidro, evaporadas em evaporador rotativo a 40°C e ressuspensas em 5mL de tetrahydrofurano. O procedimento de armazenamento da fração solúvel de ésteres de ácidos fenólicos dos resíduos de café seguiu o mesmo protocolo para ácidos fenólicos livres.

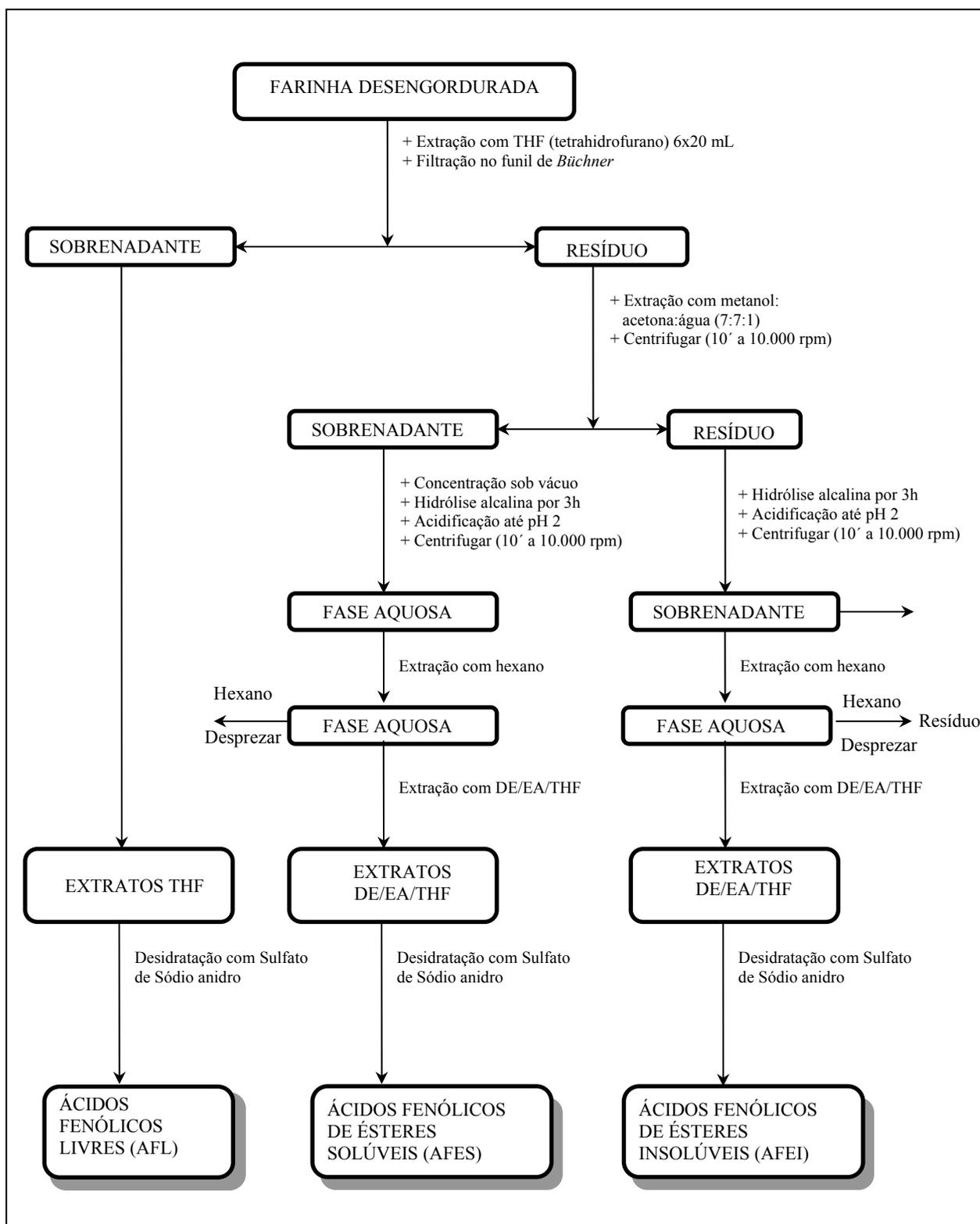


Figura 10. Processo de extração dos ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e insolúveis.

Fonte: SOTERO, 2002.

2.8.3 Extração de Ácidos Fenólicos de Ésteres Insolúveis

Os resíduos das extrações dos fenólicos solúveis foram hidrolisados diretamente em 25mL de NaOH 4N, durante três horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os extratos contendo os ésteres insolúveis de ácidos fenólicos tiveram seus pHs corrigidos para 2, com HCl 6N, seguidos de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. A partir dessa fase, seguiu-se o mesmo procedimento dos filtrados para os ésteres solúveis de ácidos fenólicos dos resíduos de café (SOTERO, 2002).

2.9 Identificação dos Ácidos Fenólicos por Cromatografia Gasosa

Cada padrão de ácido fenólico foi preparado individualmente a uma concentração fixa (Tabela 3), em seguida injetado no cromatógrafo Shimadzu, modelo GC 17A, para identificar seu tempo de retenção. Foi preparada uma solução contendo os 18 ácidos fenólicos em metanol, que foram injetados no cromatógrafo. A Figura 11 representa a estrutura química de alguns dos ácidos fenólicos utilizados como padrão.

Uma alíquota de 0,2 mL da solução padrão de ácidos fenólicos foi combinada a 0,1 mL do padrão interno (ácido metil éster de ácido heptadecanoato; Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) em uma concentração de 1,5 mg/ mL. Coletou-se 0,5 mL das frações contendo os compostos fenólicos, adicionou-se 0,1 mL do padrão interno (metil éster de ácido heptadecanóico dissolvido em metanol na concentração 1,5 mg/ mL) e evaporou-se totalmente usando corrente de nitrogênio.

As amostras foram derivatizadas através da adição de 0,2 mL de N,O-bis(Trimetilsilil)-acetamida e aquecimento em banho termostaticado a 60°C por 30 minutos. Após este período as amostras foram injetadas no cromatógrafo.

As condições cromatográficas seguiram os procedimentos descritos por DABROWSKI e SOSULSKI (1984) com modificações feitas por MOREIRA e MANCINI FILHO (2003). Utilizou-se um cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC 17A, equipado com detector de ionização de chama. Foi empregada a coluna semipolar DB5 (J & W®), com 30 metros de comprimento por 0,25mm de diâmetro, utilizando a seguinte programação: temperatura inicial da coluna 150°C, isotérmica por 3 minutos; de 150 a 300°C a uma velocidade de aquecimento de 5°C/ min.; isotérmica a 300°C por 3 minutos.

A temperatura da câmara injetora foi de 250°C e do detector 300°C. A identificação dos ácidos fenólicos foi realizada com base nos tempos de retenção relativos das amostras baseando-se num padrão interno e na concentração dos compostos da solução padrão.

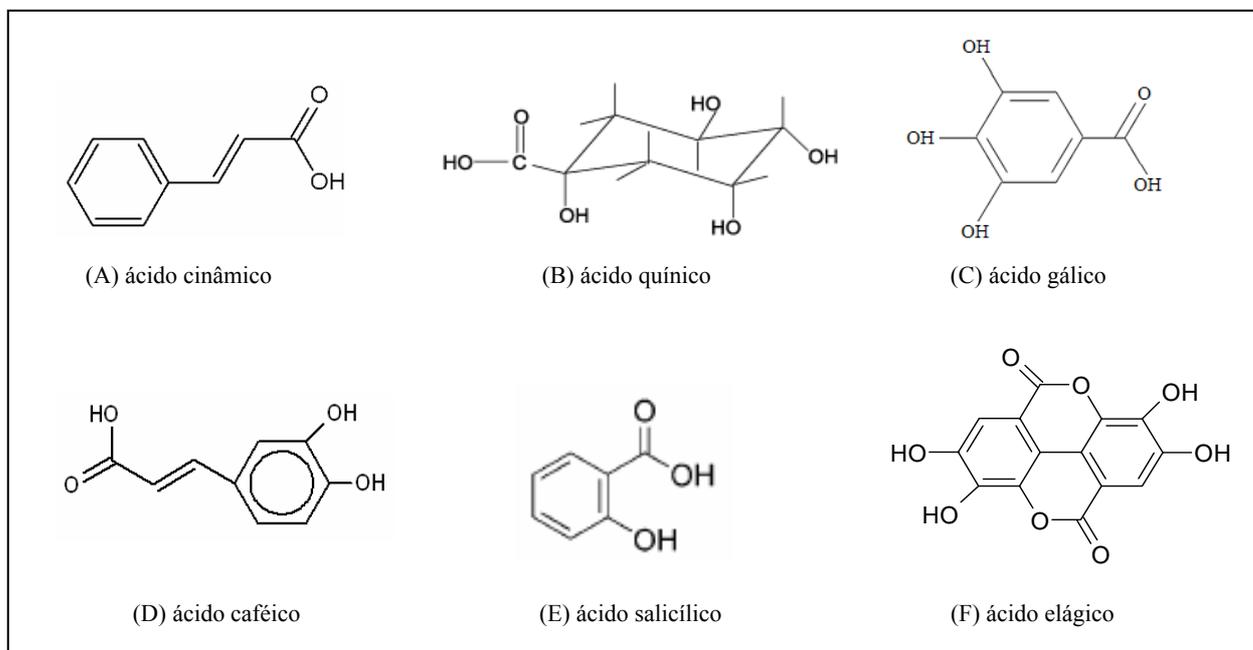


Figura 11. Estrutura química dos ácidos fenólicos utilizados como padrão para a análise cromatográfica.

Tabela 3. Ácidos fenólicos utilizados para o preparo da solução padrão para análise cromatográfica.

Ácido Fenólico	Concentração (mg/ mL)	Ácido Fenólico	Concentração (mg/ mL)
<i>o</i> -cumárico	1,02	Protocatequínico	1,00
Vanílico	1,02	Trans-cinâmico	1,00
Caféico	1,00	Gálico	1,00
Gentísico	1,02	<i>p</i> -hidroxibenzóico	1,00
<i>p</i> -cumárico	1,06	Elágico	1,02
Ferúlico	1,06	Cinâmico	1,02
Sináptico	1,00	Salicílico	1,04
Clorogénico	1,02	Benzóico	1,06
Quínico	1,00		

2.10 Análise Estatística dos Dados

Os resultados obtidos para todas as análises foram submetidos a uma análise de variância – ANOVA – através do programa *Statistica*[®] 6.0, em nível de significância 5%. Havendo diferença entre as médias, aplicou-se o teste de Tukey para compará-las.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café). Disponível em:

<<http://www.abic.com.br/estatisticas.html>>. Acesso em: 01 de nov./2005.

AMAROWICZ, R.; NACZK, M., SHAHIDI, F. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2755–2759, 2000.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mut Res**, v. 350, n. 1, p. 103-108, 2000.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Disponível em :

<<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 27 out. 2004.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 73, p. 239-244, 2001.

ARUOMA, O. I. Nutrition and Health Aspects of Free Radicals and Antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 32, p. 671-683, 1994.

ARUOMA, O. I. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.

Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA, 2005.

AZUMA, K.; IPPOUSHI, K.; NAKAYAMA, M.; ITO, H.; HIGASHIO, H.; TERAU, J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5496-5500, 2000.

BADOCHA, T. E.; COSTA, R. S. C.; LEONIDAS, F. C. Casca de Café: um importante insumo para a agricultura orgânica. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 3., 2003, Porto Seguro-BA. *Anais do III Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Porto Seguro, 2003.*

BARCELOS, A. F.; PAIVA, P. C. A.; PÉREZ, J. R. O.; SANTOS, V. B.; CARDOSO, R. M. Fatores Antinutricionais da Casca e da Polpa Desidratada de Café (*Coffea arabica* L.) Armazenadas em Diferentes Períodos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 4, jul./ago. 2001.

BRENNA, O. V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago: v. 49, p. 4841-4844, 2001.

BUDINI, R.; TONELLI, D.; GIROTTI, S. Analysis of total phenols using the Prussian blue method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 1236-1238, 1980.

Café – História. Disponível em : <<http://www.oic.org>>. Acesso em: 01 de out. 2004.

CAO, G. PRIOR, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1309-1315, 1998.

CARDOSO, A. P. S. Tecnologia Primária do Café. In: **Café – Cultura e Tecnologia Primária.** Lisboa: II CT, 1994. p. 135-150.

_____. Origem e Dispersão das Principais Espécies Cultivadas de Cafeeiro. In: **Café – Cultura e Tecnologia Primária.** Lisboa: II CT, 1994.

CHEUNG, L. M.; CHEUNG, P. C. K.; OOI, V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v. 81, p. 249-255, 2003.

CLIFFORD, M. N.; WILSON, K. C. Coffee; botany, biochemistry and production of beans and beverage, London, Croom Helm, 1985.

BACCETI, A. F. Geração do pó orgânico de café através do rebenefício. [mensagem pessoal]. Mensagem recebida via e-mail. COOXUPÉ, Guaxupé-MG, 2004.

DABROWSKI, K. J.; SOSULSKI, F. Quantification of free and hydrolyzable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 123-127, 1984.

DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; GREGOTTI, C.; BERTÈ, F.; GAZZANI, G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1449-1454, 2000.

DÁVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Commercial dietary antioxidant supplements assayed for their antioxidant activity by different methodologies **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2512-2519, 2003.

- DECKER, E. A. Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? **Nutrition Reviews**, Secaucus, v. 55, n. 11, p. 396-407, 1997.
- FENNEMA, O. R. **Química dos alimentos**. Zaragoza: Acribia S.A. 2000. 1.095p.
- FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; MENDONÇA, J. C. F.; SILVA, X. A. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 89-94, mar./ abr. 2005.
- GIADA, M. L. R.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos de alimentos, **Nutrire**, 28 – 08, 2004.
- GOH, L. M.; BARLOW, P. J.; YONG, C. S. Examination of antioxidant activity of *Ginkgo biloba* leaf infusions. **Food Chemistry**, v. 82, p. 275-282, 2003.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarenton Press, 1991, p. 543.
- HALLIWELL, B. Free Radicals, and Antioxidants: A Personal View. **Nutrition Reviews**, New York, v. 52, n. 8, p. 253-261, 1994.
- HAMID, .A. A.; SHAH, Z. M.; MUSE, R.; MOHAMED, S. Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. **Food Chemistry**, v. 77, p. 465-469, 2002.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; DENNIS, J. B. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.
- HU, M.; SKIBSTED, L. H. Antioxidative capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nucifera*). **Food Chemistry**, v. 76, p. 327-333, 2002.
- HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4437-4444, 2002.
- KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.
- KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A.I. ; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4076–4082, 2001.
- KIRK, R. S.; SAWIER, R. *Pearson's Composition and Analysis of Foods*, Longman Group Limited, England, 1991.

- KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, p. 334-336, 1982.
- LLESUY, S.; EVELSON, P.; CAMPOS, A. M.; LISSI, E. Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures. A critical review. **Biological Research**, v. 34, 2001.
- MALTA, M. R.; CHAGAS, S. J. R.; OLIVEIRA, W.M. Composição físico-química e qualidade do café submetido a diferentes formas de pré-processamento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa-MG, v.6, p.37-41, 2003.
- MARCO, G. J. A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 45, p. 594-598, 1968.
- MATOS, A. T.; LO MONACO, P. A.; GARCIA, G. O. Caracterização dos resíduos sólidos e líquidos no processamento dos frutos do cafeeiro. Disponível em: <<http://www.ufv.br/poscolheita/aguas/caracterizacao.htm>>. Acesso em: 28 de out. 2005.
- MEYER, A. S.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. Antioxidant interactions of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation, **Food Chemistry**, v. 61, n. 1/2, p. 71-75, 1998.
- MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.
- MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 48, p. 91, 1971.
- MONTORO, P.; BRACA, A.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. **Food Chemistry**, v. 92, p. 349-355, 2005.
- MOREIRA, A. V. B.; MANCINI FILHO, J. Atividade Antioxidante das Especiarias Mostarda, Canela e Erva-doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire - Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, v. 25, p. 31-46, jun. 2003.
- MORTENSEN, A., SKIBSTED, L. H. Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. **Federation of European Biochemical Societies**, 417, 261-266. 1997.
- NAMIKI, M. Antioxidants/ antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, Boca Raton, v. 29, n. 4, p. 273-300, 1990.
- NARDINI, M.; CIRILLO, E.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5735-5741, 2002.
- NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. (Ed.). **Food Chemistry**. 2.ed. New York : Marcel Dekker, 1985. p.139-244.

NIKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? **Nutrition**, v. 18, n. 6, p. 524-525, 2002.

NOGUEIRA, G. C. Otimização da metodologia para determinação simultânea de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em café utilizando HPLC com coluna de permeação em gel. In: SIMPOSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, Poços de Caldas, *Anais...Poços de Calda*: Embrapa/ Minasplan, 2000, p. 646-649.

OIC (Organização Internacional do Café). Disponível em: <<http://www.oic.org>>. Acesso em: 01 de out. 2004).

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

PENNINGTON, J. A. T. Food Composition Databases for Bioactive Food Components. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, p. 419-434, 2002.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4487-4490, 1998.

RAJU, K. I; GOPAL, N.H. Distribution of caffeine in arabica and robusta coffee plants. **Journal of Coffee Research**, Karnataka, v. 9, n. 4, p.83-90, 1979.

RAYMUNDO, M. S. **Avaliação da Atividade Antioxidante *in vitro* em Extratos de Algas Marinhas**. 2003. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, UFSC, Florianópolis, 2003.

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

Rebenefício. Disponível em: <<http://criareplantar.com.br/agricultura/cafe/cafe>>. Acesso em: 06 de out. 2004.

_____. Disponível em:<http://www.santaclara.com.br/ocafe/café_beneficiamento.htm>. Acesso em: 06 de out. 2004.

RIBEIRO FILHO, E.; PAIVA, P. C. A.; BARCELOS, A. F.; REZENDE, CARDOSO, R. M.; BANYS, V. L. Efeito da Casca de Café (*Coffea arabica*, L.) no Desempenho de Novilhos Mestiços de Holandês-Zebu na Fase de Recria. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.1, p. 225-232, jan./ mar., 2000.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C. A. Measurement of Total Antioxidant Activity as a Marker of Antioxidant Status In Vivo: Procedures and Limitations. **Free Radical Research**, v. 33, p. S59-66, 1999.

RICE-EVANS, C. A. Flavonoid antioxidants, **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 797-807, 2001.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621-632, 2005.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 133-139, mar./abr. 2005.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F.C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. **Trends in Food Science and Technology**, v.12, p. 401-413.

SCREENATH, H. L. Development of caffeine in free coffee varieties. **Indian Coffee**, Bangalore, v. 61, n. 10, p. 13-14, 1997.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 32, n.1, p. 67-103, 1992.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: HO, C.T.; OSAWA, T.; HUANG, T. M.; ROSEN, R.T. (Ed.). **Food phytochemicals for cancer prevention**. Washington : American Chemical Society (ACS Symposium Series, n. 546), 1994. p. 20-33.

ŠKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRABEC, A. R.; SIMONIĆ, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant material and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, n. 2, p. 191-198, fev. 2004.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potencial Health Impacts of Excessive Flavonoid Intake. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 29, n. 3/4, p. 375-383, 2000.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Sequestering Ability of Butylated Hydroxytoluene, Propyl Gallate, Resveratrol, and Vitamins C and E against ABTS, DPPH, and Hydroxyl Free Radicals in Chemical and Biological Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 1077-1080, 2003

SOCCOL, C. R.; LEIFA, F.; WOICIECHOWSKI, A. L.; BRAND, D.; MACHADO, C. M. M.; SOARES, M.; CHRISTEN, P.; PANDEY, A. Experiência Brasileira na Valorização Biotecnológica de Subprodutos da Agroindústria do Café. In: Seminário Internacional Sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira, 3., 1999, Londrina-PR. *Anais IAPAR/ UFPR/ IRD*, Londrina, 1999.

SOTERO, D. E. G. **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante de frutos da Amazônia: chope (*Gustavia augusta* L.), sachá mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e macambo (*Theobroma bicolor*)**. 2002. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, USP, São Paulo, 2002.

SPEISKY, H. C.; JIMÉNEZ, I. T. Radicales libres y antioxidantes en la prevención de enfermedades III: evidencias clínico epidemiológicas de los riesgos y beneficios asociados al consumo de antioxidantes en la prevención de enfermedades cardiovasculares. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 27, n. 3, p. 314-325, 2000.

TANG, S. Z.; KERRY, J. P.; SHEEHAN, D.; BUCKLEY, D. J. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. **Food Chemistry**, v. 76, p. 45–51, 2002.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. Application of High Performance Liquid Chromatography to the Analysis of Some Non-volatile Coffee Components, **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 39, p. 97-107, 1989.

TSUSHIDA, T.; SUZUKI, M.; KUROGI, M. Evaluation of antioxidant activity of vegetable extracts and determination of some active compounds. **Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology** - Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, v. 41, p. 611–618, 1994.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN DEN BERG, D.; TROMP, N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VANDERBERGHE, L. P. S.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J.; SOCCOL, C. R. Produção de Ácido Cítrico por *Aspergillus niger* LPB 21 em Fermentação no Estado Sólido com Casca de Café. In: Seminário Internacional Sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira, 3., 1999, Londrina-PR. *Anais IAPAR/ UFPR/ IRD*, Londrina, 1999.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113–4117, 1998.

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant activity of apple peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 609–614, 2003.

WONG, D. W. S. **Química de los Alimentos: Mecanismos y Teoría**. 2 ed. Zaragoza: Acribia. 1995. 475 p.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 4083-4089, 2001.

CAPÍTULO 3

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS DOS RESÍDUOS DE CAFÉ (*Coffea arabica*, L.)

Artigo a ser enviado para publicação no British Food Journal.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS DOS RESÍDUOS DE CAFÉ (*Coffea arabica*, L.)

**JANAINA BAGGIO¹, FABIANA AMARAL ARAÚJO², JORGE MANCINI FILHO² e
ROSEANE FETT^{1*}**

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Rod. Admar Gonzaga, 1346 Itacorubi CEP: 88034-001 Florianópolis - SC.

² Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Av. Lineu Prestes, 580 Butantã CEP: 05508-900 São Paulo - SP.

* e-mail: rfett@cca.ufsc.br

Resumo

Proposta

Possibilitar a utilização dos resíduos da indústria cafeeira como uma nova fonte de antioxidantes naturais e possíveis substitutos dos antioxidantes sintéticos amplamente empregados.

Metodologia

O perfil antioxidante dos compostos fenólicos presentes nos extratos dos resíduos de café (casca e pó orgânico) foi investigado através dos métodos ABTS e β -caroteno/ ácido linoléico; os resultados foram comparados com o conteúdo de fenólicos totais das amostras.

Resultados

Uma alta correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos e o índice antioxidante foi encontrada. Os dados obtidos para a atividade antioxidante através dos dois métodos são correlacionados entre si. As cascas de café mostraram atividade antioxidante apenas no extrato aquoso; por outro lado, o pó orgânico apresentou habilidade antioxidante em todos os extratos (etéreo, alcoólico e aquoso).

Originalidade

Atualmente, não existe aplicação para os resíduos da indústria cafeeira, resultando num grande problema ambiental. O objetivo deste trabalho foi prover o uso potencial destes resíduos de café amplamente gerados pelas indústrias através da sua alta concentração em compostos bioativos.

Palavras-chave: café, resíduos industriais, atividade antioxidante, polifenóis

Introdução

O Brasil detém 40% do Mercado mundial de café e é hoje em dia o segundo maior consumidor de café, superado apenas pelos Estados Unidos. Como o maior produtor de café do mundo, o Brasil apresenta uma produção anual de aproximadamente 30 milhões de sacas (Santana, 2005). O processo de pós-colheita do café gera grandes quantidades de resíduos sólidos, como a casca e o pó orgânico. Mesmo sendo um excelente fertilizante, o descarte das cascas de café pelos agricultores está se tornando um assunto de grande interesse. Estes resíduos são ricos em moléculas orgânicas, e o seu uso racional é um meio recomendável para proteger o meio ambiente, fornecendo fontes financeiras complementares para os produtores (Badocha, Costa, Leônidas, 2003; Vanderberghe, Pandey, Lebeault, Soccol, 1999). Duas espécies de café, *C. canephora* e *C. arabica*, são cultivadas no mundo todo. Entretanto, estas espécies representam somente uma pequena parte das fontes genéticas de café visto que, na natureza, o subgênero *Coffea* (gênero *Coffea*, família Rubiaceae) inclui mais 80 espécies (Campa, Doubeau, Dussert, Hamon e Noirot, 2004). O café apresenta propriedades antioxidantes; as fontes de atividade oxidante no café são os compostos fenólicos, especificamente os ácidos clorogênicos, que aparece em concentrações que variam de 6% a 10% do peso seco dos grãos (Sánchez-González, Jiménez-Escrig, Saura-Calixto, 2005).

A atividade antioxidante parece ser dependente da espécie do grão de café, mas não do país de origem; dentro das mesmas espécies de café a atividade antioxidante varia conforme o grau de torrefação dos grãos (Daglia, Papetti, Gregotti, Bertè, Gazzani, 2000).

Um antioxidante é um composto que protege os sistemas biológicos contra os potenciais efeitos danosos dos processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (Arnao, Cano, Acosta, 2001). Extratos brutos de frutas, ervas, vegetais, cereais e outros materiais de plantas ricos em

fenólicos apresentam crescente interesse na indústria alimentícia, porque retardam a degradação oxidativa dos lipídios e desta forma melhoram a qualidade e o valor nutricional dos alimentos. A importância dos constituintes antioxidantes das plantas na manutenção da saúde e na proteção contra doenças cardíacas e câncer está também aumentando o interesse entre os cientistas, produtores de alimentos e consumidores, devido à tendência para os alimentos funcionais com efeitos específicos na saúde (Kähkönen, Hopia, Vuorela, Rauha, Pihlaja, Kujala, Heinonen, 1999). Os polifenóis do café são parcialmente biodisponíveis, e conseqüentemente suas atividades *in vivo* podem ser significativas (Sánchez-González, Jiménez-Escrig, Saura-Calixto, 2005).

Apesar da atividade antioxidante do café torrado e das bebidas do café em sistemas modelo ser amplamente documentada, não existem dados relacionados à atividade antioxidante dos resíduos de café. Espera-se que as propriedades antioxidantes apresentadas pelos resíduos de café tenham implicações interessantes no que diz respeito à estabilidade lipídica e à saúde. Além disto, a substituição dos antioxidantes sintéticos, dos quais a segurança é controversa, pelos naturais deve ser benéfica, devido suas implicações na saúde e na funcionalidade nos sistemas alimentícios. Extratos naturais estão em crescente demanda pelos produtores de alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Assim, a importância de conduzir estudos sobre os resíduos de café não se restringe apenas à caracterização química, mas também à possibilidade de relacionar seus compostos químicos com propriedades funcionais (Yen, Wang, Chang, Duh, 2005).

Vários métodos têm sido aplicados para avaliar a eficácia antioxidante da dieta, tais como os compostos puros ou extratos alimentícios. A vantagem do teste ABTS é sua simplicidade, que permite sua aplicação em determinações de rotina em qualquer laboratório. Como limitações do teste ABTS, está uma que é geral para todos os métodos indiretos: o valor TEAC na verdade caracteriza a capacidade da amostra testada de reagir com o ABTS^{•+} melhor do que inibir o processo oxidativo. Com muitos fenólicos e amostras de produtos naturais a reação com ABTS^{•+} ocorre lentamente (Roginsky e Lissi, 2004).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar uma provável utilização para os resíduos de café, com base no seu potencial conteúdo de compostos bioativos. Métodos para determinar a atividade antioxidante primária foram avaliados. O método colorimétrico ABTS e o sistema β -caroteno/ ácido linoléico foram escolhidos.

Metodologia

As amostras de cascas de café foram doadas pelas Cooperativas de Produtores de Café Cooxupé (Guaxupé - MG) e Garcafé (Garça - SP), Brasil. O pó orgânico foi enviado pela Companhia Cooxupé. Os resíduos são provenientes do processo de descasque por via seca dos grãos de café.

Composição química das amostras

Os parâmetros de cafeína (950.40), proteína (991.20), fibra bruta (920.98), extrato etéreo (920.39) e cinzas (920.93) foram determinados de acordo com os métodos da AOAC (2005). Os carboidratos foram calculados por diferença. A análise de umidade seguiu o método descrito por Kirk e Sawier (1991).

Matéria seca

O peso seco dos resíduos de café (extratos) foi obtido em estufa a 105°C até peso constante. Os resíduos foram armazenados em embalagens plásticas a temperatura de congelamento (-18°C ± 2) até serem utilizados para a extração aquosa, alcoólica e etérea. Os resultados foram usados para expressar o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante.

Extração

Os extratos etéreo, alcoólico e aquoso das cascas e do pó orgânico de café foram obtidos por extração seqüencial (Moreira e Mancini Filho, 2003).

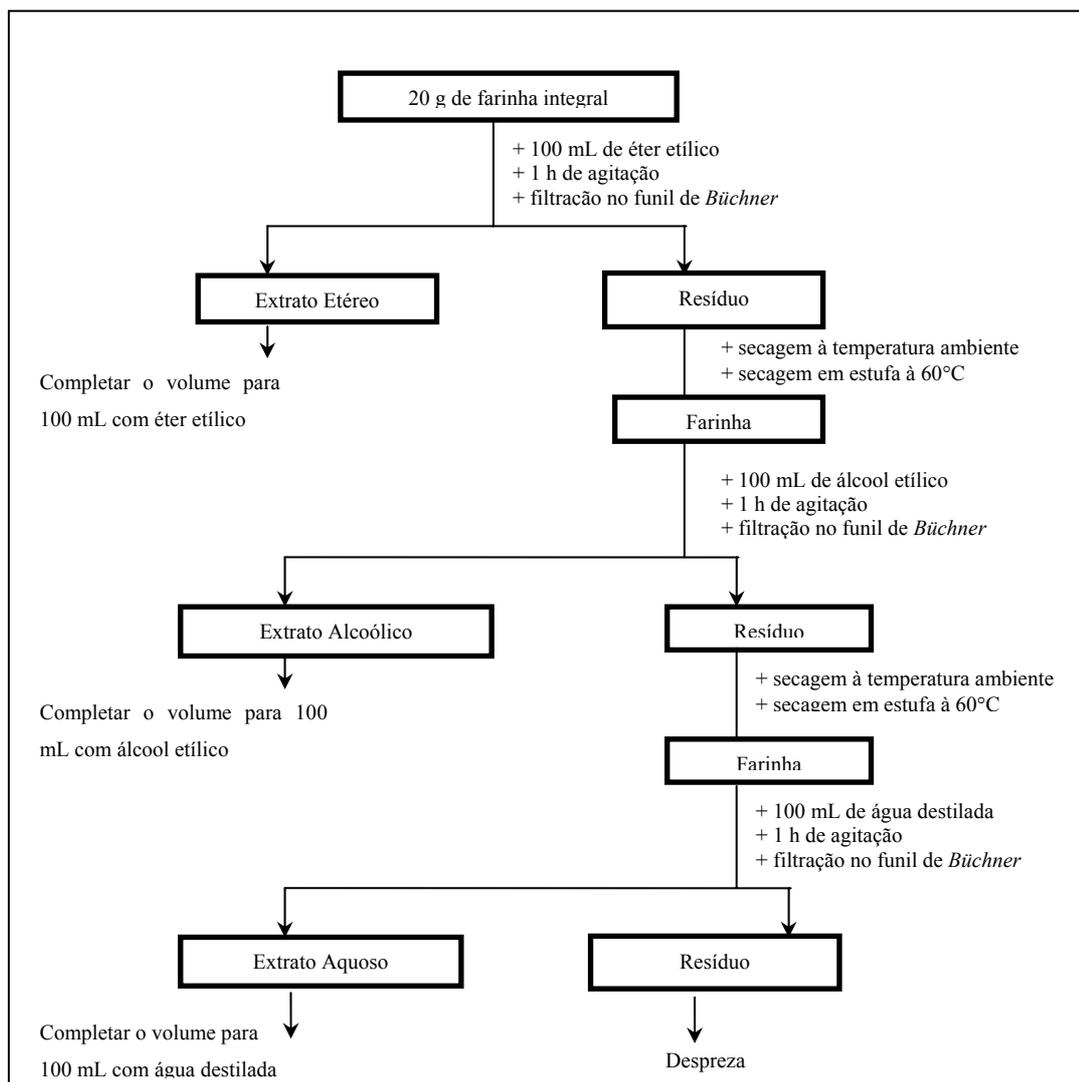


Figura 1. Processo de extração seqüencial (Moreira e Mancini Filho, 2003).

Aproximadamente 15 g dos resíduos de café foram moídos em moinho mecânico (IKA A11 Basic) e tamisados até 60 mesh. A extração foi aplicada através da agitação de frascos contendo 20g de cada farinha de amostra e 100mL de éter etílico por 1 h a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$). As soluções foram filtradas em papel filtro e o volume foi completado para 100mL com éter etílico. O resíduo proveniente desta filtração foi seco em estufa a 105°C e utilizado para a obtenção dos outros extratos com etanol e água destilada, seguindo o mesmo procedimento usado para o primeiro extrato. Todo o processo foi realizado sob luz fraca para minimizar a degradação dos fenólicos, que são sensíveis à luz.

Determinação do conteúdo de Fenólicos Totais

As concentrações de compostos fenólicos nos extratos de resíduos de café, expressas em equivalentes de ácido gálico (GAEs), foram mensuradas de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, com algumas modificações (Budini, Tonelli, Girotti, 1980). Uma alíquota de 100 µL de amostra foi misturada com 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO). Após 3 minutos, 1,5 mL Na₂CO₃ saturado foi adicionado à mistura e o volume foi completado para 10 mL com água destilada. O meio de reação foi mantido no escuro por 2 h, e a seguir sua absorvância foi lida a 764 nm. Uma curva de calibração foi construída com diferentes concentrações de ácido gálico (Vetec, Rio de Janeiro) como padrão.

Determinação da Atividade Antioxidante através do sistema β-caroteno/ ácido linoléico

A atividade antioxidante dos extratos de café baseada na co-oxidação do β-caroteno e do ácido linoléico foi avaliada seguindo-se o método de Marco (1968) com algumas modificações (Miller, 1971). O β-caroteno foi dissolvido em clorofórmio (20 mg/ mL). Uma alíquota de 30 µL desta solução foi transferida para um erlenmeyer contendo 60 µL de ácido linoléico, 1,5 mL de clorofórmio e 12 gotas de Tween 40. O clorofórmio foi evaporado com nitrogênio. Água destilada oxigenada (150 mL), que foi obtida através de aeração com oxigênio por 30 minutos, foi adicionada na emulsão de β-caroteno com agitação. Três alíquotas (50, 100 e 200 ppm), baseadas no peso seco dos extratos, foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 5 mL da emulsão de β-caroteno, e a mistura foi homogeneizada em vortex. Os tubos foram imediatamente incubados em banho-maria a 50°C. Cada amostra foi lida contra uma emulsão preparada como descrito, mas sem β-caroteno (branco), e também contra uma solução de BHT (butil hidroxi tolueno) nas mesmas concentrações das amostras. Além disso, o sinergismo foi avaliado usando-se misturas das amostras com BHT nas mesmas concentrações dos extratos puros (50, 100 e 200 ppm). A oxidação da emulsão de β-caroteno foi monitorada espectrofotometricamente através da medida da absorvância 470 nm em um espectrofotômetro Hewlett-Packard 8425^A a cada 15 minutos por 2 h. O índice antioxidante foi calculado como sendo a razão entre a taxa de descoloração da solução com amostra e a taxa de descoloração do controle (sistema sem extrato). A atividade antioxidante (AA) foi expressa como a porcentagem de inibição relativa ao controle:

$$\% \text{ AA} = 100 - (\text{Degradação da amostra} / \text{Degradação o controle}) \times 100$$

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO.

Determinação da Atividade Antioxidante através do método ABTS

ABTS [2,2'-azinobis – (3-etilbenzotiazonelina-6-ácido sulfônico)] (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) foi utilizado como o provedor de radical livre e foi gerado pela reação deste composto (7,4 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM) *overnight* (Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang, Rice-Evans, 1999). A absorvância da solução foi ajustada para $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm.

Os reagentes (980 μ L) foram transferidos para cubetas, sendo que uma delas continha 1 mL de etanol como branco. Os extratos de café (20 μ L) foram adicionados às cubetas; uma curva padrão foi preparada usando-se igual volume de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico; Aldrich Co, St. Louis, MO), um análogo da vitamina E. A queda da absorção foi medida após 6 minutos, usando um espectrofotômetro Hewlett-Packard 8425^A. Na ocorrência de inibição antioxidante, a absorvância vs. as concentrações de Trolox foram plotadas. Os resultados foram expressos em TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) por grama de cascas e pó orgânico de café (peso seco).

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey para comparar diferenças entre as médias, usando o programa *Statistica*[®] 6.0. As diferenças entre as médias no nível de 5% ($P < 0.05$) foram consideradas significativas.

Resultados e Discussão

Composição química das amostras

A composição química das cascas de café está apresentada na Tabela I, e os valores foram comparados com os dados publicados por Ribeiro Filho, Paiva, Barcelos, Rezende, Cardoso e Banys, 2000. De acordo com seus resultados, as quantidades máximas e mínimas de nutrientes das cascas de café são: 84,2% a 92,8% de matéria seca (ms); 7,25% a 11,7% de proteína; 17,7% a 21,0% de fibra bruta; 1,4% a 6,0% de extrato etéreo; 6,5% a 7,8% de cinzas; 0,48% a 1,31% de cafeína.

Tabela I. Caracterização Físico-química dos Resíduos de Café (cascas e pó orgânico)

Amostras	Parâmetros (g/ 100g)						
	Cafeína	Umidade	Proteína	Carboidratos	Fibra	E. etéreo	Cinzas
Garcafé	0,45 ± 0,07 ^a	16,73 ± 0,08 ^a	11,10 ± 0,10 ^a	44,06 ± 0,11 ^a	18,13 ± 0,06 ^a	3,26 ± 0,05 ^a	6,72 ± 0,03 ^a
Cooxupé	0,34 ± 0,05 ^a	20,17 ± 0,10 ^b	8,30 ± 0,09 ^b	47,59 ± 0,10 ^b	17,78 ± 0,05 ^b	1,20 ± 0,04 ^b	4,96 ± 0,07 ^b
Pó orgânico	0,33 ± 0,05 ^a	11,15 ± 0,10 ^c	9,60 ± 0,09 ^c	31,22 ± 0,09 ^c	38,50 ± 0,10 ^c	2,63 ± 0,05 ^c	6,90 ± 0,06 ^c

Os valores são médias ± desvio padrão de determinações em triplicata.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Os parâmetros de proteína, fibras e extrato etéreo estão de acordo com os valores encontrados na literatura (Ribeiro Filho, Paiva, Barcelos, Rezende, Cardoso e Banys, 2000). O pó orgânico apresentou um alto conteúdo de fibras (38.50%). Todas as amostras mostraram baixas quantidades de cafeína (0,45%, 0,34%, 0,33% para as cascas da Garcafé, Cooxupé e Pó Orgânico, respectivamente) em relação aos valores descritos em prévio estudo (Ribeiro Filho, Paiva, Barcelos, Rezende, Cardoso e Banys, 2000). As amostras que apresentam altos níveis de cafeína provavelmente são ricas em *C. canephora* (café Robusta); de acordo com o estudo de Ky *et al.* (2001), a razão entre “*C. canephora* / *C. arabica*” é em torno de 2,1.

Conteúdo de Fenólicos Totais

Pelo fato de os fenólicos das plantas constituírem um dos maiores grupos de compostos que agem como antioxidantes primários ou sequestradores de radicais livres, é no mínimo razoável determinar seu conteúdo total nos extratos de resíduos de café. Sabe-se que o café contém vários compostos fenólicos, outros além do tocoferol, que são dotados de capacidade antioxidante. Os polifenóis possuem estrutura química ideal para ligar radicais livres, e são antioxidantes mais efetivos *in vitro* que a vitamina E e C em base molar (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1997).

Entre os compostos fenólicos identificados no café estão os ácidos clorogênicos, uma família de ésteres formados entre o ácido quínico e diversos ácidos cinâmicos tais como o caféico, ferúlico *p*-cumárico, sendo o ácido cafeoylquínico o mais abundante; o conteúdo de fenólicos totais varia de 200 a 550 mg por xícara (Natella, Nardini, Gianetti, Dattilo e Scaccini, 2002).

A variação nos valores de fenólicos estimados na extração orgânica de diferentes cafés é de 3,9 a 6,91 g/100g de peso seco. Esta concentração é menor no caso de bebidas de café preparadas através de vários procedimentos, variando de 1,87 a 3,74 g/100g de peso seco (Sánchez-González, Jiménez-Escrig, Saura-Calixto, 2005).

Os dados da Tabela II mostram que o conteúdo total de fenólicos variou amplamente nos extratos de resíduos de café, variando entre 139,52 e 806,48 mg GAE/ 100g de matéria seca. Entre os extratos de pó orgânico, o etéreo apresentou o maior conteúdo de fenólicos totais (424,48 mg/100 g), como escrito previamente. Sob as mesmas condições de extração, o extrato alcoólico do pó orgânico também apresentou maior atividade antioxidante que o extrato aquoso. Isto pode ser atribuído ao poder de extração o etanol, que é capaz de extrair alguns compostos que possuem baixa solubilidade em água (Yen, Wang, Chang e Duh, 2005).

Yu, Ahmedna e Goktepe (2005) investigaram o conteúdo de antioxidantes e de polifenóis de um subproduto da indústria de amendoim. Eles encontraram que um grama de casca de amendoim contém de 90 a 125 mg de fenólicos totais usando etanol 80% para a extração. Estes valores são pelo menos 10 vezes maiores do que o conteúdo de fenólicos no extrato aquoso das cascas de café da Companhia Garcafé.

Tabela II. Atividade antioxidante e polifenóis totais nos extratos dos resíduos de café

Amostras	ABTS (TEAC ¹)			Fenólicos Totais (GAE ²)		
	Aquoso	Alcoólico	Etéreo	Aquoso	Alcoólico	Etéreo
Garcafé	235,33 ± 7,10 ^a	0	0	820,76 ± 12,43 ^a	0	0
Cooxupé	61,47 ± 8,13 ^b	0	0	139,52 ± 11,78 ^b	0	0
Pó orgânico*	121,06 ± 2,24 ^c	235,57 ± 7,29 ^d	735,27 ± 7,71 ^e	288,64 ± 7,16 ^c	358,49 ± 8,28 ^d	424,48 ± 9,10 ^e

¹TEAC: Atividade antioxidante equivalente ao Trolox em µm por g (peso seco).

²GAE: Equivalente ao ácido gálico em mg por 100 mg (peso seco).

Letras diferentes na mesma coluna implicam em diferença significativa (P< 0.05) pelo teste de Tukey entre as amostras.

* Letras diferentes na mesma linha implicam em diferença significativa (P< 0.05) pelo teste de Tukey entre os extratos.

Fica claro que o conteúdo de fenólicos totais mensurado pelo método de Folin-Ciocalteu não fornece uma visão geral da quantidade ou qualidade dos constituintes fenólicos nos extratos. Em adição, podem existir algumas interferências de outros componentes químicos presentes no extrato, como açúcares ou ácido ascórbico (Kähkönen, Hopia, Vuorela, Rauha, Pihlaja, Kujala, Heinonen, 1999).

Atividade Antioxidante através do sistema β -caroteno/ ácido linoléico

A capacidade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais dos extratos etéreo, alcoólico e aquoso dos resíduos de café foram determinados, mas o extrato etéreo não apresentou resultados dentro do limite de detecção dos métodos, exceto para o pó orgânico. As Figuras 2, 3 e 4 mostram as porcentagens de inibição da oxidação dos extratos aquoso e alcoólico das cascas de café e do pó orgânico com a co-oxidação do β -caroteno e do ácido linoléico. Os extratos aquosos tiveram maiores atividades antioxidantes do que os extratos alcoólicos, exceto para o pó orgânico de café (Figura 4), que indicou a 200 ppm a melhor proteção contra o processo de oxidação com uma média de 84%, seguido por 72% de inibição da oxidação pela mesma amostra a 100 ppm. Entre os extratos alcoólicos, as amostras do pó orgânico mostraram diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparados com as cascas de café da Companhia Cooxupé. Estes resultados são similares aos dados apresentados no estudo de Moreira e Mancini Filho (2003), onde o extrato aquoso de mostarda a 200 ppm teve 72% de inibição da oxidação, e o extrato etéreo de canela mostrou 83% de atividade antioxidante.

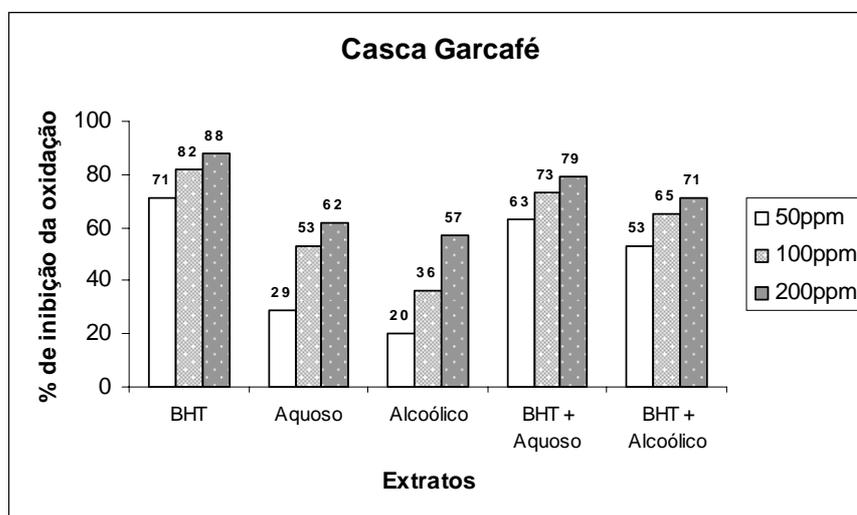


Figura 2. Atividade antioxidante dos extratos alcoólico e aquoso da casca Garcafé através do sistema β -caroteno/ ácido linoléico

Os dados da Figura 3 demonstram que o extrato aquoso das cascas da Companhia Cooxupé foi a única amostra que apresentou sinergismo quando associada ao BHT, ou seja, a mistura a 200 ppm de antioxidante sintético e amostra tiveram uma melhor performance que o extrato puro na

mesma concentração (88%). As atividades antioxidantes de ambos os extratos aquoso e alcoólico gradualmente aumentaram com o aumento da concentração dos extratos.

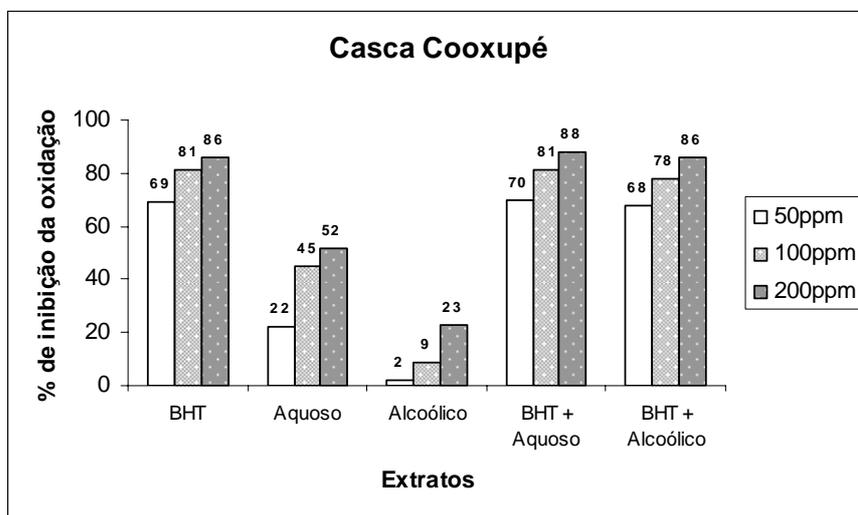


Figura 3. Atividade antioxidante dos extratos alcoólico e aquoso da casca Cooxupé através do sistema β -caroteno/ ácido linoléico

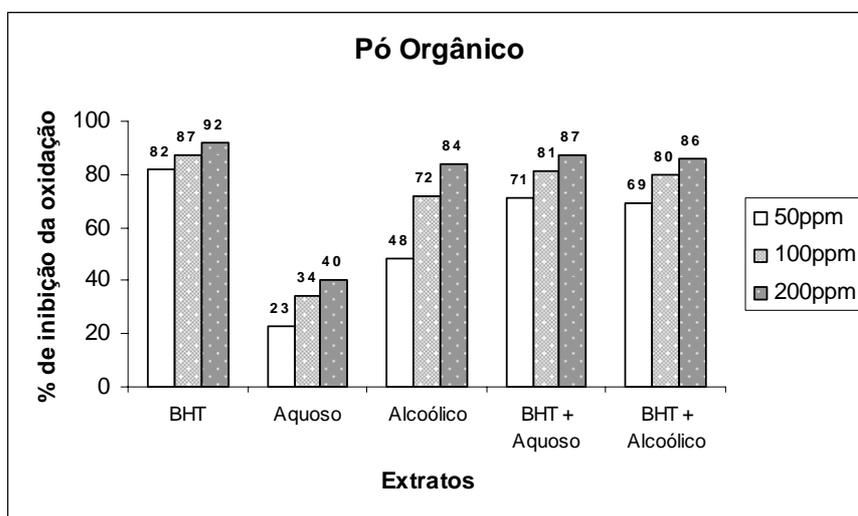


Figura 4. Atividade antioxidante dos extratos alcoólico e aquoso do pó orgânico através do sistema β -caroteno/ ácido linoléico

A atividade antioxidante dos extratos alcoólicos e aquosos os resíduos do café, bem como do branco e do controle, também pode ser visualizada na representação gráfica das diferentes leituras da absorbância vs. o tempo expressado em minutos (Figuras 5 e 6).

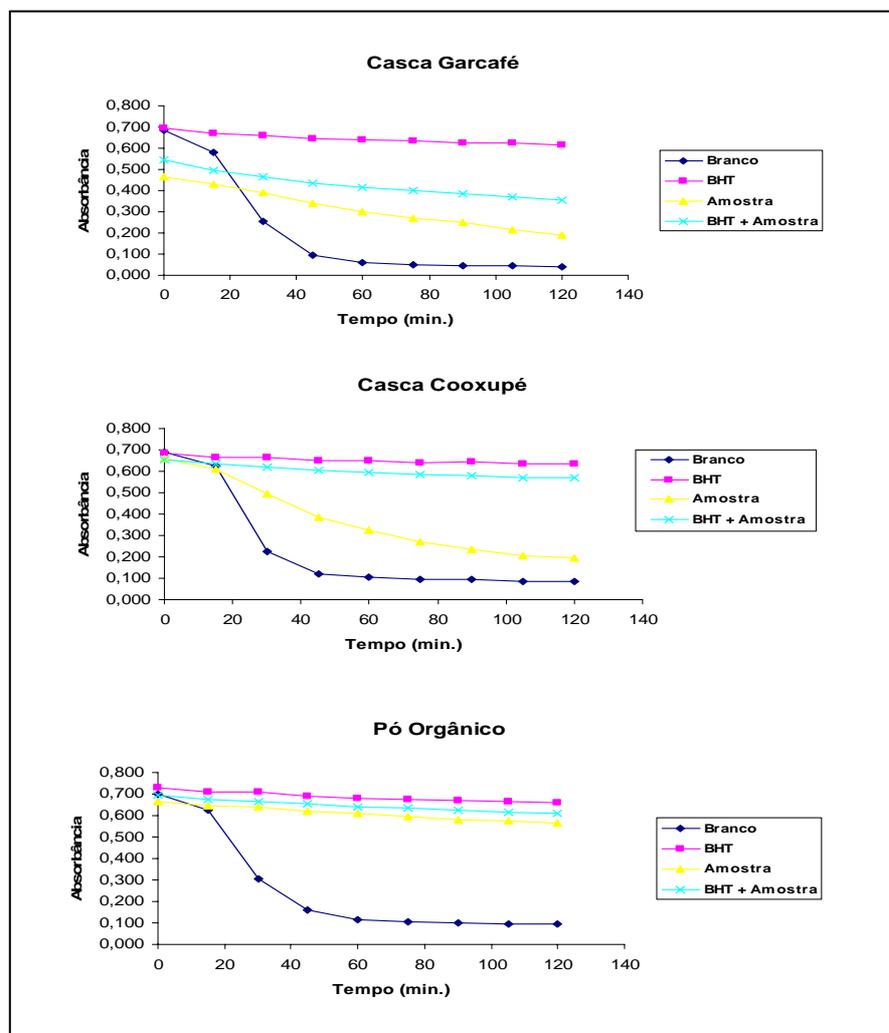


Figura 5. Atividade antioxidante dos extratos alcoólicos dos resíduos de café

É provável que os componentes antioxidantes nos extratos dos resíduos de café possam reduzir a descoloração do β -caroteno ao neutralizar o radical livre linoleato e outros radicais livres formados no sistema (Cheung, Cheung e Ooi, 2003).

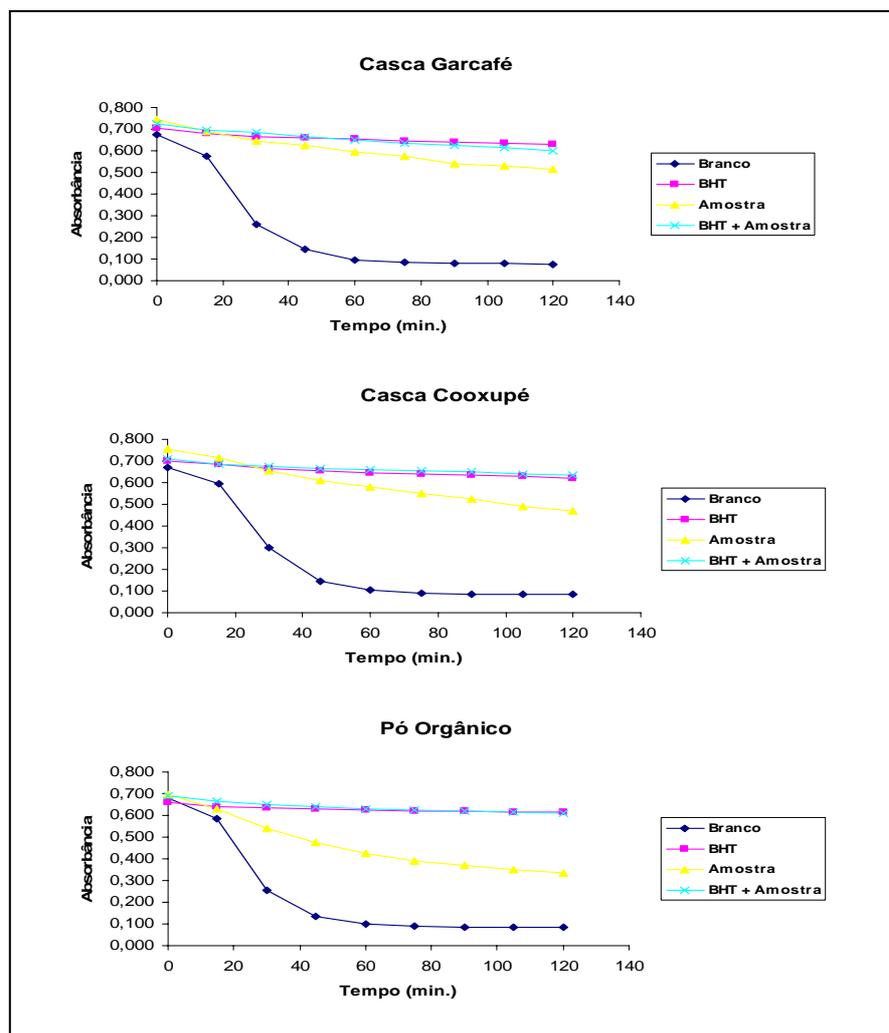


Figura 6. Atividade antioxidante dos extratos aquosos dos resíduos de café

Atividade Antioxidante através do método colorimétrico ABTS

As atividades antioxidantes dos resíduos de café foram também mensuradas com relação ao poder de sequestrar radicais, de acordo com o método ABTS, conforme mostrado na Tabela II. Neste caso, o perfil foi similar ao do sistema β -caroteno/ ácido linoléico. Todavia, é interessante notar que através deste método, o extrato etéreo do pó orgânico indicou a maior capacidade antioxidante ($735,27\mu\text{Mol Trolox/ g}$) quando comparado aos outros extratos. Diferenças significativas ($P < 0.05$) foram encontradas nos índices antioxidantes dos extratos testados.

Assim como no sistema β -caroteno/ ácido linoléico, foi encontrada uma alta correlação entre o conteúdo estimado de polifenóis e a atividade antiradical ($R^2: 0.9897$). Pode-se observar na

Figura 7 que o conteúdo de fenólicos totais influencia a TEAC dos extratos aquosos dos resíduos de café. De acordo com Charurin, Ames e Castillo (2002), as propriedades antioxidantes do café verde podem ser atribuídas a certos compostos fenólicos que incluem o ácido clorogênico, caféico, ferúlico e *p*-cumárico. Além disso, uma parte destes compostos que permanece nos resíduos de café podem mostrar atividade antioxidante.

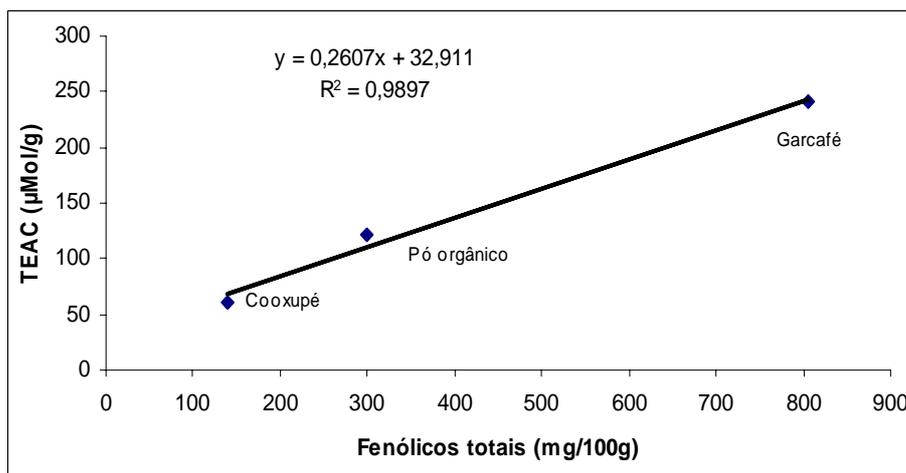


Figura 7. Gráfico de correlação dos extratos aquosos dos resíduos de café mostrando uma relação linear entre a atividade antioxidante (ABTS) e o conteúdo total de fenólicos (GAE).

Em um estudo recente, Yen, Wang, Chang, Duh (2005) acessaram a capacidade antioxidante dos resíduos de café torrado. O método DPPH foi usado para avaliar a atividade do extrato aquoso do resíduo, e o tocoferol foi o antioxidante referência. Os resultados mostraram 95,4 e 95,3% de efeito sequestrador do radical DPPH[•], respectivamente. De acordo com o teste DPPH, o resíduo atuou como um sequestrador direto de radicais livres, indicando uma ótima atividade antiradical. Os resultados apresentados na Tabela II estão de acordo com o estudo descrito. Os extratos aquosos produziram o mais significativo efeito inibitório da oxidação, mostrando que os componentes lipofílicos não são os principais antioxidantes nas cascas de café. A respeito da extração do pó orgânico, a ordem da atividade antioxidante (TEAC) nos diferentes solventes foi etéreo > alcoólico > aquoso.

Conclusões

Os resultados reportados neste estudo indicam que o extrato aquoso das cascas de café e também os extratos alcoólico e etéreo do pó orgânico mostram fortes propriedades antioxidantes, as quais podem ser principalmente atribuídas aos compostos fenólicos; estes compostos podem atuar tanto como antioxidantes primários como secundários. Os resultados obtidos indicam que o éter etílico foi o solvente mais eficiente para a extração dos fenólicos do pó orgânico. A atividade antioxidante total dos extratos dos resíduos de café foi linearmente proporcional à concentração de fenólicos totais. Considerando-se a grande produção de café no mundo, estes resultados podem ser úteis, pois indicam que os resíduos de café podem ser usados como potenciais antioxidantes naturais. Deve-se lembrar que as atividades *in vitro* são simples indicadores das potenciais atividades biológicas, refletindo apenas uma biodisponibilidade teórica. Mais trabalhos são necessários para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos de resíduos de café, para testar suas atividades antioxidantes em sistemas biológicos, e para verificar a contribuição de cada composto individual na atividade antioxidante total.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

Referências

Arnao, M. B.; Cano, A.; Acosta, M. (2001) “The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity”, *Food Chemistry*, Vol 73, pp. 239-244

Association of Official Analytical Chemists (2005), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Gaithersburg, Maryland, USA.

Badocha, T. E.; Costa, R. S. C.; Leônidas, F. C. (2003) “Casca de Café: um importante insumo para a agricultura orgânica” *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*

Budini, R.; Tonelli, D.; Girotti, S. (1980) “Analysis of total phenols using the Prussian blue method”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 28, pp. 1236-1238

Campa, C.; Doubeau, S.; Dussert, S.; Hamon, S.; Noiro, M. (2004) "Qualitative relationship between caffeine and chlorogenic acid contents among wild *Coffea* species", Food Chemistry, Vol 93, pp. 135-139

Charurin, P.; Ames, J. M.; Castillo, M. D. (2002) "Antioxidant activity of coffee model systems", Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol 50, pp. 3751-3756

Cheung, L. M.; Cheung, P. C. K.; Ooi, V. E. C. (2003) "Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts", Food Chemistry, Vol 81, pp. 249-255

Daglia, M.; Papetti, A.; Gregotti, C.; Bertè, F.; Gazzani, G. (2000) "In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee", Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol 48, pp. 1449-1454

Kähkönen, M. P.; Hopia, A. I.; Vuorela, H. J.; Rauha J.; Pihlaja, K.; Kujala, T. S.; Heinonen, M. (1999) "Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds", Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol 47, No 10, pp. 3954-3962

Kirk, R. S.; Sawyer, R. (1991), Pearson's Composition and Analysis of Foods, Longman Group Limited, England.

Ky, C. -L.; Louarn, J.; Dussert, S.; Guyot, B.; Hamon, S.; Noiro, M. (2001) "Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea Arabica* L. and *C. canephora* P. accessions", Food Chemistry, Vol 75, pp. 223-230

Marco, G. J. (1968) "A Rapid Method for Evaluation of Antioxidants", Journal of the American Oil Chemist's Society, Vol 45, pp. 594-598

Miller, H. E. (1971) "A simplified method for the evaluation of antioxidants", Journal of the American Oil Chemist's Society, Vol 48, pp. 91

Moreira, A. V. B.; Mancini Filho, J. (2003) "Atividade Antioxidante das Especiarias Mostarda, Canela e Erva-doce em Sistemas Aquoso e Lipídico", Nutrire - Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr., Vol 25, pp. 31-46

Natella, F.; Nardini, M.; Gianetti, I.; Dattilo, C.; Scaccini, C. (2002) “Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 50, pp. 6211-6216

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999) “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourization assay”, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol 26, pp. 1231-1237

Ribeiro Filho, E.; Paiva, P. C. A.; Barcelos, A. F.; Rezende, M.; Cardoso, R. M.; Banyas, V. L. (2000) “Efeito da Casca de Café (*Coffea arabica*, L.) no Desempenho de Novilhos Mestiços de Holandês-Zebu na Fase de Recria”, *Ciênc. Agrotec.*, Vol 24 No 1, pp. 225-232

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. (1997) “Antioxidant properties of phenolic compounds”, *Trends in plant science*, Vol 2 No 4, pp.152-159

Roginsky, V.; Lissi, E. A. (2004) “Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food”, *Food Chemistry*, Vol 92 No 2, pp. 235-254

Sánchez-González, I.; Jiménez-Escrig, A.; Saura-Calixto, F. (2005) “In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter)”, *Food Chemistry*, Vol 90 No 1-2, pp. 133-139

Santana, E. (2005) “CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento”, *News Cafeicultura*. Available <http://www.newscafeicultura.com.br>

Vanderberghe, L. P. S.; Pandey, A.; Lebeault, J.; Soccol, C. R. (1999) “Produção de Ácido Cítrico por *Aspergillus niger* LPB 21 em Fermentação no Estado Sólido com Casca de Café” Seminário Internacional Sobre Biotecnologia na Agroindústria Cafeeira

Yen, W.; Wang, B.; Chang, L.; Duh, P. (2005) “Antioxidant properties of roasted coffee residues”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 53, pp. 2658-2663

Yu, J.; Ahmedna, M.; Goktepe, I. (2005) “Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics”, *Food Chemistry*, Vol 90 No 1-2, pp. 199-206

CAPÍTULO 4

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO PÓ ORGÂNICO DE CAFÉ (*Coffea arabica*, L.) E SUA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Artigo a ser enviado para publicação no Italian Journal of Food Science.

IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO PÓ ORGÂNICO DE CAFÉ (*Coffea arabica*, L.) E SUA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Janaina Baggio ^a, Alessandro Lima ^b, Jorge Mancini Filho ^b, Roseane Fett ^{a*}

^a Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Rod. Admar Gonzaga, 1346 Itacorubi CEP: 88034-001 Florianópolis - SC.

^b Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Av. Lineu Prestes, 580 Butantã CEP: 05508-900 São Paulo - SP.

Resumo

O uso racional dos subprodutos da indústria cafeeira é um meio recomendável de proteção do meio ambiente. O pó orgânico é gerado durante o processo de padronização do café descascado. Os extratos etéreo, alcoólico e aquoso do pó orgânico de café foram obtidos por extração sequencial, e o efeito dos solventes utilizados para a extração (éter, etanol e água) no conteúdo de fenólicos totais e na atividade antioxidante total (AA) dos extratos foi estudado. A concentração de compostos fenólicos foi expressa em equivalentes de ácido gálico (GAE), de acordo com o método de Folin-Ciocalteu. A atividade antioxidante foi investigada pelo método ABTS, o qual quantifica o sequestro deste radical espectrofotometricamente. A identificação dos ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e ésteres insolúveis foi determinada por cromatografia gasosa. Uma alta correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos e o índice antioxidante foi encontrada. A ordem de atividade antioxidante (TEAC) em diferentes solventes foi etéreo > alcoólico > aquoso. O ácido salicílico apresentou-se em concentrações superiores a 90% em todas as frações de ácidos fenólicos do pó orgânico. Estes dados indicam que estes resíduos do café possuem um excelente potencial como fonte de antioxidantes naturais.

* E-mail: rfett@cca.ufsc.br

1. Introdução

O processamento de alimentos derivados de plantas resulta na produção de subprodutos, os quais são fontes ricas de compostos bioativos, incluindo os compostos fenólicos (Schieber, Stintzing e Carle, 2001). A disponibilidade dos compostos fenólicos provenientes dos resíduos agrícolas e industriais, suas extrações e atividade antioxidante foram objetos de uma revisão de Moure et al. (2001).

O Brasil é o maior produtor de café do mundo e está se tornando um significativo competidor na especialidade da indústria cafeeira. Sua produção é em torno de 25% do suprimento mundial de café; 80% deste é Arábica. A grande maioria dos cafés são ainda processados por via seca, e o Brasil é um dos poucos países no mundo que tem o clima apropriado para fazê-lo com sucesso (Coffeeresearch, 2005). Nos dias de hoje, não existem aplicações para os resíduos da indústria do café, e o alto custo para coletar, transportar e armazenar estes resíduos torna sua utilização inviável. O pó orgânico é gerado durante o processo de padronização do café descascado. Cada 300 mil sacas produzem por mês aproximadamente 25 toneladas de pó. Este resíduo tem sido utilizado como fertilizante e como ração animal (Santa Clara, 2004).

Subprodutos agrícolas contêm uma gama de espécies biologicamente ativas que em grande parte são descartadas. Particularmente, a maioria dos materiais derivados de plantas é rica em polifenóis antioxidantes (Rice-Evans, 2001).

Alguns constituintes de plantas da dieta, como os flavonóides e os fenólicos relacionados, são considerados poderosos antioxidantes *in vitro* e são assumidos como sendo parcialmente responsáveis pela relação inversa entre o consumo de frutas e vegetais e o risco de doenças degenerativas. Os polifenóis são dotados de atividades biológicas, tais como modulação de enzimas, ativação de fatores de transcrição e expressão gênica (Natella, Nardini, Gianetti, Dattilo e Scaccini, 2002). Os ácidos fenólicos são classificados em três grupos. No primeiro grupo estão os ácidos benzóicos, os mais simples encontrados na natureza. Ao segundo grupo pertencem os ácidos cinâmicos; as cumarinas são derivadas do ácido cinâmico (Figura 1).

Apesar de não terem sua atividade antioxidante estudada extensivamente como a dos flavonóides, os ácidos fenólicos são importantes antioxidantes de frutas e bebidas devido às altas concentrações. Um exemplo é a predominância de ácido clorogênico particularmente nas frutas (Azuma, Ippoushi, Nakayama, Ito, Higashio e Terao, 2000).

Os compostos fenólicos mais prevalentes nos alimentos são os ácidos hidroxicinâmicos, e o componente mais importante desta classe é o ácido caféico, que ocorre nos alimentos principalmente como ésteres chamados ácidos clorogênicos. O café é a maior fonte de ácidos clorogênicos na dieta humana; o consumo diário por consumidores regulares varia de 0,5 a 1 grama, enquanto os abstêmios normalmente ingerem < 100 mg/ dia (Castillo, Ames e Gordon, 2002).

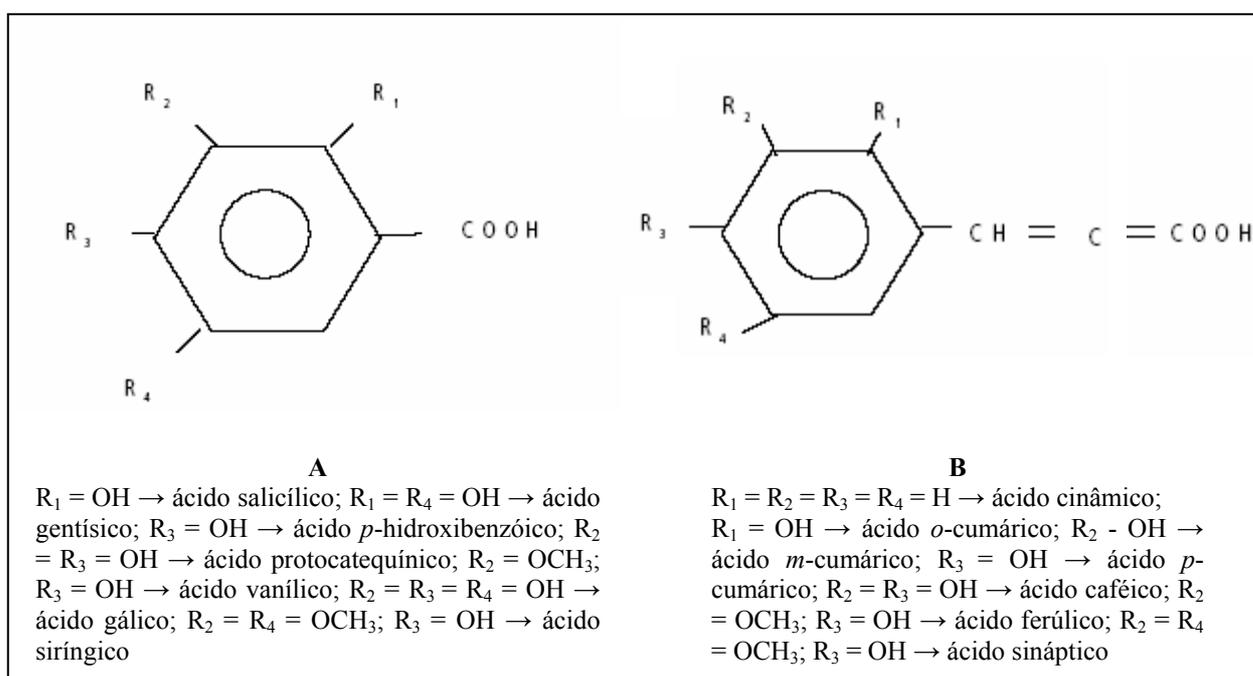


Figura 1. Estrutura química dos ácidos benzóicos (A) e ácidos cinâmicos (B) (Soares, 2002).

As propriedades antioxidantes das bebidas de café e do café torrado têm sido amplamente estudadas em sistemas modelo. Entretanto, evidências a respeito da atividade antioxidante os resíduos de café são necessárias; seu aproveitamento potencial deve ser considerado, devido ao seu alto conteúdo de compostos bioativos (Yen, Wang, Chang, Duh, 2005).

Recentemente, existe um interesse considerável na procura por antioxidantes naturais derivados de materiais de plantas, buscando substituir os sintéticos. Presume-se que as substâncias antioxidantes naturais sejam seguras, por estarem presentes nas plantas, além de apresentarem implicações na saúde e funcionalidade nos sistemas alimentícios (Chanwitheesuk, Teerawutgulrag e Rakariyatham, 2005).

Desta forma, a importância de conduzir estudos sobre os resíduos de café não se restringe apenas à sua caracterização química, mas também à possibilidade de relacionar os compostos presentes com propriedades funcionais particulares (Yen, Wang, Chang, Duh, 2005).

Os objetivos deste estudo foram determinar os fenólicos totais no pó orgânico de café extraídos com diferentes solventes, avaliar a atividade antioxidante total através do método colorimétrico ABTS, e identificar os compostos fenólicos ativos nas frações (livres, ésteres solúveis e insolúveis) do pó orgânico por cromatografia gasosa.

2. Material e métodos

2.1 Amostra

As amostras de pó orgânico de café foram doadas pela Cooperativa de Produtores de Café Cooxupé (Guaxupé - MG), Brasil. O resíduo é resultado do processamento por via seca dos grãos de café.

2.2 Reagentes

O reagente fenólico Folin-Ciocalteu, ABTS [2,2'-azinobis - (3-etilbenzotiazonelina-6-ácido sulfônico)], Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) e padrões incluindo os ácidos metil éster heptadecanóico, salicílico, protocatequínico, clorogênico, elágico, cinâmico, vanílico, *o*-cumárico, gentísico, quínico, *p*-cumárico, gálico, ferúlico, caféico e sináptico foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO.

2.3 Preparo da amostra

O conteúdo de matéria seca do pó orgânico de café (extratos e frações) foi obtido em estufa a 105°C até peso constante. Os resultados foram usados para expressar o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante por peso seco. Os resíduos foram armazenados em embalagens plásticas à temperatura de congelamento (-18°C ± 2) até serem utilizados para a extração aquosa, alcoólica e etérea.

2.4 Preparo dos extratos

Os extratos etéreo, alcoólico e aquoso do pó orgânico de café foram obtidos por extração seqüencial, de acordo com Moreira e Mancini Filho (2003).

O pó orgânico de café foi pesado (15 g) e tamisado até 60 mesh. A extração foi aplicada através da agitação de frascos contendo 20g de farinha de amostra e 100mL de éter etílico por 1 hora à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$). As soluções foram filtradas em papel filtro e o volume foi completado para 100mL com éter etílico. O resíduo resultante da filtração foi seco em estufa a 105°C e utilizado para a obtenção dos outros extratos com etanol e água destilada, seguindo o mesmo procedimento usado para o primeiro extrato. Todo o processo foi realizado sob luz fraca para minimizar a degradação dos fenólicos, que são sensíveis à luz.

2.5 Determinação do conteúdo de fenólicos totais

As concentrações de compostos fenólicos nos extratos de pó orgânico de café, expressas em equivalentes de ácido gálico (GAE), foram mensuradas de acordo com o método de Folin-Ciocalteu, com algumas modificações (Budini, Tonelli, Girotti, 1980). Uma alíquota de 100 μL de amostra foi misturada com 500 μL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO). Após 3 minutos, 1,5 mL de solução saturada de Na_2CO_3 foi adicionado à mistura e o volume foi completado para 10 mL com água destilada. O meio de reação foi mantido no escuro por 2 horas, e a absorbância foi lida a 764 nm. Uma curva de calibração foi construída com diferentes concentrações de ácido gálico como padrão.

2.6 Determinação da Atividade Antioxidante através do método ABTS

ABTS [2,2'-azinobis - (3-etilbenzotiazonelina-6-ácido sulfônico)] (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO) foi utilizado como o provedor de radical livre e foi gerado pela reação deste composto (7,4 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM) *overnight* (Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang, Rice-Evans, 1999). A absorbância da solução foi ajustada para $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm.

Após seis minutos de incubação em cubetas contendo 980 μL de solução de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e 20 μL de extratos de pó orgânico, medidas foram conduzidas para quantificar a queda da absorção utilizando um espectrofotômetro Hewlett-Packard 8425A. O etanol foi usado como branco. A curva padrão foi preparada usando volume similar de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), um análogo da vitamina E. A porcentagem de inibição da oxidação foi calculada para cada amostra em relação à absorbância do branco, e foi plotada em função da concentração de Trolox. Os resultados foram expressos em TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), por grama de pó orgânico de café (peso seco).

2.7 Obtenção das frações de ácidos fenólicos

A obtenção das frações dos ácidos fenólicos solúveis, ésteres solúveis e ligantes insolúveis (Figura 2) seguiu o método descrito por Krygier, Sosulski e Hohhe (1982), com modificações (Sotero, 2002).

2.7.1 Extração dos ácidos fenólicos livres

Um grama da amostra de pó desengordurado foi extraído 6 vezes com 20 mL de tetrahydrofurano e homogeneizado por 5 minutos em vortex. O sobrenadante resultante das extrações foi filtrado e desidratado com sulfato de sódio anidro. A fração foi evaporada em evaporador rotativo a vácuo (Fisatom 802) a 40°C e diluída em 5 mL de tetrahydrofurano. O extrato contendo a fração de ácidos fenólicos livres foi armazenado em vidro âmbar, em congelador e atmosfera de nitrogênio.

2.7.2 Extração dos ésteres solúveis de ácidos fenólicos

O resíduo proveniente da extração dos ácidos fenólicos livres foi utilizado para novos processos de extração. Os fenólicos solúveis da amostra foram extraídos 6 vezes com 20 mL de solução de metanol:acetona:água (7:7:6). A amostra foi agitada por 5 minutos e centrifugada. Ao final da extração, o sobrenadante foi evaporado sob vácuo a 40°C, até fase aquosa. Para liberar os ésteres solúveis, que estavam esterificados com proteínas e polipeptídios, um volume igual de hidróxido de sódio 4N foi adicionado. Após 3 horas de hidrólise, a temperatura ambiente e escuro, o pH foi corrigido para 2 com HCl 6N, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um funil de separação e extraído com hexano (1:1), para eliminar os ácidos graxos livres e outros contaminantes, e também para extrair os fenólicos da fase aquosa com uma mistura de éter dietílico - acetato de etila - tetrahydrofurano (1:1:1), por 6 vezes, sob agitação. A fração foi filtrada e desidratada com sulfato de sódio anidro, evaporada a 40°C, e ressuspensa em 5 mL de tetrahydrofurano. O armazenamento seguiu o processo descrito.

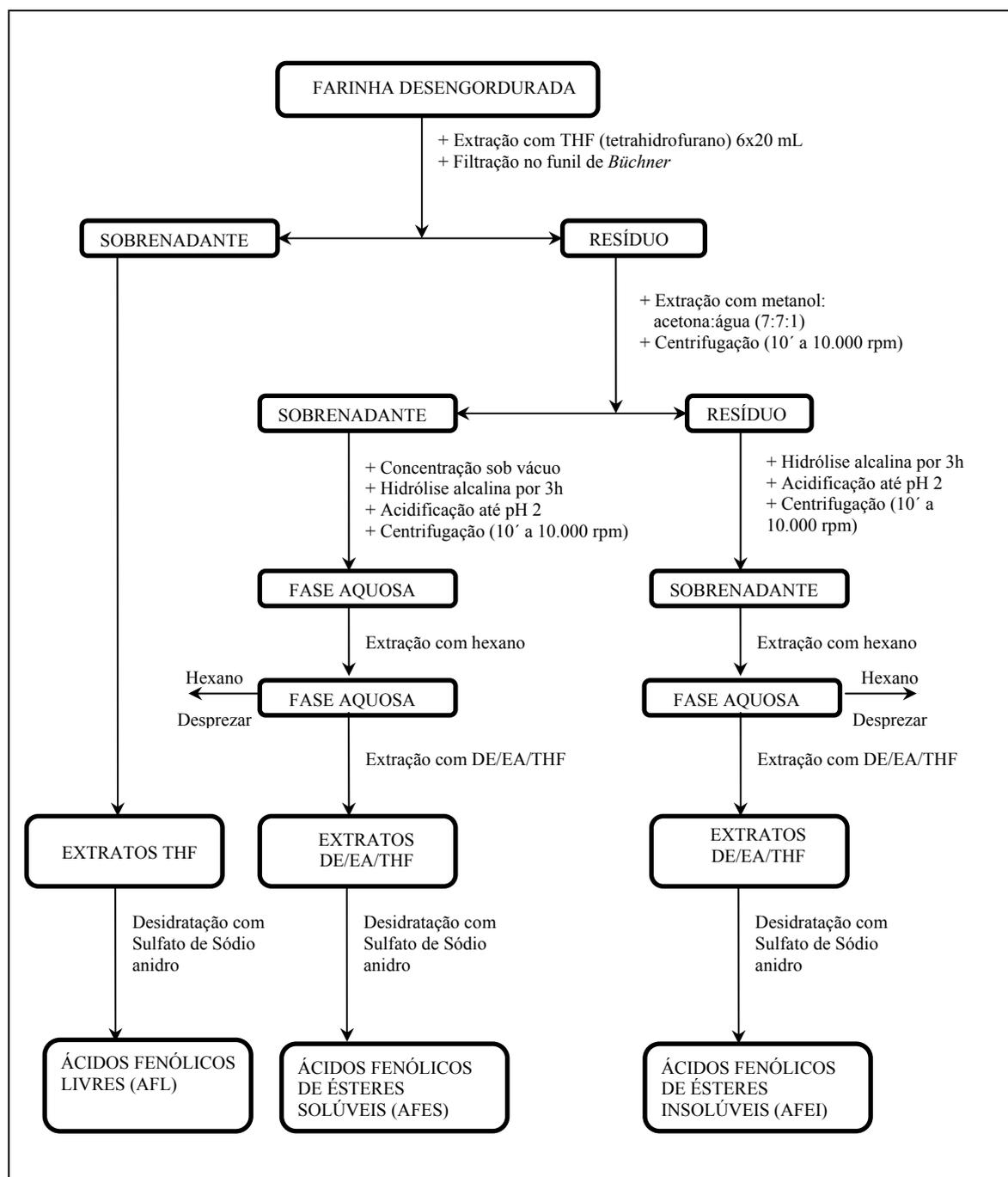


Figura 2. Extração das frações de ácido fenólicos - ácidos fenólicos livres, ésteres solúveis e ésteres insolúveis (Sotero, 2002).

2.7.3 Extração dos ésteres insolúveis de ácidos fenólicos

O resíduo da extração dos fenólicos solúveis foi hidrolisado com 25 mL de NaOH 4N, por 3 horas, a temperatura ambiente e escuro. O extrato dos ésteres insolúveis de ácidos fenólicos foi

acidificado até pH 2 usando HCl 6N, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. A partir deste ponto, o procedimento foi o mesmo que o aplicado para o filtrado de ésteres solúveis do pó orgânico de café.

2.8 Identificação dos ácidos fenólicos por cromatografia gasosa

A identificação dos fenólicos foi baseada nos tempos de retenção dos padrões e conduzida em um cromatógrafo Shimadzu, modelo GC 17A, equipado com detector de ionização de chama. As condições cromatográficas seguiram os procedimentos descritos por Dabrowski e Sosulski (1984) com modificações feitas por Moreira e Mancini Filho (2003).

Foi usada uma coluna semipolar DB5 (J & W[®]), 30 m x 0.25 mm; as condições de operação foram as seguintes: temperatura inicial da coluna a 150°C, isotérmica por 3 minutos; de 150 a 300°C em uma velocidade de 5°C/ min; isotérmica a 300°C por 3 minutos. A temperatura da câmara de injeção foi de 250°C e a do detector foi de 300°C.

Uma solução padrão foi preparada diluindo os 18 ácidos fenólicos em metanol, e uma alíquota desta solução foi adicionada ao padrão interno (ácido metil éster heptadecanóico) antes da injeção no cromatógrafo.

2.9 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Foram utilizadas as análises de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre as médias, usando o programa *Statistica*[®] 6.0. Diferenças entre as médias no nível de 5% ($P < 0,05$) foram consideradas significantes.

3. Resultados e discussão

3.1 Determinação do conteúdo de fenólicos totais

Os dados na Tabela I mostram que os extratos de pó orgânico contêm altos níveis de fenólicos totais e que os solventes usados para a extração também afetaram significativamente a concentração total de fenólicos. O éter etílico foi mais efetivo para extrair os compostos fenólicos do pó orgânico de café que o etanol e a água, apresentando 424,48 mg GAE/ 100g de matéria seca.

Gross et al. (1997) reportaram que os grãos de café contêm de 8,7 a 2,2 g /kg de material lipídico, e as classes de lipídios nos grãos de café foram identificadas como triacilgliceróis, ésteres terpênicos, esteróis livres, esteróis esterificados, ácidos graxos livres, acilgliceróis e lipídios polares, os quais podem explicar porque o hexano é capaz de produzir o maior rendimento dos extratos.

Tabela I. Atividade antioxidante e fenólicos totais dos extratos e frações do pó orgânico de café.

ABTS (TEAC ¹ μ M/ g \pm DP)				Fenólicos totais (GAE ² mg/ 100 g \pm DP)			
<i>Extratos</i>		<i>Frações</i>		<i>Extratos</i>		<i>Frações</i>	
Aquoso	121,06 \pm 2,24 ^a	AFL ^x	1.743,98 \pm 3,33 ^d	Aquoso	288,64 \pm 7,16 ^a	AFL ^x	4.620,94 \pm 8,56 ^d
Alcoólico	235,57 \pm 7,29 ^b	AFES ^y	926,68 \pm 6,74 ^d	Alcoólico	358,49 \pm 8,28 ^b	AFES ^y	2.013,26 \pm 10,49 ^e
Etéreo	735,27 \pm 7,7 ^c	AFEI ^z	1.342 \pm 10,34 ^e	Etéreo	424,48 \pm 9,10 ^c	AFEI ^z	2.796,56 \pm 9,87 ^f

¹TEAC: Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox em μ m por g (peso seco).

²GAE: Equivalentes em ácido gálico em mg por 100 mg (peso seco).

^{x, y, z} ácidos fenólicos livres, ácidos fenólicos de ésteres solúveis e ácidos fenólicos de ésteres insolúveis, respectivamente.

Os valores são as médias \pm o desvio padrão de determinações em triplicata.

Letras diferentes na mesma coluna implicam em diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as amostras.

Sánchez-González, Jiménez-Escrig, e Saura-Calixto, 2005, em pesquisas sobre o efeito do processamento de cafés no conteúdo de fenólicos totais em extratos orgânicos, obtiveram valores médios entre 3,9 a 6,91 g GAE/ 100g de peso seco. Este conteúdo é menor no caso das bebidas preparadas com estes cafês, que variam de 1,87 a 3,74 g GAE/ 100g de peso seco.

Chanwitheesuk, Teerawutgulrag e Rakariyatham (2005) investigaram a atividade antioxidante de um grande número de plantas da Tailândia. De acordo com os seus resultados, os extratos metanólicos de gengibre (*Zingiber officinale*) e tamarindo (*Tamarindus indica*) apresentaram 60,1 e 121 mg GAE/ 100g, respectivamente. Estes valores são inferiores ao conteúdo de fenólicos presentes nos extratos de pó orgânico.

Na Tabela I são também apresentados os resultados do conteúdo de fenólicos totais das frações (AFL, AFES e AFEI) do pó orgânico, variando de 2.013,26 a 4.620,94 mg GAE/ 100 g de peso seco. Como pode ser observado, a fração de ácidos fenólicos livres (AFL) é a que apresentou maior valor, duas vezes maior que o conteúdo dos polifenóis presentes nas folhas de sálvia - 2.260 mg GAE/ 100g (Miliauskas, Venskutonis e van Beek, 2004).

3.2 Determinação da Atividade Antioxidante através do método ABTS

Considerando-se a quantidade significativa de compostos fenólicos presentes nos extratos e nas frações do pó orgânico de café, tornou-se razoável a avaliação da atividade antioxidante destes resíduos.

Como visto na Tabela I, a AA dos extratos do pó orgânico de café foi afetada pelos solventes extratores ($P < 0,05$). Os valores oscilaram entre 121,02 e 735,27 $\mu\text{M/g}$ de peso seco, e a ordem de atividade dos extratos de pó orgânico de café foi: etéreo > alcoólico > aquoso.

Sánchez-González, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005) encontraram a maior atividade antioxidante no método de preparação italiano (117 $\mu\text{M Trolox/g}$); este valor é menor que o resultado obtido para o extrato aquoso do pó orgânico (121,02 $\mu\text{M Trolox/g}$).

Houve uma alta correlação entre o conteúdo calculado de polifenóis e a TEAC (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox) ($r: 0,9585$; $P < 0,05$). Conseqüentemente, o nível de atividade antioxidante avaliado pelos métodos *in vitro* pode ser determinado principalmente pelos polifenóis dos extratos do pó orgânico de café (Figura 3).

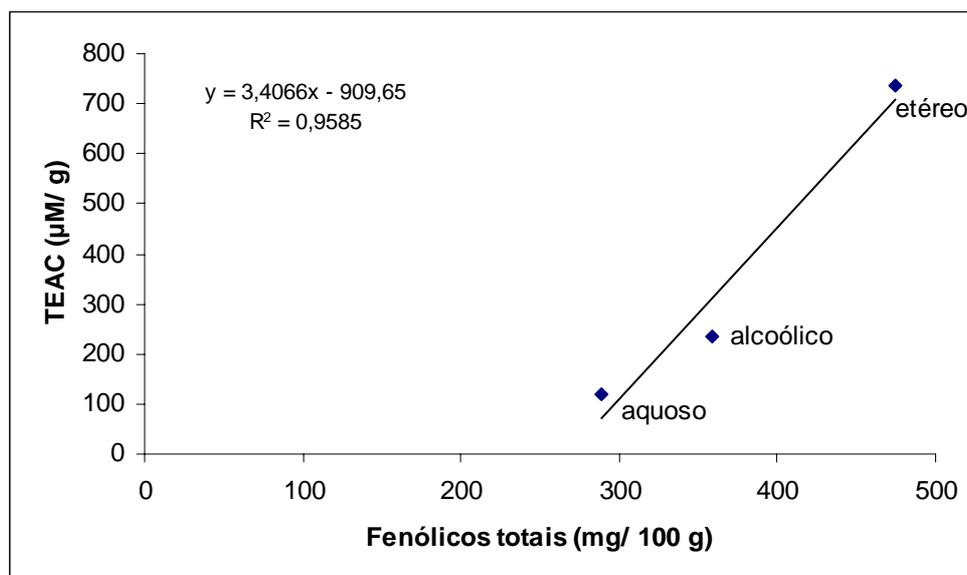


Figura 3. Gráfico de correlação entre a atividade antioxidante e os fenólicos totais dos extratos aquoso, alcoólico e etéreo do pó orgânico de café.

Conforme esperado, todas as frações dos ácidos fenólicos apresentaram atividade antioxidante acentuada, indicando que o processo de fracionamento dos fenólicos levou à obtenção de compostos com expressiva atividade. Na Tabela I pode-se visualizar que a fração de ácidos fenólicos livres apresentou o maior poder antioxidante (1.743,98 μM Trolox/ g).

3.3 Identificação dos ácidos fenólicos por cromatografia gasosa

Os ácidos fenólicos são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo (Soares, 2002).

Na Tabela II são apresentados os ácidos fenólicos identificados nas frações do pó orgânico de café, através da comparação com os tempos de retenção dos padrões.

O ácido caféico é o composto fenólico mais abundante na bebida de café, e é dotado de forte atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (Natella, Nardini, Gianetti, Dattilo e Scaccini, 2002). Todas as frações de pó orgânico apresentaram ácido caféico, e suas concentrações (0,12; 1,77 e 1,04, para AFL, AFES e AFEI, respectivamente) ficaram apenas abaixo do ácido salicílico e do gentísico.

Tabela II. Composição de compostos fenólicos (%) nas frações do pó orgânico de café

Ácidos fenólicos	Pó orgânico		
	<i>AFL</i> ¹	<i>AFES</i> ²	<i>AFEI</i> ³
Salicílico	98,82 ± 0,45 ^a	94,41 ± 0,46 ^b	95,48 ± 1,55 ^b
Protocatequínico	0,36 ± 0,16 ^a	0,19 ± 0,0047 ^b	–
Clorogênico	0,35 ± 0,0003 ^a	0,24 ± 0,009 ^a	–
Elágico	0,77 ± 0,0003 ^a	0,46 ± 0,12 ^b	–
Cinâmico	0,09 ± 0,0002	–	–
Vanílico	0,07 ± 0,0017	–	–
o-cumárico	0,21 ± 0,0003	–	–
Gentísico	0,26 ± 0,001 ^a	0,87 ± 0,021 ^b	2,52 ± 0,135 ^c
Quínico	–	–	0,21 ± 0,013
p-cumárico	0,07 ± 0,0016 ^a	–	0,18 ± 0,015 ^b
Gálico	–	–	0,21 ± 0,023
Ferúlico	0,13 ± 0,0002 ^a	0,77 ± 0,025 ^b	0,21 ± 0,009 ^c
Caféico	0,12 ± 0,0012 ^a	1,77 ± 0,093 ^b	1,04 ± 0,06 ^c
Sináptico	0,13 ± 0,005 ^a	0,5 ± 0,019 ^b	1,02 ± 0,05 ^c

1, 2, 3: ácidos fenólicos livres, ácidos fenólicos de ésteres solúveis e ácidos fenólicos de ésteres insolúveis, respectivamente.

Os valores são as médias ± o desvio padrão de determinações em triplicata.

Letras diferentes na mesma linha implicam em diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as amostras.

Fontes de atividade oxidante no café são os compostos fenólicos (Lajolo, Saura-Calixto, Penna e Wenzel, 2001), especialmente os ácidos clorogênicos, em concentrações que variam de 6% a 10% do peso seco dos grãos (Olthof, Zock e Katn, 2001).

Sroka e Cisowski, 2003, investigaram a atividade antirradical de alguns ácidos fenólicos através do método DPPH. Os resultados mostraram que a atividade mais forte de seqüestro do DPPH[•] foi exibida pelo ácido gálico, com 3 grupos hidroxila ligados ao anel aromático na posição *orto*. Os ácidos fenólicos com 2 grupamentos hidroxila ligados ao anel aromático na posição *orto*, os

ácidos caféico e protocatequínico, mostraram alta atividade antioxidante. Compostos com apenas um grupamento hidroxila, como o ácido salicílico, exibiram a menor atividade antiradical. Os resultados obtidos mostraram que a atividade antioxidante dos fenólicos correlacionou-se positivamente com o número de grupos hidroxila ligados ao anel aromático. Considerando-se os dados apresentados neste estudo, torna-se claro que, apesar da alta concentração de ácido salicílico em todas as frações, esta não foi responsável pela atividade antioxidante.

Outros ácidos fenólicos presentes em baixas concentrações nas frações do pó orgânico podem ser determinantes para a atividade antioxidante; estes apontamentos podem ser confirmados por um estudo relatado por Soares (2002), no qual os ácidos fenólicos e cinâmicos presentes nos grãos de soja, na farinha de soja desengordurada e no isolado protéico de soja foram investigados. Quatro ácidos fenólicos apresentaram atividade antioxidante significativa - ácido clorogênico (maior conteúdo e atividade), caféico, *p*-cumárico e ferúlico.

Alguns estudos mostraram que compostos bioativos tais como ácido clorogênico, cafeína, ácido caféico, ácido nicotínico, trigonelina e 5-(hidroximetil) furfuraloleída foram encontrados no café (Tamura, H. e Shibamoto, T., 1991; Martin, M. J., Pablos, F. e Gonzalez, A. G., 1998; Ky, C. L. et al., 2001).

A fração de ácidos fenólicos de ésteres solúveis (AFES) exibiu o maior conteúdo de ácido caféico (1,77 %), conforme apresentado na Figura 4.

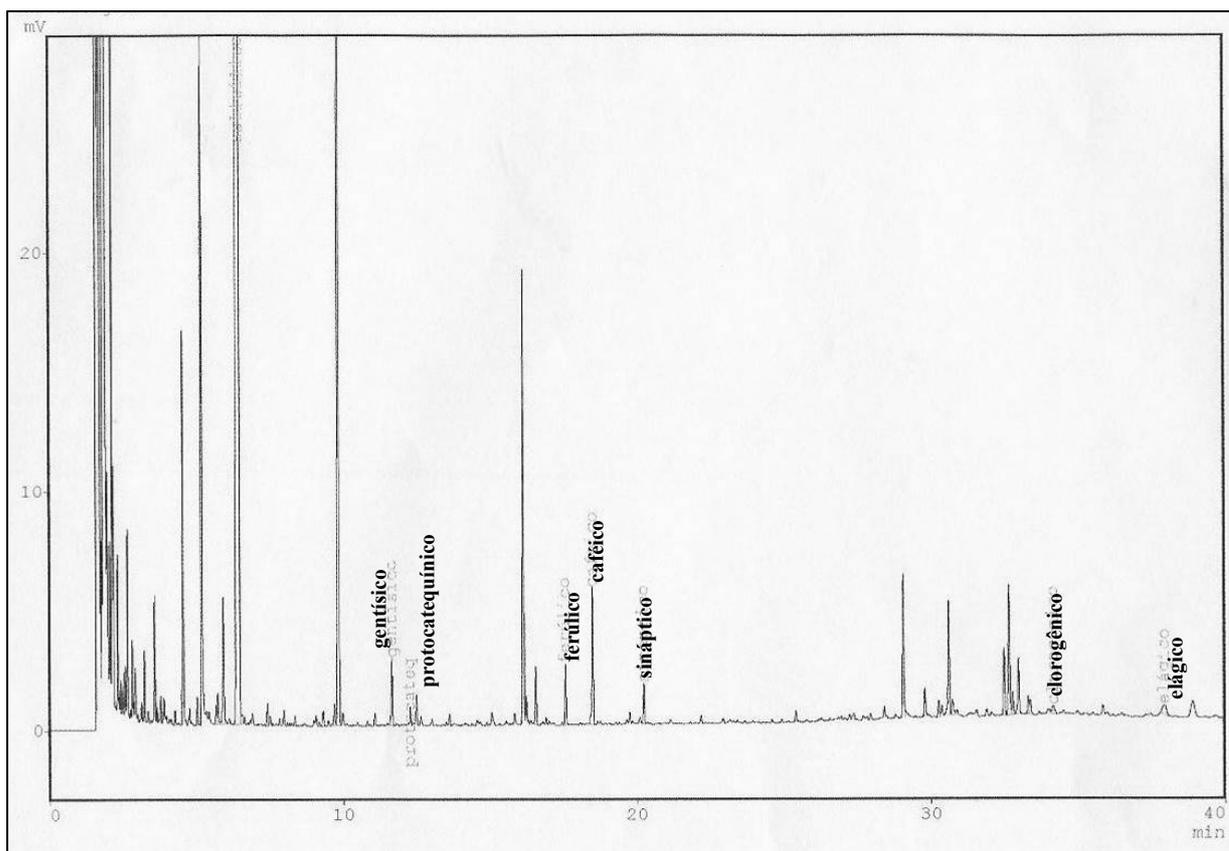


Figura 4. Ácidos fenólicos na fração solúvel (AFES) do pó orgânico de café.

Todavia, sua atividade antioxidante foi menor do que as outras frações (926,68 μM Trolox/ g). Estes resultados sugerem que a avaliação da atividade antioxidante de cada composto individualmente é necessária para assegurar a real contribuição de cada um para a capacidade sequestradora de radicais total do pó orgânico de café.

4. Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o extrato etéreo do pó orgânico de café apresentou atividade antioxidante significativa, a qual aumentou com o conteúdo de fenólicos totais dos extratos e das frações de ácidos fenólicos. Entre os ácidos fenólicos identificados nas frações do pó orgânico, o ácido salicílico foi predominante, embora sua presença não pareça ser determinante para a capacidade antioxidante deste resíduo.

Apesar do conhecimento da potencial atividade antioxidante dos fenólicos nos alimentos, o estudo das suas ações *in vivo* é muito importante.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

Referências

- Azuma, K.; Ippoushi, K.; Nakayama, M.; Ito, H.; Higashio, H.; Terao, J. (2000) Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5496-5500.
- Budini, R.; Tonelli, D.; Girotti, S. (1980) Analysis of total phenols using the Prussian blue method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 1236-1238.
- Castillo, M. D.; Ames, J. M.; Gordon, M. (2002) Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3698-3703.
- Chanwitheesuk, A.; Teerawutgulrag, A.; Rakariyatham, N. (2005) Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand, *Food Chemistry*, 92, 491-497.
- Dabrowski, K. J.; Sosulski, F. (1984) Quantification of free and hydrolyzable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 123-127.
- Gross, G.; Jaceaud, E.; Huggett, A. C. (1997) Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kalweol in coffee brews. *Food Chem. Toxicol.*, 35, 547-554.
- Krygier, K.; Sosulski, F.; Hohhe, L. (1982) Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 334-336.
- Ky, C. L.; Louarn, J.; Dussent, S.; Guyot, B.; Hamon, S.; Noiro, M. (2001) Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild coffee arabica L.; C. canephora P. accessions, *Food Chem.*, 75, 223-230.
- Lajolo, F.; Saura-Calixto, F.; Penna, E.; Wenzel, E. (2001) Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud editorial. Varela, São Paulo, Brasil.

-
- Martin, M. J.; Pablos, F.; Gonzalez, A. G. (1998) Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition, *Talanta*, 46, 1259-1264.
- Miliauskas, G.; Venskutonis, P. R.; Van Beek, T. A. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food Chemistry*, 85, 231-237.
- Moreira, A. V. B.; Mancini Filho, J. (2003) Atividade Antioxidante das Especiarias Mostarda, Canela e Erva-doce em Sistemas Aquoso e Lipídico, *Nutrire - Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.*, 25, 31-46.
- Moure, A.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Dominguez, J. M.; Sineiro, J.; Dominguez, H. (2001) Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*, 72, 145-17.
- Natella, F.; Nardini, M.; Gianetti, I.; Dattilo, C.; Scaccini, C. (2002) Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6211-6216.
- Olthof, M.; Zock, P.; Katn, M. (2001) Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or for black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 532-538.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourization assay, *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
- Rice-Evans, C. A. (2001) Flavonoid antioxidants, *Curr. Med. Chem.*, 8, 797-807.
- Sánchez-González, I.; Jiménez-Escrig, A.; Saura-Calixto, F. (2005) In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter), *Food Chemistry*, 90, 1-2, 133-139.
- Schieber, A.; Stintzing, F.C.; Carle, R. (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments, *Trends in Food Science and Technology*, 12, 401-413.
- Soares, S. E. (2002) Ácidos fenólicos como antioxidantes, *Rev. Nutr.*, 15, 71-81.

Sotero, D. E. G. Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante de frutos da Amazônia: chope (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e macambo (*Theobroma bicolor*) (2002) São Paulo: USP.

Sroka, Z.; Cisowski, W. (2003) Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and antiradical activity of some phenolic acids, *Food and Chemical Toxicology*, 41, 753-758.

Tamura, H.; Shibamoto, T. (1991) Antioxidative activity measurement and 4-hydroxy noneal. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 68, 941-943.

Yen, W.; Wang, B.; Chang, L.; Duh, P. (2005) Antioxidant properties of roasted coffee residues, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2658-2663.

http://www.santaclara.com.br/ocafe/cafê_beneficiamento.htm (2004).

<http://www.coffeeresearch.org> (2005).

CONCLUSÕES

Os extratos aquosos das cascas de café apresentaram elevada atividade antioxidante, que pode ser atribuída ao conteúdo de polifenóis presentes nestes resíduos; este resultado foi baseado na correlação linear encontrada entre estes parâmetros. O éter etílico foi o melhor agente extrator dos fenólicos presentes no pó orgânico de café.

O efeito sinergista foi observado apenas entre o extrato aquoso da casca da cooperativa Cooxupé e o antioxidante sintético BHT a 200 ppm. A substituição dos antioxidantes sintéticos pode ser interessante, devido às implicações na saúde e na funcionalidade nos sistemas alimentícios promovidas pelos compostos naturais.

Foi verificada a predominância do ácido salicílico em valores superiores a 90% em todas as frações dos ácidos fenólicos do pó orgânico de café. A atividade antioxidante encontrada nos extratos e frações do pó orgânico de café não é decorrente da alta concentração de ácido salicílico, mas provavelmente de outros ácidos com comprovado poder antiradical, como os ácidos clorogênico, caféico, ferúlico e *p*-cumárico.

Considerando-se que o Brasil é o maior produtor de café do mundo, e que seus resíduos não possuem aplicações definidas, estes produtos se tornam altamente interessantes como fontes de compostos fenólicos. Mais estudos são necessários para identificar e quantificar os polifenóis nas cascas e no pó orgânico de café, bem como para testar sua atividade antioxidante em sistemas biológicos. Igualmente, a investigação da contribuição de cada composto individualmente para a atividade antioxidante se torna necessária.