Universidade Estadual de Londrina

Centro de Ciências Agrárias

Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos

EFEITO DA MATÉRIA-PRIMA E DO PROCESSAMENTO NOS COMPOSTOS BIOATIVOS E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CAFÉ

JOSIANE ALESSANDRA VIGNOLI

Londrina-PR

2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Centro de Ciências Agrárias
Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos

EFEITO DA MATÉRIA-PRIMA E DO PROCESSAMENTO NOS COMPOSTOS BIOATIVOS E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CAFÉ

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Doutoranda: Josiane Alessandra Vignoli
Orientadora: Prof. Dra. Marta de Toledo Benassi

Londrina
2009

VIGNOLI, Josiane Alessandra
Efeito da matéria-prima e do processamento nos compostos bioativos e na atividade antioxidante do café / Josiane Alessandra Vignoli. - Londrina, PR : [s.n], 2009.
129f.

Orientadora: Dra. Marta de Toledo Benassi.
TESE (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina.

1. 5-Caffeoylquinic Acid, Caffeine, *Coffea arabica, Coffea canephora*, Melanoidins. I. Benassi, Marta de Toledo. II. Universidade Estadual de Londrina.

JOSIANE ALESSANDRA VIGNOLI

EFEITO DA MATÉRIA-PRIMA E DO PROCESSAMENTO NOS COMPOSTOS BIOATIVOS E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CAFÉ

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____
Profa. Dra. Marta de Toledo Benassi
(DCTA/CCA/UEL)

_____
Prof. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória
Farmácia/ Depto. Alimentos/ UFMG

_____
Prof. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante
DCA / FEA / UNICAMP

_____
Prof. Dra. Andréa Diniz
Farmácia / CCS / UEL

_____
Prof. Dr. Rui Sérgio dos Santos Ferreira da Silva
(DCTA/CCA/UEL)

Londrina, 12 de março de 2009.

DEDICATÓRIA

A meus pais, Antonio e Clita,

A meus avós, Roque e Nair (*in memorian)*,

A meus irmãos Leandro e Karina

A minha sobrinha Isabelli; os melhores presentes que já recebi.

A vocês dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof. Dra. Marta de Toledo Benassi, pela valiosa orientação, pela atenção, carinho e imensa compreensão que sempre me dedicou no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Denisley Gentil Bassoli, Diretor do setor de Pesquisa e Desenvolvimento da Café Iguaçu, pela oportunidade e confiança concedidas para realização de todo este trabalho, pelas preciosas sugestões, o meu imenso agradecimento.

À Cia Iguaçu de Café Solúvel por permitir a realização deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da Café Iguaçu, principalmente ao Baptistella e Lucas, por todo o trabalho e atenção dedicados durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela grandiosa e importante colaboração!

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da UEL, pela contribuição em minha formação.

A Prof. Dra. Rúbia Casagrande pela imensa colaboração nas técnicas analíticas, pelo apoio em todos os momentos e principalmente pela amizade.

A meus colegas de trabalho e amigos, Marcelo e Karina por toda ajuda que sempre me dedicaram.

Aos Professores Rui Sérgio, Maria Beatriz, Adriana e Andréa por aceitarem gentilmente serem membros da banca deste trabalho.

Às minhas queridas amigas Rúbia, Jomara, M. Angélica, Cibele, Andrea, Maria e Renata pelos momentos de alegria e descontração compartilhados.

A meus pais e irmãos por todo apoio, admiração e carinho que sempre me dedicaram.

A Deus, por cuidar da minha vida.

“Se o seu navio não chega, nade até ele”.

(Jonathan Winters)

VIGNOLI, Josiane Alessandra. **Efeito da matéria-prima e do processamento nos compostos bioativos e na atividade antioxidante do café.** 2009. 129f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

O consumo de café registrou um crescimento significativo nos últimos anos. As duas espécies mais comercializadas são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, sendo a primeira de maior valor comercial e qualidade sensorial. Atualmente, vários estudos sugerem efeitos potencialmente benéficos na saúde devido ao consumo da bebida, como a eficiência e proteção contra alguns tipos de câncer, doenças do fígado e danos aos tecidos induzidos por radiação. O café contém vários componentes bioativos que podem explicar esse efeito positivo, destacando-se os antioxidantes. Desta maneira, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante (AA) do café arábica e robusta e sua composição química, sob influência de diferentes condições de processamento, como grau de torra e processo de extração e método de preparo da bebida final, correlacionando a AA com os compostos identificados. A AA foi avaliada pelos métodos FRAP, ABTS, deoxirribose, DPPH e determinação de fenólicos totais (Folin- Ciocalteau). A composição química foi determinada por CLAE e CG/MS. Os compostos que mais se destacaram pelo potencial antioxidante foram o ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ), melanoidinas, cafeína, maltol e guaiacóis, mas a capacidade de cada um foi variável nos diferentes métodos empregados. O processo de torra provocou uma degradação de compostos fenólicos, mas esse fato foi compensado pela formação de melanoidinas, o que manteve o equilíbrio da AA do produto. Entretanto, quando condições de torra mais severas foram aplicadas, a formação de novos potenciais antioxidantes não foi o suficiente para compensar a degradação, provocando uma diminuição da AA de produtos de cor escura. A maior presença de cafeína no café robusta conferiu a seus produtos maior AA. O processo de extração utilizado para café solúvel influenciou a composição química do produto, principalmente para amostras de cor clara, onde se observou uma maior preservação de 5-ACQ e extração de cafeína no processo utilizando duas correntes de água. Diferentes métodos de preparo da bebida levaram a uma diferenciação na composição química e AA. Bebidas de filtro e espresso mostraram-se semelhantes quanto à composição e AA. A maior extração de sólidos da bebida espresso favoreceu a maior AA observada na maioria dos métodos. No entanto, todas as bebidas originadas do café torrado (filtro, espresso e solúvel) apresentaram uma expressiva AA que foi atribuída principalmente à cafeína, 5-ACQ e melanoidinas.

Palavras-chave: ácido 5- cafeoilquínico, cafeína, *Coffea arabica, Coffea canephora*, melanoidinas.

VIGNOLI, Josiane Alessandra. Effect of the raw material and process on bioactive compounds and antioxidant activity of coffee. 2009. 129 f. TESE (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ABSTRACT

The consumption of coffee registered a significant growth in the recent years. The species mostly commercialized are *Coffea Arabica* and *Coffea Canephora*. Coffee arabica is the quality of highest commercial value and better sensorial quality**.** Currently, several studies considering the effects of coffee on health suggest potentially beneficial effects of this beverage consumption, such as efficiency and protection against some types of cancer, liver diseases and damage to tissues caused by radiation. Coffee contains several bioactive components that may explain this positive effect, especially the antioxidants. Hence, the aim of this study was to evaluate the antioxidant activity (AA) of arabica and robusta coffees and its chemical composition, under the influence of different processing conditions, such as roasting degree, extraction process and method of preparing the final beverage, correlating the AA with the identified compounds. AA was evaluated by the methods FRAP, ABTS, deoxyribose, DPPH and determination of phenolic compounds (Folin-Ciocalteau). The chemical composition was determined by HPLC and GC / MS. The potential antioxidant was highlighted on the following compounds: 5-caffeoylquinic acid (5-CQA), melanoidins, caffeine, maltol and guayacol, however the ability of each compound has varied depending on the employed method. The roasting process caused a degradation of phenolic compounds, although this fact has been compensated by the formation of melanoidins, maintaining the balance of AA on the product. However, when stricter roasting conditions have been applied, the formation of new potential antioxidants was not enough to compensate the degradation, causing a decrease of AA on the dark roast qualities. Caffeine levels are higher in robusta beans and this has increased its AA. The extraction process used influenced the chemical composition of the product, especially for light roast samples. On these samples, a greater preservation of 5-CQA and extraction of higher caffeine levels were observed on the process using two streams of water. Different methods of preparation of the drink resulted on a differentiation in the chemical composition and AA. Filter beverages and espresso drinks presented to be similar in composition and AA. The higher extraction of solids on espresso drinks has favored the highest AA observed in most of the methods. Although, all drinks originated from roasted and ground coffee (filter, espresso and soluble (instant coffee) have shown a significant AA which was mainly attributed to the caffeine, 5-CQA and melanoidins.

Keywords: 5- Caffeoylquinic Acid, caffeine, *Coffea arabica, Coffea canephora*, melanoidins.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Esquema representativo da produção de café solúvel 24
Figura 2. Estrutura química dos principais compostos fenólicos do café 30
Figura 3. Estrutura química da cafeína 31

CAPÍTULO II

Figura 1. Perfil cromatográfico dos compostos de interesse na matriz de café solúvel..... 58

CAPÍTULO III

Figura 1. Teores de cafeína, trigonelina, furfural, hidroximetilfurfural, 5-ACQ e melanoidinas nas espécies arábica e robusta ao longo do processo de torra..... 70
Figura 2. Atividade antioxidante, avaliada pelos métodos de Folin, ABTS e FRAP em café arábica e robusta ao longo da torra.....73
Figura 3. Análise de componentes principais a partir da atividade antioxidante e compostos químicos: projeção das variáveis (A) e gráfico de amostras (B).....74

CAPÍTULO IV

Figura 1. Análise de componentes principais a partir da atividade antioxidante e composição: projeção das variáveis (A) e gráfico de amostras (B). Espécies: arábica (A).....89

CAPÍTULO V

Figura 1. Estrutura química dos principais compostos do café relacionados à atividade antioxidante..... 99

CAPÍTULO VI

Figura 1: Cromatogramas típicos das bebidas por análise em GC-MS identificando os picos de interesse: 119

Figura 2. Cromatogramas típicos das bebidas na análise por CLAE, identificando os picos de interesse nas bebidas de Filtro, Espresso e Solúvel. 120

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Composição química do café solúvel com diferentes cores de torra para produtos 100% arábica e 100% robusta.....26

CAPÍTULO II

Tabela 1. Concentrações de café solúvel e torrado utilizadas na validação de diferentes metodologias.....53

Tabela 2. Avaliação da precisão inter-dias em diferentes métodos para o café torrado e solúvel.....56

Tabela 3. Parâmetros da regressão linear das curvas de calibração dos compostos bioativos.....59

Tabela 4. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e teores dos diferentes compostos encontrados no café torrado e solúvel.....60

CAPÍTULO III

Tabela 1. Valores correspondentes de cores IR em luminosidade (L*) e tonalidade cromática (H*) para cafés torrados e moídos das espécies arábica e robusta.....66

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Valores de capacidade antioxidante do café solúvel avaliados por diferentes métodos, para as diferentes condições de processo e espécies.....88

Tabela 2. Teores de 5-ACQ, cafeína e melanoidinas do café solúvel para as diferentes condições de processo e espécies.....89

CAPÍTULO V

Tabela 1. AA de compostos puros e café solúvel avaliada pelos diferentes métodos.....104

CAPÍTULO VI

Tabela 1. Teores dos compostos bioativos nas bebidas e na fração volátil.....121

Tabela 2. Atividade antioxidante das bebidas solúvel, de filtro e espresso avaliadas por diferentes métodos.....123

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18

2. OBJETIVOS 21

2.1. Objetivo Geral 21

2.2. Objetivos Específicos 21

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CAFÉ: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PROCESSAMENTO 22

2. COMPOSTOS PRESENTES NO CAFÉ ASSOCIADOS COM A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE 26

2.1. Compostos Fenólicos 26

2.2. Cafeína 30

2.3. Melanoidinas 32

2.4. Outros Compostos do Café Associados à Atividade Antioxidante 34

3. RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES 35

4. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE 37

5. REFERÊNCIAS 41

CAPÍTULO II - PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DE CAFÉ TORRADO E SOLÚVEL

RESUMO 47

1. INTRODUÇÃO 48

2. MATERIAL E MÉTODOS 49

2.1. Material 49

2.2. Métodos.....50

2.2.1. Preparação das amostras.....50

2.2.2. Caracterização da atividade antioxidante.....50

2.2.3. Validação das metodologias.....52

2.2.4. Avaliação Cromatográfica.....54

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....55

3.1. Avaliação dos métodos de determinação da atividade antioxidante.....55

3.2. Avaliação do Método Cromatográfico.....58

4. CONCLUSÃO.....60

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....60

CAPÍTULO III- COMPORTAMENTO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES NO PROCESSO DE TORRA DE CAFÉ ARÁBICA E ROBUSTA

RESUMO 63

1. INTRODUÇÃO.....64

2. MATERIAL E MÉTODOS.....65

2.1. Material 65

2.2. Métodos 67

2.2.1. Avaliação da Atividade Antioxidante.....67

2.2.2. Determinação de 5-ACQ, cafeína, trigonelina, furfural e HMF.....68

2.2.3. Determinação de melanoidinas.....68

2.2.4. Análise Estatística.....69

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....69

3.1. Composição química das amostras de arábica e robusta durante o processo de torra.....69

3.2. Avaliação da Atividade Antioxidante.....72

4. CONCLUSÃO.....76

5. REFERÊNCIAS.....77

CAPÍTULO IV - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, POLIFENÓIS, CAFEÍNA E MELANOIDINAS DE CAFÉ SOLÚVEL: INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE PROCESSAMENTO E MATÉRIA- PRIMA

RESUMO.....81

1. INTRODUÇÃO.....82

2. MATERIAL E MÉTODOS.....83

2.1. Material 83

2.2. Métodos 85

2.2.1. Metodologias de Determinação da Atividade Antioxidante.....85

2.2.2. Determinação dos Compostos Boativos do Café Solúvel.....87

2.2.3. Análise Estatística.....87

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....88

4. CONCLUSÃO.....93

5. REFERÊNCIAS.....94

CAPÍTULO V - INVESTIGAÇÃO E AVALIAÇÃO DE CONSTITUINTES DO CAFÉ COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

RESUMO 97

1. INTRODUÇÃO.....98

2. MATERIAL E MÉTODOS.....100

2.1. Material.....100

2.2. Métodos 101

2.2.1. Medida da Atividade Antioxidante.....101

2.2.2. Análise Estatística.....103

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....103

4. CONCLUSÃO.....108

5. REFERÊNCIAS.....109

CAPÍTULO VI - INFLUÊNCIA DO PREPARO DA BEBIDA NA EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS E NA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CAFÉ ARÁBICA

RESUMO.....112

1. INTRODUÇÃO.....113

2. MATERIAL E MÉTODOS.....114

2.1. Material.....114

2.1.1. Material e Preparo das amostras.....114

2.1.2. Reagentes e equipamentos.....115

2.2. Métodos.....116

2.2.1. Avaliação da Atividade Antioxidante.....116

2.2.2. Determinação de melanoidinas.....117

2.2.3. Determinação de 5-ACQ, cafeína, furfural e hidroximetilfurfural por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....117

2.2.4. Determinação dos compostos voláteis por cromatografia gasosa (CG).....118

2.2.5. Análise Estatística.....118

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....118

3.1. Composição química e Atividade Antioxidante.....119

4. CONCLUSÃO.....126

5. REFERÊNCIAS.....126

CONCLUSÃO GERAL.....129

1. INTRODUÇÃO

O café é a segunda mercadoria mais importante para a economia mundial depois do petróleo (BORRELI et al., 2002). Setenta e cinco por cento das bebidas tipo *soft drink* consumidas regularmente no mundo são café; sendo que os tipos de bebidas e a modalidade de consumo são fortemente associados com os hábitos sociais e culturas dos diferentes países (LÓPEZ-GALILEA, DE PENA, CID, 2007). Uma pesquisa mostra que 9 em cada 10 brasileiros acima de 15 anos consomem café diariamente, o que faz deste a segunda bebida com maior penetração na população, atrás apenas da água e à frente dos refrigerantes e do leite (ABIC, 2008). Segundo dados da Secretaria de Produção e Agroenergia do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), em 2008, o Brasil, entre os países produtores fechou como maior consumidor, representando 53% de todo o consumo de países produtores, seguido pelo México (7%), Indonésia (6%) e Etiópia (5%) (MAPA, 2008).

No Brasil, o consumo per capita para o ano de 2008 foi de 5,64 kg de café em grão cru ou 4,51 kg de café torrado, quase 74 litros para cada brasileiro por ano, registrando uma evolução de 2,1% em relação ao período anterior. Este resultado iguala o consumo por habitante/ano do Brasil ao da Itália (5,63 kg/hab.ano), supera o da França (5,07 kg/hab.ano) ficando pouco abaixo da Alemanha (5,86 kg/hab.ano). Os campeões de consumo, entretanto, ainda são os paises nórdicos - Finlândia, Noruega, Dinamarca - que consomem cerca de 13 kg/hab.ano. Por outro lado, considerando o café já torrado e moído, o consumo per capita de 4,51 kg/hab.ano aproxima-se do consumo histórico de 1965, que foi de 4,72 kg/hab.ano (ABIC, 2008).

O café pertence ao gênero *Coffea* e, de dezenas de espécies, somente duas têm importância econômica no mercado mundial: arábica *(Coffea arabica)* e robusta *(Coffea canephora)*. O café arábica é mais valorizado economicamente devido ao seu aroma e sabor. Ao longo dos séculos, diversas variedades foram plantadas em solo brasileiro. Atualmente as duas variedades de arábica mais cultivadas são Mundo Novo e Catuaí. O café robusta, apesar de menos valorizado economicamente, tem grande aceitação no mercado norte-americano e europeu. Isso se deve principalmente ao fato de ser utilizado na fabricação de café solúvel, por possuir maior teor de substâncias solúveis, açúcares e cafeína, em comparação ao café arábica. (COFFEE BREAK, 2006).

Nos últimos anos, devido a um grande interesse em alimentos que promovam funções fisiológicas, a relação entre café e saúde tem sido extensivamente estudada. A bebida do café vem se destacando entre outras pelo seu potencial antioxidante, além de seu sabor e

aroma agradáveis. É conhecido que grãos de café verde, café torrado e a bebida do café contêm compostos que exercem atividade antioxidante (PARRAS et al., 2007). A presença de grande quantidade de ácidos clorogênicos no café contribui significativamente para sua atividade antioxidante. Apesar do decréscimo destes polifenóis no processo de torra, recentemente têm sido mostrado que ácido quínico e caféico, componentes dos ácidos clorogênicos, são quimicamente incorporados às melonoidinas durante este processo (BEKEDAM et al., 2008 a), além da potencial atividade antioxidante já demonstrada para cafeína (SHI; DALAL, 1991).

Diferentes métodos são utilizados para caracterizar a capacidade antioxidante de alimentos. Entretanto, não há nenhum método universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisamente e quantitativamente (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). A capacidade antioxidante da bebida do café já foi estudada pelos ensaios de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (SÁNCHEZ – GONZÁLEZ; JIMÉNEZ-ESCRIB; SAURA-CALIXTO, 2005), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) e DMPD (N, N-dimethil-p-phenylenediamine) (SÁNCHEZ – GONZÁLEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; SAURA-CALIXTO; BORRELI et al., 2002), deoxirribose (DAGLIA et al.,2004), DPPH (2,2 Difenil-1- picrilhidrazil) (BORRELI et al., 2002) e determinação de fenólicos totais (BORRELI et al., 2002). Muitos desses estudos referem-se ao café verde e torrado, porém muitas vezes não há um controle da matéria-prima e das condições de processo dificultando a comparação entre dados da literatura. Sobre os antioxidantes presentes no café solúvel, pouco é conhecido.

Desta maneira, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do processo de torra e extração na atividade antioxidante do café, e posteriormente a influência do método de preparo das bebidas, relacionando a atividade antioxidante avaliada por diferentes métodos, com os compostos bioativos presentes.

Dentro do contexto do trabalho, o capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica, abrangendo composição química e processamento do café; os compostos presentes possivelmente associados a AA; radicais livres e antioxidantes e métodos para avaliação da atividade antioxidante.

O capítulo 2 refere-se à adequação e precisão de diferentes técnicas de medida de atividade antioxidante para o café torrado e solúvel, assim como de uma técnica cromatográfica para determinação dos principais compostos potencialmente associados a AA dos produtos. As metodologias validadas nesse capítulo foram empregadas em todo o desenvolvimento do trabalho.

O capítulo 3 refere-se ao estudo de composição química e AA para café torrado e moído, descrevendo o comportamento dos principais compostos considerados como antioxidantes durante o processo de torra de cafés arábica e robusta, bem como a medida da atividade antioxidante dos produtos por diferentes metodologias e sua correlação com a composição.

No capítulo 4, um estudo similar foi feito com cafés solúveis. Foi avaliado o efeito das condições do processamento de café solúvel (torra e método de extração) bem como das matérias-primas (arábica e robusta), sobre a capacidade antioxidante do produto final, relacionando-se a AA medida por diferentes técnicas à composição química.

No capítulo 5, compostos naturalmente presentes no café ou formados no processamento (5-ACQ, cafeína, trigonelina, frações com diferentes PM incluindo melanoidinas, furfural, 5-HMF, maltol e guaiacol), selecionados com base na sua potencial contribuição para a AA, foram submetidos à determinação da AA por métodos associados a diferentes mecanismos de atuação (Folin-Ciocalteau, TEAC, FRAP, DPPH, e deoxirribose). Essa avaliação permitiu comparar o impacto dos diversos constituintes de café na atividade antioxidante.

No capítulo 6, para concluir o estudo, comparou-se bebidas produzidas a partir de café arábica. As mesmas amostras foram processadas para café torrado (bebida de torrado e espresso) e posteriormente extraídas e liofilizadas para produção de café solúvel (bebida de solúvel). Estudou-se a influência do preparo da bebida (filtrado, espresso e solúvel) na AA, relacionando-a a composição química das bebidas e dos voláteis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar o efeito das condições do processamento do café (torra e método de extração); do método de preparo de bebida, bem como das matérias-primas (espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*), na composição química e capacidade antioxidante do produto final, relacionando-se a AA medida por diferentes técnicas à composição química.

2.2. Objetivos Específicos

- Adequar e validar as metodologias ABTS, DPPH, Deoxirribose, FRAP e Fenólicos Totais e cromatográfica (compostos bioativos) para aplicação em café torrado e solúvel;
- Determinar os teores de cafeína, ácidos clorogênicos, trigonelina, furfural, 5-hidroximetilfurfural e melanoidinas presentes nos diferentes produtos;
- Avaliar a atividade antioxidante presente em café torrado e café solúvel através dos ensaios ABTS, DPPH, Deoxirribose, FRAP e Fenólicos Totais (Folin- Ciocalteau);
- Verificar a influência da matéria-prima na atividade antioxidante dos produtos;
- Determinar a influência das condições de torra na atividade antioxidante dos produtos;
- Determinar a influência de diferentes processos de extração na capacidade antioxidante do produto solúvel;
- Estabelecer uma correlação entre os diferentes compostos e as metodologias de avaliação da atividade antioxidante;
- Avaliar a atividade antioxidante de compostos isolados, que fazem parte da composição do café;
- Verificar a influência do procedimento de preparo das bebidas espresso, de filtro e solúvel na sua atividade antioxidante e na extração dos compostos bioativos.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. CAFÉ: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PROCESSAMENTO

A composição química do café verde depende da espécie e da variedade em questão, além de outros fatores como solo, clima, regime de chuvas, altitude do terreno, práticas da agricultura, grau de maturação e condições de armazenamento (COFFEE BREAK, 2009).

Dentre os açúcares presentes manose representa 44%, galactose 23%, arabinose 12%, glicose 15%, ramnose 1% e xilose 2%. Sendo assim, 80% dos carboidratos do café verde estão presentes como galactomananos e arabinogalactanos. Os galactomananos consistem em uma cadeia principal de manose unidas por ligações glicosídicas 1→ 4 e ramificadas com unidades de galactose no C-6, com variado grau de ramificação, enquanto que os arabinogalactanos consistem em uma cadeia principal de galactoses unidas por ligações 1 → 3 e ramificadas no C-6 com cadeias laterais contendo resíduos de arabinose e/ou galactose (NUNES et al., 2006).

O café verde também apresenta considerável teor de lipídios, principalmente no endosperma, cujos teores ficam por volta de 11,4% no café arábica e de 6,1% no café robusta (LAGO, 2001). Proteínas também são encontradas em grande proporção sendo que grãos verdes podem apresentar teores de 11 a 13% e torrados de 13 a 15% (CLIFFORD, 1975).

Dentre os compostos nitrogenados do café verde encontram-se, além das proteínas, trigonelina e cafeína. A trigonelina, uma N-metil-betaína, importante para o sabor e aroma do café é encontrada no grão verde em quantidades de 0,8% no café arábica e 0,7% em café robusta. A cafeína representa cerca de 2,2% da matéria seca no café robusta e 1,3% no café arábica (LELOUP, 2006).

O processo de fabricação do café, utilizado para o preparo da bebida, da matéria-prima até o produto final, inclui os procedimentos de torra e moagem, para as bebidas preparadas a partir do grão torrado e ainda extração, secagem do extrato (atomização ou liofilização) e embalagem do pó para o mercado, para a bebida do café solúvel.

As características aromáticas e de cor do produto são exclusivamente formadas durante a torra. O café verde é usualmente torrado a uma temperatura final de 200- 250°C

dentro de um tempo determinado que pode chegar até 20 minutos (WEIJAN WU, 1994). A composição do café torrado é altamente dependente do processo e do grau de torra.

Durante a torra muitas reações complexas ocorrem, incluindo interação e condensação entre grupos amino e carbonil (reação de Maillard), destruição e caramelização de açúcares e hidrólise/despolimerização de proteínas e polissacarídeos. As características de aroma e sabor de diferentes produtos são formadas por estes processos complexos.

Os carboidratos são os componentes mais afetados pelo processo de torra, que induz mudanças na quantidade e estrutura dos componentes em relação ao café verde (NUNES; COIMBRA, 2001). Dependendo da estabilidade ao calor dos diferentes polissacarídeos eles serão decompostos mais ou menos fortemente (LELOUP; LIARDON, 1993). Durante a torra, mono e oligossacarídeos são novamente formados através da hidrólise de polissacarídeos. Por outro lado, em maior extensão, eles também reagem com aminoácidos livres ou peptídeos formando complexos de melanoidinas. A diminuição no teor de carboidratos deve-se à conversão de parte dos açúcares a produtos de reações de Maillard e reações de pirólise (LELOUP; LIARDON, 1993).

A cafeína é relativamente resistente às temperaturas utilizadas na torra. Na substância pura, perdas pequenas de cafeína podem ocorrer por sublimação a 178°C. Como o processo é realizado a temperaturas em torno de 200-230°C, uma perda considerável deveria ser observada durante o processamento, mas isso não ocorre. Os dois fatores que mais contribuem para a estabilidade são provavelmente, um aumento no ponto de sublimação da cafeína, como resultado de pressões internas mais elevadas geradas dentro do grão e uma baixa taxa de difusão do vapor através das camadas externas do grão (TRUGO, MOREIRA, DE MARIA, 2000).

A trigonelina é sensível a altas temperaturas e o grau de degradação térmica varia conforme as condições de torra do café. Somente 15% da trigonelina inicial permanece após o processo de torra a 230°C por 15 minutos. A 180°C foi observada pequena perda após 15 minutos (2%), chegando a 60% com o aumento do tempo de torra para 45 minutos. A degradação da trigonelina gera compostos não voláteis e voláteis, sendo um deles o ácido nicotínico (TRUGO, MOREIRA, DE MARIA, 1999).

Ácidos clorogênicos também são degradados durante a torra. Em estudo sobre o efeito da temperatura, Trugo, Moreira e De Maria (1999) observaram perdas em torno de 60%, após torra a 205°C por 7 minutos. Um aumento na perda ocorreu em condições mais severas. Aproximadamente metade do conteúdo total de ácidos clorogênicos perdidos na torra pôde ser encontrada na fração de pigmentos, na forma de ácido quínico livre e como

compostos fenólicos de baixo peso molecular. Parte dos produtos de degradação foi perdida por volatilização, e uma grande parte permaneceu sem caracterização.

Lipídios presentes no café verde, principalmente no endosperma, aumentam proporcionalmente após a torra, devido à degradação de carboidratos. No café arábica o aumento relatado foi de 11,4% para 15,4% e, no robusta, de 6,1% para 9,6% (LAGO, 2001).

Em teores de aproximadamente 13% no grão cru, as proteínas dão contribuições marcantes ao sabor do café através dos produtos de sua decomposição nas reações de pirólise durante a torra. Na torra ocorre hidrólise das ligações peptídicas das moléculas protéicas, com liberação de carbonilas e aminas; os aminoácidos reagem com carboidratos e polimerizam formando produtos caramelizados escuros (melanoidinas). Há também produção de aminas responsáveis pelo odor de peixe e de amoníaco dos cafés excessivamente torrados. Nenhum aminoácido permanece livre após a torra por 5 minutos em 220° C. Uma outra contribuição importante para as características do café, ligada a substâncias protéicas, deve-se ao fato de as partículas insolúveis de proteínas se ligarem a substâncias graxas formando no café coado partículas coloidais responsáveis pela turbidez da bebida (CARVALHO et al., 1997).

O produto solúvel passará ainda por etapas adicionais de processamento. O café solúvel é o produto da extração dos grãos torrados e moídos. Os grãos são submetidos à extração sob pressão em altas temperaturas (180°C) o que promove, na verdade, um enriquecimento de sólidos solúveis em relação à matéria-prima. O extrato é então desidratado em vaporizadores ou liofilizadores originando o café solúvel em pó ou granulado.

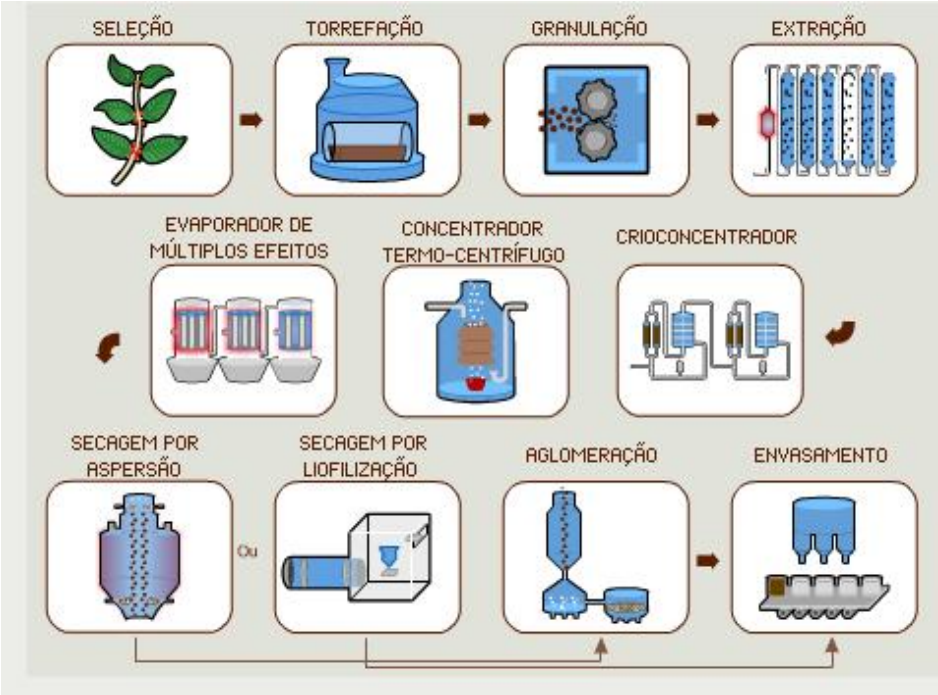


Figura 1. Esquema representativo do processo de produção de café solúvel.

A composição desse material solúvel dependerá, além das condições do processamento, das espécies e variedades utilizadas nos "blends" (NOGUEIRA; TRUGO, 2003), fatores que também afetarão a capacidade antioxidante. A Figura 1 apresenta o esquema de produção do café solúvel.

Este processo é usualmente realizado numa bateria de percoladores resultando em 45 a 50% de rendimento de sólidos solúveis. O alto rendimento de extração é devido principalmente à alta temperatura, superior a 180°C, e ao uso do princípio contra-corrente. A água quente é primeiramente introduzida na primeira coluna contendo a maioria do café extraído e flui para o próximo percolador. No meio tempo, os sólidos solúveis do extrato aumentam, mas a temperatura cai devido à perda de calor, então a última coluna contendo café fresco é extraída a uma temperatura próxima a 100°C estando sujeito a danos mínimos. O extrato é concentrado através da evaporação a menor pressão e é seco por aspersão ou liofilização. Freqüentemente as partículas obtidas por aspersão são aglomeradas em grânulos maiores, tornando-se maiores, porosas, com melhores propriedades de reidratação (WEIJAN WU, 1994). O extrato concentrado é atomizado em forma de gotículas no topo de uma torre de secagem ao mesmo tempo em que é submetido a uma corrente de ar quente, provocando a evaporação da água. O produto coletado na base dessa torre é o café solúvel, que pode ser transformado em café aglomerado se submetido a uma etapa adicional de processamento Na secagem por liofilização o extrato é congelado a temperaturas inferiores a -30º C , sendo então triturado em moinhos especiais e conduzido à câmara de vácuo dentro de bandejas, onde a água é removida por sublimação. O produto final é o café liofilizado, que produz bebida de melhor qualidade pela preservação das características aromáticas. Com o processo de extração observam-se alterações na composição química do café como enriquecimento de cafeína, diminuição do teor de lipídeos, solubilização de melanoidinas (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química do café solúvel com diferentes cores de torra para produtos 100% arábica e 100% robusta.

	Arábica					Robusta				
Cor de torra	Verde	clara	→		Escuro	Verde	clara	→		Escuro
H_2O (%)	11,1	4,25	4,26	3,1	3,56	11,37	3,6	3,91	2,07	3,14
Cinzas (%)	3,86	8,06	7,91	7,99	7,77	4,36	7,37	7,21	7,43	7,67
Lipídios (%)	15,21	0,13	0,17	0,11	0,18	9,44	0,16	0,18	0,26	0,27
Nitrogênio Total (%)	2,32	2,94	2,89	2,84	2,9	2,78	3,44	3,37	3,32	3,43
Cafeína (%)	1,26	2,51	2,51	2,48	2,4	2,27	3,89	3,74	3,8	3,75
Trigonelina (%)	0,82	1,21	0,91	0,67	0,41	0,67	0,74	0,55	0,37	0,19
Aminoácidos Totais (%)	11,11	6,91	6,5	6,19	6,25	11,82	7,3	6,45	6,05	6,14
Aminoácidos Livres (%)	0,37	0,76	0,69	0,64	0,67	0,51	0,79	0,68	0,65	0,64
Melanoidinas (%)	2,2	23,2	24,2	25,1	27,5	3,8	25,2	28,3	28,6	31,5
Carboidratos totais (%)	49,90*	37,3	37	37,1	36,4	48,86*	36,4	35,6	35,1	34,3
Ácidos Orgânicos (%)	2,33	7,53	7,96	8,09	8,44	1,71	6,39	7,41	7,87	8,37
Ácidos clorogênicos (%)	8,13	5,21	3,79	2,56	1,77	9,93	4,8	3,14	1,62	1,35
Outros (não identificados %)	5,04	8,05	9,2	9,77	9,08	6,98	7,84	7,64	9,14	6,7

Fonte: Leloup, 2006.
* Carboidratos totais no café verde também incluem ácidos urônicos.

2. COMPOSTOS PRESENTES NO CAFÉ ASSOCIADOS COM A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante do café tem sido atribuída a diferentes compostos, dentre eles destacam-se os compostos fenólicos (como ácidos clorogênicos, caféico, ferúlico), a cafeína e as melanoidinas, bem como trigonelina e alguns voláteis.

2.1.Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas envolvidos na adaptação a condições de estresse ambiental. Normalmente, estão envolvidos na defesa contra radiação ultravioleta ou agressão por patógenos. Milhares de compostos fenólicos têm sido descritos em plantas alimentares e podem ser agrupados em diferentes classes de acordo com sua estrutura química básica (tais como tipo e número de anéis fenólicos), e em diferentes subclasses de acordo com substituições específicas na estrutura básica, associação com carboidratos e formas polimerizadas. Enquanto na polpa os taninos representam os principais compostos fenólicos, os ácidos clorogênicos e compostos relacionados são os principais componentes da fração fenólica dos grãos de café verde, alcançando teores de até 14% (em peso seco). Estes compostos apresentam propriedades benéficas à saúde, não só devido à sua

potente atividade antioxidante, mas também como agentes hepatoprotetores, hipoglicemiantes e antivirais (FARAH; DONANGELO, 2006).

Os ácidos clorogênicos são uma família de compostos de ésteres, formados principalmente pelo ácido quínico com certos ácidos cinâmicos como o caféico, o ferúlico ou o cumárico. A composição de ácidos clorogênicos do café é extremamente complexa com pelo menos cinco maiores grupos. Café verde contém os seguintes: três monoésteres de ácido caféico (ácidos cafeolquínicos, ACQ); três monoésteres do ácido ρ-cumárico (ácidos cumaroilquínicos, ACQ); três monoésteres do ácido ferúlico (ácidos feruloilquínicos, AFQ); três diésteres de ácido caféico (ácidos dicafeoilquínicos, diACQ), e seis diésteres de ácido caféico e ferúlico (ácidos dicafeoilferuloilquínicos, ACFQ). O representante majoritário do grupo ACG é o ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ), para qual muitas vezes se emprega o termo "clorogênico" (DE MARIA; MOREIRA, 2004).

Apesar da larga distribuição dos ácidos clorogênicos em plantas, o café verde é conhecido como o principal alimento fonte deste composto, com conteúdo sendo igual ou excedido apenas por folhas verdes de *Illex paraguayensis* (erva mate) (CLIFFORD, 1999). O conteúdo de ácido clorogênico total do grão de café verde pode variar de acordo com a espécie, grau de maturação e com menor importância pelas práticas agrícolas, clima e solo (FARAH et al., 2005).

Durante o processo de torrefação estes compostos fenólicos são intensamente degradados, originando pigmentos e componentes voláteis do aroma, como fenol e vinilguaiacol (MOREIRA, TRUGO, DE MARIA, 2000). Para um grau de torra similar (perda matéria seca) o café robusta perde uma maior quantidade absoluta de ácidos clorogênicos produzindo uma maior quantidade de pequenos fenóis voláteis e guaiacol que contribuem para um aroma de fumaça menos atrativo (CLIFFORD, 1997). A destruição destes ácidos é progressiva com a torra com aproximadante 8 a 10% de perdas para cada 1% de perda de matéria seca (CLIFFORD, 1985).

Durante as últimas décadas, estudos *in vitro* e *in vivo* levaram os pesquisadores a atribuir diferentes funções farmacológicas aos ACG, tais como a ligação a centros opióides do cérebro, atividade inibitória sobre as integrases que participam na replicação do vírus HIV, indução da diminuição dos níveis sanguíneos de glicose, por meio da inibição da enzima glicose-6-fosfatase, efeito indutor na replicação e na mobilidade de macrófagos de camundongos, o que acarretaria um aumento da imunidade e característica anti-mutagênica (MONTEIRO; TRUGO, 2005).

Além disso, ácidos clorogênicos e caféico têm apresentado atividade antimicrobiana para alguns microrganismos específicos como já verificado por Almeida et al., 2006.

Compostos fenólicos têm recebido muita atenção devido ao seu potencial antioxidante, e sua contribuição para a AA do café foi avaliada por diversos estudos. Morishita e Kido (1995) relataram a potencial contribuição dos ácidos clorogênicos para atividade antioxidante do café pelo uso do sistema de seqüestro de radicais (DPPH) e peroxidação do ácido linoléico mediada pelo ânion superóxido. MOREIRA et al. (2005) encontraram forte correlação entre os ácidos clorogênicos, particularmente, os isômeros 3, 4 e 5-ACQ e a atividade redutora de ferro, avaliada pelo método FRAP.

Daglia et al. (2004) demonstraram que cafés verde e torrado das espécies *C. arabica* e *C. canephora* possuem atividade anti-radical hidroxílicos, que foi avaliada *in vitro* e em sistema celular biológico. Não houve diferença nos experimentos *in vitro*, mas nos ensaios biológicos foi observada uma maior proteção anti-radical livre nas amostras de café torrado *C. canephora.* Vários compostos presentes no café foram avaliados, sendo que, nos ensaios biológicos, o 5-ACQ destacou-se como o mais eficiente.

Sánchez-González, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005) encontraram uma alta correlação entre o conteúdo de polifenóis presente em bebidas preparadas por diferentes procedimentos (italiano, espresso e liofilizado) e a atividade seqüestradora de radicais ABTS (r= 0,99).

Gómez-Ruiz, Leake e Ames (2007) realizaram um estudo sobre o poder antioxidante, com padrões dos compostos fenólicos encontrados no café, contra os radicais $ABTS^{\cdot+}$ e peroxil, utilizando os métodos TEAC e ORAC, respectivamente. Considerando-se o método TEAC, ácido ferúlico foi o composto que apresentou maior atividade antioxidante. Ácido caféico e 5-cafeoilquínico (5-ACQ) mostraram atividade semelhante, porém inferior ao ferúlico. No método ORAC foi detectada a mais alta AA para ácido caféico, seguido por 5-ACQ e ferúlico levemente menores. Em ambos os métodos a AA dos padrões fenólicos foi maior que os padrões de cafeína e seus metabólitos.

Padrões de 5-ACQ e ácido caféico foram avaliados por Parras et al. (2007) como seqüestradores do radical lipoperoxil e causaram uma inibição na peroxidação em 45,1 e 18,1%, respectivamente. Apesar dos compostos isolados demonstrarem AA, esta foi inferior à AA apresentada pelas bebidas de café espresso, de filtro e italiano. Rice-Evans, Miller e Paganga (1996) também demonstraram um forte poder antioxidante para o ácido caféico em estudos realizados *in vitro.*

Múltiplas atividades biológicas para ácido caféico foram encontradas. Uma resistência aumentada frente a um determinado stress oxidativo foi observada em monócitos humanos linhagem U937. Este efeito foi atribuído ao poder de ácido caféico de incorporar-se às células sem qualquer influência citotóxica, para reduzir depleção de glutationa durante o stress oxidativo e inibir peroxidação lipídica (NARDINI et al., 1998).

Efeitos protetores de ácido caféico, baseados em sua atividade antioxidante foram demonstrados contra irradiação UV, especialmente UVA e UVB, em sistemas *in vitro* e *in vivo* (SAIJA et al., 1999, 2000). NERADIL et al. (2003), demonstraram que o ácido caféico possui efeito protetor também contra irradiação UVC. Este efeito é provavelmente baseado na atividade antioxidante e poder seqüestrador deste composto, o que pode reduzir os danos oxidativos do DNA e de membranas ricas em lipídios.

A estrutura química de compostos fenólicos (Figura 2) é que confere sua capacidade de atuar como seqüestradores de radicais livres. O tipo de composto, o grau de metoxilação e o número de hidroxilas são alguns dos parâmetros que determinam esta atividade antioxidante. Frente ao radical peroxil, por exemplo, pode ser inferido que um aumento no número de hidroxilas conduz a um aumento na atividade anti-radical livre (GÓMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007). Tem sido descrito que ligações duplas nas cadeias de ácidos hidroxicinâmicos, participam na estabilização do radical por ressonância (NATELLA et al., 1999).

O café é sem dúvida a fonte mais importante da dieta deste grupo de compostos fenólicos. A quantidade de ácido caféico, assim como clorogênico para atuar como antioxidante *in vivo*, dependerá da absorção de cada um deles pelo intestino. A literatura cita que humanos absorvem cerca de 33% do ácido clorogênico e 95% do ácido caféico ingeridos (OLTHOF et al., 2001). Depois da ingestão, ésteres de ácido caféico, liberam este ácido pela ação de esterases da microbiota intestinal. O ácido caféico livre é capaz de passar pela parede do intestino, sendo identificado no soro e urina de humanos (CREMIN et al., 2001). O conteúdo de ácido clorogênico de uma xícara de café de 200 mL tem sido registrado em torno de 70-350mg (CLIFFORD, 1999).

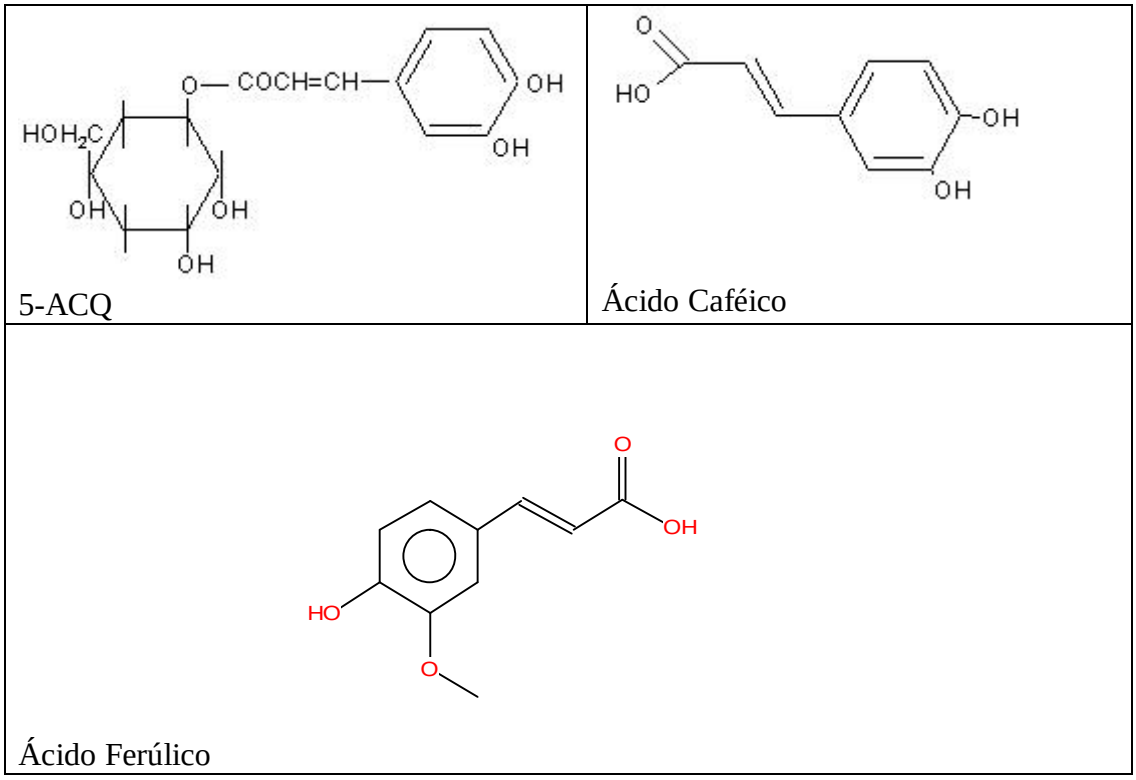


Figura 2. Estrutura química dos principais compostos fenólicos do café.

2.2. Cafeína

Cafeína (Figura 3) é um alcalóide pertencente ao grupo das metilxantinas Na natureza, é encontrada em mais de 60 espécies de plantas e suas principais fontes alimentares são o café, mate e guaraná. Ela é inodora e possui sabor amargo bastante característico, contribuindo com uma nota de amargor importante para o sabor e aroma da bebida do café (MONTEIRO; TRUGO, 2005).

Apesar da estabilidade térmica ao processo de torra, o teor de cafeína no café é dependente de uma série de fatores como a variedade da planta, método de cultivo, condições de crescimento, além de aspectos genéticos e sazonais. No caso da bebida, por exemplo, além da quantidade de pó, influenciam também o tipo do produto (torrado ou solúvel, descafeinado ou regular) e o processo utilizado no seu preparo (CAMARGO; TOLEDO, 1998). Para o café solúvel, Nogueira e Trugo (2003) relatam que a extração sob pressão em altas temperaturas promove um enriquecimento de sólidos solúveis em relação à matéria-prima do grão torrado, com conseqüente aumento no teor de cafeína. Considerando-se a espécie, cafeína representa cerca de 2,2% da matéria seca em café robusta e 1,3% em café arábica (LELOUP, 2006). Segundo Camargo e Toledo (1988); para cafés brasileiros o teor médio de cafeína encontrado

nas bebidas de filtro, espresso e solúvel, giram em torno de 0,6; 0,9 e 0,7mg/mL, respectivamente.

Após ingestão, a cafeína é rapidamente e quase completamente absorvida no estômago e intestino delgado, sendo distribuída a todos os tecidos incluindo o cérebro. O metabolismo da cafeína ocorre primariamente no fígado, com o processo de desmetilação que resulta na formação de 1,7 dimetilxantina (paraxantina). Paraxantina pode ser desmetilada para formar 1-metilxantina, que pode ser oxidada a ácido 1-metilúrico. Paraxantina pode também ser hidroxilada para formar ácido 1,7 dimetilúrico ou acetilada para formar 5-acetilamina-6-amino-3-metiluracil (CREWS; OLIVIER; WILSON, 2001).

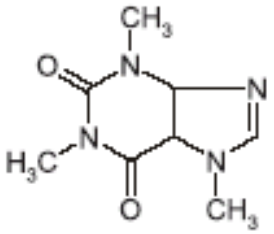


Figura 3. Estrutura química da cafeína.

Diversos efeitos são atribuídos à ingestão da cafeína, como a estimulação do sistema nervoso central, diminuição do sono e estimulação do músculo cardíaco (NEHLIG, 1999). Além destes, efeitos relacionados à sua atividade antioxidante têm sido estudados.

A cafeína é um eficiente seqüestrante de radicais hidroxílicos ($OH^{\cdot}$), o que sugere uma base para suas propriedades anticarcinogênicas (SHI; DALAL, 1991).

Lee (2000) estudou a habilidade de cafeína e seus metabólitos em reagir com espécies reativas de oxigênio e em inibir a peroxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade) em concentrações habituais no organismo após ingestão de café. Embora cafeína não tenha apresentado atividade nas concentrações estudadas, observou-se AA para 1-metilxantina (1-X) e ácido 1-metilúrico (1-U), seus principais metabólitos em humanos.

Gómez-Ruiz, Leake e Ames (2007) encontraram atividade antioxidante dos metabólitos de cafeína, 1-metilxantina e ácido 1, 3, 7- trimetilúrico, contra os radicais $ABTS^{\cdot +}$ e peroxílicos, e retardamento da oxidação do LDL pelo cobre, apesar de cafeína não ter demonstrado essa atividade.

López-Galilea, De Peña e Cid (2007), em estudo sobre a influência do preparo da bebida, relataram correlação entre teor de cafeína e a AA avaliada por DPPH (r:0,826) e, alta correlação com o potencial redox (r=-0,844) .

O mecanismo de ação antioxidante sugerido para metilxantinas, incluindo cafeína e alguns de seus derivados, deve-se à presença de um anel imidazol intacto e a existência de um doador de elétrons na posição C8 do grupo imidazol (Figura 3) (GÓMEZ-RUIZ; LEAKE ; AMES, 2007).

Segundo Higdon e Frei (2006), apesar de ser frequentemente assumido que uma xícara de café forneça em torno de 100 mg de cafeína, numa análise de 14 diferentes cafés de filtro comprados em cafeterias nos Estados Unidos encontrou-se uma variação no teor de 72 a 130 mg de cafeína por xícara de 240mL. Tem sido considerado ainda que existam benefícios à saúde no consumo moderado de café, equivalendo a 3-4 xícaras/dia, fornecendo 300-400mg/dia de cafeína (HIGDON; FREI, 2006).

2.3. Melanoidinas

Durante a torra, a baixa atividade de água e alta temperatura favorecem o desenvolvimento da reação de Maillard, com a formação de produtos de reação entre proteínas e carboidratos. É, também, provável que compostos fenólicos participem na reação, tornando-se parte dos polímeros marrons, solúveis em água, chamados melanoidinas do café (NUNES; COIMBRA, 2001).

Como a estrutura molecular das melanoidinas é pouco conhecida, estes compostos são genericamente definidos como complexos macromoleculares que são marrons e contém nitrogênio. A literatura relata que a composição das melanoidinas difere dependendo da composição dos alimentos e dos processamentos empregados. O conhecimento da estrutura das melanoidinas do café está ainda no seu início, e na verdade, nem a estrutura, nem a natureza e a quantidade de compostos fenólicos que estão incorporados no polímero foram esclarecidas (BORRELI et al., 2002).

Bekedam et al. (2008b), avaliando o efeito da torra na formação das melanoidinas do café, observaram que no início (do grão verde para uma cor clara) ocorre principalmente a formação de melanoidinas com um peso molecular (PM) intermediário. A torra prolongada conduz, predominantemente, à formação de melanoidinas com um alto PM (>12-14 KDa). Bekedam et al. (2008c) sugeriram que as arabinogalactanas são as principais envolvidas na formação da estrutura da melanoidina, além dos grupamentos fenólicos já identificados, e que a solubilidade da melanoidina em etanol aumenta com o número de grupamentos fenólicos. As melanoidinas de baixo PM (inferiores a 3,5KDa) apresentam características similares com as de alto PM, porém o principal açúcar presente é glicose, provavelmente oriunda da sacarose presente na estrutura da melanoidina e os fenólicos representam 47% do complexo

(BEKEDAM et al., 2008 d). Na tentativa de uma melhor elucidação da estrutura das melanoidinas bem como da contribuição para a atividade antioxidante do café torrado, Bekedam et al. (2008 a) investigaram a presença de ACG nestas moléculas, com a utilização de enzimas, e puderam observar a presença dos ácidos caféico e quínico após saponificação de frações de melanoidinas.

As melanoidinas são um dos mais importantes componentes da bebida do café torrado, contribuindo com aproximadamente 25% da matéria seca. Vários estudos sugerem que são responsáveis pela forte propriedade antioxidante e habilidade de quelar metais mostrada pela bebida (NICOLI et al. 1997; DAGLIA et al., 2004). Além disso, um estudo realizado por Cämmerer e Kroh (2006) onde uma reação entre açúcares e compostos amino foi facilitada, mostrou que os produtos gerados pela reação de Maillard apresentaram uma promissora atividade antioxidante.

Borreli et al. (2002) caracterizaram quimicamente frações de melanoidinas de café com cores de torra clara, média e escura e determinaram suas propriedades antioxidantes utilizando diferentes metodologias. A atividade antioxidante da bebida originária de torra clara, determinada pelo método $ABTS^{\cdot+}$, foi significantemente maior quando comparado com torras média e escura. Quando a bebida foi dividida em diferentes frações de acordo com seu peso molecular, a atividade antioxidante manteve-se em todas as frações, mas as frações contendo melanoidinas (de alto PM), bem como as frações de baixo PM, rica em compostos fenólicos foram as mais ativas. A atividade antioxidante das melanoidinas decresceu com o aumento da severidade da torra. Para caracterizar a atividade antioxidante das melanoidinas, a fração que continha uma alta concentração destas foi analisada por diferentes ensaios antioxidantes, $DMPD^{\cdot+}$, inibição da peroxidação de ácido linoléico e potencial redox. A capacidade de seqüestrar radicais $DMPD\cdot^{+}$ decresceu com o aumento da intensidade da torra em concordância com os ensaios para $ABTS^{\cdot+}$. Ao contrário, a habilidade das frações de alto peso molecular para prevenir a peroxidação de ácido linoléico aumentou com o aumento do grau de torra.

Sánchez-González, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005) estudando a atividade antioxidante em bebidas preparadas por diferentes procedimentos observaram que as amostras de torra escura exibiram maior ação antioxidante que amostras de torra média, e relacionaram esse efeito ao aumento dos produtos de reação de Maillard durante o processo.

Porém, ainda não foi completamente esclarecida a real contribuição de cada composto para a AA do café. Quando o produto torrado é avaliado quanto ao seu poder

antioxidante, é difícil atribuir qual é a participação relativa aos compostos fenólicos e quanto é devido aos antioxidantes formados pela reação de Maillard.

Faz-se necessário então, um método de detecção específico para antioxidantes não fenólicos do café. Bekedam et al. (2008 e), com o objetivo de elucidar esta questão, isolaram grupos de melanoidinas da bebida do café com 4 diferentes graus de torra e avaliaram sua propriedade antioxidante. Esta avaliação foi realizada com a utilização da técnica de espectroscopia de ressonância de spin utilizando o radical TEMPO (Tetrametil-1-piperidinil-oxi), que não é seqüestrado por ácidos clorogênicos. Desta maneira, puderam observam que realmente o processo de torra gera compostos com AA e que estes tiveram uma melhor eficiência quando provenientes de torras mais escuras. Comparou-se também a AA da porção fenólica avaliada utilizando como radical o sal de Fremy com a AA das melanoidinas contra o radical TEMPO. Assim, estes autores concluíram que apesar de compostos gerados na torra apresentarem poder antioxidante, este não é equivalente ao poder antioxidante dos compostos fenólicos que são dominantes na contribuição para a AA total da bebida. Todavia, o fato de não ocorrer alteração na AA com o aumento do grau de torra foi explicado pela manutenção da AA dos polifenóis mesmo incorporado na estrutura das melanoidinas com o processo de torra. Estes não estariam na forma livre mas provavelmente ligados a outras moléculas por ligações iônicas, éster ou éter (BEKEDAM et al., 2008 a).

Para avaliação da contribuição das melanoidinas como antioxidantes em alimentos e em humanos, Rufián-Henares e Morales (2007) simularam um processo digestivo utilizando a enzima gástrica pepsina. Foram liberados no processo digestivo compostos de menor peso molecular que apresentaram uma alta AA, superior ao complexo de melanoidinas que lhe deu origem. A diminuição do peso molecular pela digestão permite então uma rápida absorção de compostos potencialmente ativos. Este estudo suporta a hipótese de que as melanoidinas teriam uma importante contribuição para a AA do café torrado.

2.4. Outros Compostos do Café Associados à Atividade Antioxidante

Além dos compostos usualmente considerados antioxidantes, discutidos anteriormente, outros componentes presentes no café já foram destacados quanto ao seu potencial antioxidante.

Compostos voláteis incluindo pirróis, furanos, tiofenos e tiazóis foram examinados por Fuster et al. (2000) quanto às suas propriedades antioxidantes. Para avaliação da AA foi acompanhada a conversão oxidativa de hexanal a ácido hexanóico, através de cromatografia

gasosa. Observou-se que pirróis, furanos e tiofenos inibiram a oxidação do hexanal com atividade antioxidante comparável a 50µg/mL do antioxidante sintético hidroxitolueno butilado (BHT). Por outro lado, López-Galilea, De Peña e Cid (2007) não puderam encontrar nenhuma correlação entre a AA avaliada através dos métodos DPPH e FRAP com os compostos voláteis acima mencionados.

Fujioka e Shibamoto (2006) investigaram a AA de extratos de diferentes amostras comerciais de café, correlacionando com alguns componentes, voláteis ou não. Foi possível verificar que dentre 31 compostos químicos identificados, guaiacol, etilguaiacol e vinilguaiacol exibiram atividades antioxidantes comparáveis ao α- tocoferol.

Utilizando padrões, Daglia et al. (2004) avaliaram o poder de seqüestro de radicais OH· de alguns compostos presentes no café, como trigonelina e ácido nicotínico. Trigonelina na concentração 3,0 mM inibiu a degradação de deoxirribose em 19,3 % *in vitro* e 15,7% em condições *ex vivo*. Ácido nicotínico na concentração 0,15mM teve a mesma eficiência nas condições *in vitro* e 23,2% nos ensaios *ex vivo*.

3. RADICAIS LIVRES E ANTIOXIDANTES

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química com existência independente, que possuam um ou mais elétrons desemparelhados, estando este elétron sozinho no orbital. Os radicais livres importantes em organismos vivos incluem hidroxil (OH•), ânion superóxido (O_2^-•), óxido nítrico (NO•) e peroxil (RO_2•). Peroxinitrito ($ONOO^-$), ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio no estado singleto ($^1O_2$) e ozônio O_3 não são radicais livres, porém podem facilmente sofrer reações, formando radicais livres no organismo. Os radicais tem reatividade variada, mas são normalmente menos estáveis que espécies não radicais. Uma vez formado, o radical pode reagir com outro ou com outra molécula por várias interações. A velocidade e a seletividade desses tipos de reações dependem de fatores como a concentração do radical e da localização do elétron desemparelhado. O termo “espécies reativas de oxigênio” (EROs) é freqüentemente usado para incluir espécies de radicais cujo elétron desemparelhado encontra-se no átomo de oxigênio e também as espécies não radicais comentadas (ARUOMA, 1998).

As EROs possuem diferentes ações *in vivo*. Algumas são positivas e estão relacionadas com seu envolvimento na produção de energia, fagocitose, controle do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de compostos biologicamente

importantes. Entretanto, as EROs podem ser prejudiciais atacando proteínas nos tecidos ou enzimas, carboidratos, DNA e lipídios nas membranas celulares, modificando sua fluidez e ocasionando a perda de funções essenciais (PIETTA, 2000). Em organismos saudáveis o balanço entre a formação de EROs com a produção de antioxidantes, deve estar em equilíbrio. Quando a geração de EROs se sobrepõe as barreiras de defesa do organismo, se inicia a ocorrência de danos oxidativos nas estruturas biológicas de macromoléculas como DNA, proteínas e lipídios. Quando ocorre este desequilíbrio, chega-se ao estresse oxidativo. Um severo estresse oxidativo pode causar danos e morte celular, o que sugere a participação de espécies radicais em doenças como câncer, aterosclerose, artrite reumatóide e envelhecimento. A morte celular por sua vez, pode liberar íons metálicos de seus sítios de ligação e estes podem ser quelados por moléculas de DNA (ARUOMA, 1999). Os metais de transição são fortemente implicados na geração de radicais livres pela decomposição de H_2O_2 ou hidroperóxidos lipídicos (SUGIHARA et al., 1999).

Os radicais livres podem ser produzidos através de fontes endógenas e exógenas e são metabolizados no organismo pelo sistema de antioxidantes enzimáticos (por ação das enzimas superóxido dismutase, glutationa peroxidase e catalase) ou também, podem ser “neutralizados” através de substâncias antioxidantes não enzimáticas (como tocoferóis, ácido ascórbico e carotenóides).

Todas as classes de biomoléculas (carboidratos, proteínas, ácidos nucléicos e lipídios) podem ser atacadas pelos radicais livres, porém os lipídios são provavelmente os mais susceptíveis (INAL; KANBAK; SUNAL, 2001). Membranas biológicas contêm considerável quantidade de lipídios insaturados banhados por fluidos ricos em oxigênio e metal (BUEGE; AUST, 1978). Uma grande quantidade de radicais livres pode levar a uma incontrolável reação em cadeia de peroxidação lipídica. A formação do radical peroxil ($RO_2^{\bullet}$) é o principal passo na cadeia de propagação da peroxidação lipídica, porém $RO_2^{\bullet}$ pode também ser formado em sistemas não lipídicos tais como proteínas, que são danificadas pelos lipídios peroxidados, além de contribuir para oxidação do DNA levando à carcinogênese (HALLIWELL et al., 1995).

Peroxidação lipídica ocorre em 3 estágios: iniciação, propagação e finalização. No estágio inicial, radicais livres retiram hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) formando o radical lipídico. No estágio de propagação, o radical lipídico reage com o oxigênio molecular e forma o radical peroxil que é quebrado para gerar mais radicais livres mantendo a reação em cadeia. No estágio terminal, espécies de radicais livres reagem entre si ou com o antioxidante para formar produtos inertes. A reação pode ser inibida pela inativação

de enzimas envolvidas na formação de radicais livres e/ou antioxidantes que inibem o estágio inicial (COOK; SAMMAN, 1996).

Antioxidantes ingeridos na dieta, de fontes exógenas como vegetais, frutas e verduras, bebidas, ervas e especiarias, podem ser efetivos na limitação do processo oxidativo em sistemas tanto *in vitro* como *in vivo* (SCHULER, 1990).

Uma substância é considerada antioxidante quando, presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). Antioxidantes podem ser definidos como compostos, naturais ou sintéticos, que apresentam elevada estabilidade oxidativa e que têm propriedade de prevenir a oxidação de outras substâncias como proteínas, ácidos nucléicos e lipídios (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2003).

Os antioxidantes podem ser classificados como primários, onde atuam como doadores de prótons, impedindo o processo de iniciação desencadeado pelos radicais livres. Nesta classe de antioxidantes são encontrados os compostos fenólicos, aminoácidos, tocoferol e carotenóides. Os antioxidantes secundários atuam no bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos, convertendo-os na forma inativa por ação de agentes redutores, bloqueando a reação em cadeia através da captação de intermediários reativos como os radicais peroxila e alcoxila. Entre eles são também caracterizados os antioxidantes sintéticos, as vitaminas A e E, e os compostos fenólicos (DONELLI; ROBINSON, 1995).

Entre os antioxidantes presentes nos alimentos, os compostos fenólicos estão entres os que mais se destacam. As propriedades benéficas destes compostos podem ser atribuídas à sua capacidade seqüestradora de espécies radicais, principalmente devido à hidroxilas vicinais ligadas ao anel aromático (HALLIWELL et al., 1995). Os compostos fenólicos podem ainda quelar metais de transição, impedindo que estes participem de reações redox e prevenindo, conseqüentemente, eventos oxidativos.

4. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante de alimentos envolve pelo menos duas questões: o potencial antioxidativo, que é determinado pela composição e propriedades antioxidantes dos constituintes e os efeitos biológicos que dependem, entre outras coisas, da biodisponibilidade do antioxidante (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Experimentos simples podem ser realizados para examinar diretamente a habilidade antioxidante *in vitro* e para testar possível efeito anti ou pró-oxidante em diferentes alvos

moleculares. Esta investigação pode ser usada para excluir uma possível atividade antioxidante *in vivo*: um composto que é pouco efetivo *in vitro* possivelmente não terá melhor ação *in vivo* (ARUOMA, 1999).

Duas abordagens são aplicadas para a determinação da atividade antioxidante, direta ou indireta. Quando o método indireto é aplicado estuda-se mais freqüentemente a habilidade do antioxidante em seqüestrar alguns radicais livres, que não estão associados com a real degradação oxidativa, por exemplo, alguns radicais livres estáveis e coloridos são populares devido à intensa absorbância na região do visível. Neste caso, determina-se a atividade antioxidante por determinação da capacidade doadora de hidrogênio. Métodos diretos caracterizam-se pela presença de uma competição entre uma sonda oxidável e o antioxidante pelos radicais gerados por uma fonte de radicais livres. Como substrato de oxidação pode ser utilizado lipídios, misturas lipídicas, proteínas, DNA, ou espécies relevantes biologicamente contendo lipídios, tais como, plasma sangúineo, LDL, membranas biológicas. Peroxidação lipídica mostra-se como o mais conveniente para este propósito (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Diferentes métodos para avaliação da capacidade antioxidante em alimentos têm sido estudados. De acordo com Prior, Wu e Schaich (2005), não há nenhum método universal pelo qual a atividade antioxidante pode ser medida precisamente e quantitativamente. Na seleção de qualquer método para padronização, a primeira consideração é que o método tenha sido utilizado numa quantidade de vezes suficiente em diferentes laboratórios para que as vantagens e desvantagens do ensaio sejam aparentes. Um método ideal para determinar capacidade antioxidante deveria ainda seguir os seguintes critérios: medir compostos químicos que realmente ocorrem em potenciais aplicações; utilizar uma fonte de radical relevante biologicamente; ser simples; ter um mecanismo químico definido; instrumentação ser disponível; adaptáveis para ensaios de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos e uso de diferentes fontes de radicais; adaptáveis para análises de controle de qualidade (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

A capacidade antioxidante do café, atribuída a diferentes compostos, tem sido avaliada por diferentes ensaios os quais incluem: FRAP (SANCHEZ-GONZÁLEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; SAURA-CALIXTO, 2005), ABTS e DMPD (SANCHEZ-GONZÁLEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; SAURA-CALIXTO, 2005; BORRELI et al., 2002), deoxirribose (DAGLIA et al., 2004), DPPH (BORRELI et al.,2002) e determinação de fenólicos totais (BORRELI et al., 2002). Mais recentemente, Bekedam et al. (2008 e) estudaram um método específico para determinação de antioxidantes não fenólicos no café. Esta avaliação foi

realizada com a utilização da técnica de espectroscopia de ressonância de spin utilizando o radical TEMPO (tetrametil- piperidine-1-oxil) que não é seqüestrado por ácidos clorogênicos.

O método de FRAP foi inicialmente desenvolvido para medir poder redutor no plasma, mas o ensaio tem sido adaptado e utilizado para ensaios de antioxidantes em plantas. A reação mede a redução férrica de 2,4,6-tripiridil -s- triazina (TPTZ) para um produto colorido (BENZIE, 1996). A reação detecta compostos com potencial redox < 0,7V (o potencial redox do Fe^{+3}- TPTZ). O poder redutor mostra estar relacionado com o grau de hidroxilação e extensão de conjugação em polifenóis (PULIDO, BRAVO, SAURA-CALIXTO, 2000). Porém, FRAP não detecta compostos que atuam bloqueando radicais pela transferência de H, particularmente tiol e proteínas.

O ensaio de FRAP mede somente os mecanismos de transferência de elétrons, então em combinação com outros métodos pode ser útil na distinção de mecanismos dominantes com diferentes antioxidantes (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). É importante observar que resultados de FRAP podem diferenciar-se grandemente dependendo da escala de tempo de análise, devido a diferentes reatividades de polifenóis. Porém, em comparação com outros ensaios, FRAP é simples, rápido, barato e robusto, não requerendo equipamentos especializados.

Os ensaios utilizando o radical ABTS entre eles o TEAC, são baseados na habilidade dos antioxidantes em seqüestrar o ânion radical de longa vida $ABTS^{\bullet+}$. Neste ensaio o ABTS é oxidado pelo radical peroxil ou outros oxidantes para seu radical cátion, $ABTS^{\bullet+}$, que é intensamente colorido, e a capacidade antioxidante é medida pela habilidade que o composto em teste possui em decrescer a cor reagindo diretamente com o radical $ABTS^{\bullet+}$. Por ser um método operacionalmente simples, tem sido utilizado em muitos estudos de avaliação da capacidade antioxidante. Além disso, $ABTS^{\bullet+}$ é solúvel tanto em solventes aquosos como orgânicos e não é afetado pela força iônica podendo então ser usado em muitos meios para determinar a capacidade antioxidante de extratos lipofílicos e hidrofílicos (AWIKA et al., 2003). Pode também ser utilizado em uma grande faixa de pH e para o estudo de efeitos do pH em mecanismos antioxidantes. Termodinamicamente, um composto pode reduzir $ABTS^{\bullet+}$ quando tem um potencial redox menor que o ABTS (0,68V). Muitos compostos fenólicos têm baixos potenciais redox e podem então reagir com $ABTS^{\bullet+}$. É importante observar que o TEAC pode não ser o mesmo para reações lentas, e pode levar um longo tempo para atingir o ponto final. Pelo uso de um ponto final de curta duração (4 ou 6 minutos) a leitura pode ser

feita antes da reação estar terminada e resultar em menores valores de TEAC (AWIKA et al., 2003).

Outro método para avaliar a atividade seqüestradora de compostos específicos ou extratos é o DPPH, que está sendo utilizado pela rapidez e facilidade. A redução do radical estável DPPH• (2,2-difenil -1- picrilhidrazil) é monitorada pela diminuição da absorvância deste radical a 515 nm. Este radical é um dos poucos radicais nitrogenados estáveis que possui uma cor púrpura intensa. É comercialmente disponível e não necessita ser gerado antes do ensaio como o $ABTS^{\bullet+}$ (BONDET et al, 1997). O mecanismo DPPH é considerado principalmente pela reação de transferência de elétron sendo a abstração do átomo de hidrogênio uma reação de via marginal (Ou et al., 2005). Apesar de simples, sua interpretação pode ser complicada quando os compostos em teste possuem um espectro que sobrepõe o do DPPH a 515nm, como por exemplo, os carotenóides.

Testes com deoxirribose têm também sido utilizados para café. Este ensaio permite a determinação da razão constante de reações com o radical hidroxil. É um teste em tubo, relativamente simples, no qual o radical é gerado pela mistura de ascorbato, peróxido de hidrogênio e Fe^{3+}- EDTA (HALLIWELL et al., 1995). Após aquecimento em condições ácidas, também ocorre a formação de MDA (malondialdeído), um produto secundário de peroxidação lipídica, que é então detectado pela complexação com o TBA (ácido tiobarbitúrico). Porém alguns aspectos devem ser considerados: checar se a substância não reage com o peróxido de hidrogênio, se o ataque do radical à substância pode formar compostos que reagem com o TBA, assegurar que a substância não interfere com os produtos de medida (HALLIWELL et al., 1995).

Outro método muito utilizado para determinar capacidade antioxidantes é o Folin-Ciocalteu (F-C) ou Compostos Fenólicos Totais. Sempre há controvérsia sobre o que está sendo detectado nos ensaios de capacidade antioxidantes: somente fenóis ou fenóis mais agentes redutores e possivelmente metais quelantes. O ensaio F-C, é utilizado há muitos anos como medida de fenólicos totais em produtos naturais, mas o mecanismo básico é uma reação de oxidação/redução e como tal pode ser considerado um outro método de atividade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). O método é simples, sensível e preciso; porém falta especificidade. Singleton e Rossi (1965) melhoraram o método com o reagente “molybdotungstophosphoric heteropolyanion” que reduz fenóis mais especificamente; e o comprimento de onda máximo para o produto é 765 nm. Algumas condições foram impostas para obter dados confiáveis e previsíveis: razão volume de álcali reagente de F-C; tempo e temperatura de reação ótimos para o desenvolvimento da cor, monitoramento da densidade

óptica a 765 nm e uso de ácido gálico como padrão fenólico de referência. Estas condições minimizariam variabilidade e eliminariam resultados irregulares. O método de F-C sofre interferência de um número de substâncias, particularmente, açúcares, aminas aromáticas, dióxido de enxofre, ácido ascórbico, ácidos orgânicos e FeII; portanto correção de interferentes deve ser realizada. Algumas sustâncias inorgânicas podem também reagir com F-C, entre elas sulfato de amônia, sulfato de ferro, hidrazina, nitrito de potássio, fosfato de sódio dando elevada concentração aparente de fenólicos (BOX, 1983). Entretanto, levando-se em conta os fatores mencionados, o método pode ser considerado como apropriado e uma análise uniformemente aceitável de fenólicos totais pode ser estabelecida.

Um método amplamente utilizado e aceito para análise da atividade antioxidante de alimentos tem sido o ORAC. O método de ORAC mede a inibição da oxidação induzida pelo radical peroxil, por um antioxidante. A atividade antioxidante é medida pela transferência do átomo de H. O radical peroxil reage com um composto fluorescente para formar um produto não fluorescente que pode ser quantificado facilmente por fluorescência. Entretanto, pode não ser de fácil acesso para a maioria dos laboratórios. Marcadores fluorescentes, requerem detecção por fluorímetros, que podem não ser disponíveis rotineiramente em laboratórios analíticos, embora seja usado em muitos laboratórios de culturas de células (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

5. REFERÊNCIAS

ABIC- Associação Brasileira da Indústria de Café. Disponível em: <http://www.abic.com.br>. Acesso em: 19 de jan. 2009.

ARUOMA, O. I. Free radicals, antioxidants and international nutrition. **Asia Pacific Journal Clinical Nutrition**, Carlton South, v. 8, n.1, p. 53-63, 1999.

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.199-211, 1998.

AWIKA, J. M. et al. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (Sorghum bicolor) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Columbus, v. 51, n.23, p.6657-6662, 2003.

BEKEDAM, E. K. et al. (a). Incorporation of Chlorogenic Acids in Coffee Brew Melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.56, n.6, p. 2055-2063, 2008.

BEKEDAM, E. K. et al. (b). Roasting Effect on Formation Mechanisms of Coffee Brew Melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.56, n.16, p.7138-7145, 2008.

BEKEDAM, E. K. et al. (c). High Molecular Weight Melanoidins from Coffee Brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.54, n.20, p.7658-7666, 2008.

BEKEDAM, E. K. et al. (d). Low Molecular Weight Melanoidins in Coffee Brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.56, n.11, p. 4060-4067, 2008.

BEKEDAM, E. K. et al. (e). Electron Spin Resonance (ESR) Studies on the Formation of Roasting-Induced Antioxidative Structures in Coffee Brews at Different Degrees of Roast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.56, n.12, p. 4597-4604, 2008.

BENZIE, I. F. F. An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). **Clinical Biochemistry**, Winnipeg, p.111-116; 1996.

BONDET, V., BRAND WILLIAMS, W., BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method**. Lebensm. Wiss. Technology**, v.30, p.609, 615, 1997.

BORRELI, R. C. et al. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v.50, n.22, p. 6527-6533, 2002.

BOX, J. D. Investigation of Folin-Ciocalteau phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. **Water Research**, New York, v.17, p.511-525, 1983.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v.52c, p. 302-310, 1978.

CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M. C. F. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Campinas, v.18, n.4, p.32-38, 1998.

CÄMMERER, B.; KROH, L.W. Antioxidant activity of coffee brew. **European Food Research and Technology**, v.223, p.469–474, 2006.

CARVALHO,V. D.; CHAGAS, S. J. R.; SOUZA, S.M.C. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.18, n.187, p.5-20, 1997.

CLIFFORD, M. N. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. eds M. N. Clifford & K. C. Willson. Chapman and Hall: London, 1985, 305-374.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science Food and Agriculture**, Oxford, v. 79, p. 363-372, 1999.

CLIFFORD, M. N. The composition of green and roasted coffee beans. **Proceedings in Biochemistry**, v.5, p.13-18, 1975.

CLIFFORD, M. N. The nature of chlorogenic acids. Are they advantageous compounds in coffee? *In ASIC, 17° Colloque,* Nairobi, p. 79-89, 1997.

COFFEE BREAK Espécies e variedades: características influenciam escolha- disponível em < http://www.coffeebreak.com.br>. Acesso em julho de 2006.

COFFEE BREAK. Regiões cafeeiras. Disponível em: <http:// www.coffeebreak.com.br/>. Acesso em janeiro de 2009.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids- Chemistry; metabolism, cardioprotective effects and dietary sources, **Nutritional Biochemistry**, v.7, p. 66-76.

CREMIN, P.; KASIM-KARAKAS, S.; WATERHOUSE, A. L. LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v.49, n.4, p.1747-1750, 2001.

CREWS; OLIVIER; WILSON. Urinary biomarkers for assessing dietary exposure to caffeine. **Food Addit. Contam**., v.18, p. 1075-1087, 2001.

DAGLIA, M. et al. In vitro and ex vivo antihydroxil radical activity of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.52, n.6, p.1700-1704, 2004.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R.F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n.4, p. 586-592, 2004.

DONELLI, J.K.; ROBINSON, D.S. Free radicals in foods. **Free Radical Research**, London, v.22, p.147–176, 1995.

FARAH, A. et al. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acids lactones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.53, n.5, p.1505-1513, 2005.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology,** São Paulo, v.18, n.1, p. 23-36, 2006.

FUJIOKA, K.; SHIBAMOTO, T. Quantitation of volatiles and nonvolatiles acids in an extract from coffee beverages: correlation with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.54, n.16, p. 6054- 6058, 2006.

FUSTER, M. D. et al. Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.48, n. 11, p. 5600- 5603, 2000.

GÓMEZ-RUIZ, J. A., LEAKE, D. S., AMES, J. M. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.55, n.17, p. 6962-6969, 2007.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 33, p. 601-617, 1995.

INAL, M. E.; KANBAK, G.; SUNAL, E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels relates to aging. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 305, p.75-80, 2001.

LAGO, R. C. A. Lipídios em grãos. **Boletim do Ceppa**, Curitiba, v.19, n.2, p. 319-340, 2001.

LEE, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.295, p.141-154, 2000.

LELOUP, V.; LIARDON, R. Analytical Characterization of coffee carbohydrates. ASIC 15° Colloque, Montepelier, v.45, p.863-865, 1997.

LÓPEZ-GALILEA, I.; DE PEÑA, M.P.; CID, C. Correlation of Selected Constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: Influence of the brewing procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.55, n.15, p.6110-6117, 2007.

MAPA, 2008. (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) – Tendências do consumo de café em 2008. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em janeiro de 2009.

MONTEIRO, M.C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras de café torrado. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n.4, p.623-641, 2005.

MOREIRA, R. F. A., TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n.2, p.195-203, 2000.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. . Efeito dos compostos fenólicos de especiarias sobre lípides polinsaturados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 39, p.130-133, 2003.

MOREIRA, et al. Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Columbus**,** v.53, n.5, p.1399-1402; 2005.

MORISHITA, H.; KIDO, R. INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE, 16, 1995, Kyoto. **Antioxidant Activities of Chlorogenic Acids.** Paris: Asic, 1995. 500 p.

NARDINI, M. *et al*. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide induced oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.25, p.1098- 1105.

NATELLA F. et al. Benzoic and cinnamic acids derivatives as antioxidants: structure-activity relation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.47, n.4, p.1453-1459, 1999.

NEHLIG, A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews,** Tarrytown, v. 23, p. 563–576, 1999.

NERADIL, J.; VESELSKA, R., SLANINA, J. UVC- protective effect of caffeic acid on normal and transformed human skin cells in vitro. **Folia ,** Warszawa, v.49, p.197-202, 2003.

NICOLI, M. C., ANESE, M., MANZOCO, L., LERICI, C. R. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v.30, n.3, p.292-297, 1997.

NOGUEIRA M., TRUGO L.C. Distribuição de isômeros de ácidos clorogênicos e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.2, 2003.

NUNES, M. F., COIMBRA, M. A. Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted Arabica coffee. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.49, n.4, p.1773-1782, 2001.

NUNES. F. M. et al. Characterization of galactomannann derivatives in roasted coffee beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.54, n.9, 3428-3439, 2006.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN P.C.H.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.131, p. 66-71, 2001.

OU, B.; PRIOR, R.L.; HUANG, D. The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays**.** **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

PARRAS, P. et al. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chemistry,** Oxford, v.102, n.3, p.582-592, 2007.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v.63, n.7, p.1035-1042, 2000.

PRIOR, R. L.; XIANLI, W.; SCHAICH, K. Standardized Methods for Determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 53, n.10, p.4290-4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v.48, n.8, p.3396- 3402, 2000.

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

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Oxford, v.92, n.2, p.235- 254, 2005.

RUFIÁN-HENARES, J.; MORALES, F. Effect of in vitro enzymatic digestion on antioxidant activity of coffee melanoidins and fractions. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v.55, n.24, p. 10016-10021, 2007.

SAIJA, A. et al. Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. **Journal of Science of Food and Agricultural**, v.79, p.476-480, 1999.

SAIJA, A. et al. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acid as topical photoprotective agents. **International Journal Pharmaceutical**, São Paulo, v.199, p.39-47, 2000.

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

SCHULER, P. Natural antioxidants exploited commercially. **In Food Antioxidants**, Hudson BJF (ed). Elsevier, London, p. 99-170.

SHI, X., DALAL, N. S. Antioxidant behavior of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. **Food Chemistry Toxicology,** v. 29, n.1, p.1-6, 1991.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.16, p.144-158, 1965.

SUGHIHARA, N. et al. Anti and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α- linolenic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.27, n.11, p. 1313- 1323, 1999.

TRUGO, L. C.; MOREIRA, R.F.A., DE MARIA, C.A.B. Componentes voláteis do café torrado. Parte II: Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.2, p. 195-203, 2000.

TRUGO, L. C.; MOREIRA, R.F.A., DE MARIA, C.A.B. Componentes voláteis do café torrado. Parte I: Compostos heterocíclicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n.2, p.255-263, 1999.

WU, WEIJIAN. **Influence of Composition of Soluble Coffee Beverage on Glass Transition and Stickiness Phenomenon.** 1994. 181 f. Dissertação (Doutorado) - Von Der Naturwissenschaftlichen Fakultät, Fujian, 1994.

CAPÍTULO II

Padronização e Validação de Métodos para Avaliação da Atividade Antioxidante e Quantificação dos Compostos Bioativos de Café Torrado e Solúvel

J. A. Vignoli [1*]; D. G. Bassoli [1]; M. T. Benassi [2]

1- Companhia Iguaçu de Café Solúvel, BR 369, Km 88, Cornélio Procópio, PR, Brasil

2- Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 6, Londrina, PR, Brasil

RESUMO

Atividade antioxidante (AA) do café tem recebido grande atenção nos últimos anos. O potencial antioxidante, que tem sido relacionado à presença de diferentes componentes do café, pode ser medido por diversos métodos. Entretanto, pouco é sabido sobre a eficiência dos métodos utilizados na avaliação da AA do produto, assim como para aqueles envolvidos na determinação dos compostos responsáveis pela AA. Assim este trabalho teve como objetivo avaliar e validar, para café torrado e solúvel, técnicas de medida da AA, como ABTS (TEAC), FRAP, Folin-Ciocalteau, DPPH e Deoxirribose, juntamente com um método de cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de compostos potencialmente antioxidantes (trigonelina, furfural, hidroximetilfurfural, 5-ACQ, cafeína, ácido caféico, ácido ferúlico). Os resultados mostraram que todos os métodos de medida de AA foram precisos e podem ser utilizados para avaliação das matrizes de café torrado e solúvel. O método utilizado para quantificação dos compostos bioativos apresentou linearidade e recuperação adequadas dentro da faixa estudada. Precisão praticada à técnica cromatográfica foi encontrada para os compostos, e LD (limite de detecção) e LQ (limite de quantificação) abaixo dos teores usualmente encontrados nesses produtos puderam ser observados. Os métodos estudados foram, portanto, eficientes para o estudo do potencial antioxidante do café torrado e solúvel e identificação e quantificação dos compostos bioativos.

Palavras-chave: FRAP, ABTS, Folin-Ciocalteau, DPPH, deoxirribose

1. INTRODUÇÃO

Muitos estudos estão sendo focados no potencial antioxidante do café. A atividade antioxidante (AA) depende de constituintes naturais e de compostos formados durante a torra. Dentre naturalmente presentes, destacam-se os compostos fenólicos como os ácidos clorogênicos e caféico e ferúlico, presente principalmente em café verde e originado da degradação do ácido clorogênico após absorção intestinal. A cafeína, e os metabólitos de sua degradação, e as melanoidinas, formadas durante o processamento, também têm sido associadas a AA (DAGLIA et al., 2004).

Por definição, a atividade antioxidante (AA) é a capacidade de um composto de inibir degradação oxidativa. A AA em alimentos envolve pelo menos duas questões: o potencial antioxidativo, que é determinado pela composição e propriedades antioxidantes dos constituintes e os efeitos biológicos que dependem, entre outras coisas, da biodisponibilidade do antioxidante (ROGINSKY; LISSI, 2005).

De acordo com Halliwell e Gutteridge (1990), mecanismos de ação antioxidante podem incluir supressão da formação de EROs (espécies reativas de oxigênio) tanto pela inibição de enzimas ou pela quelação de elementos envolvidos na produção de radicais livres, seqüestro de EROs e aumento ou proteção das defesas antioxidantes do organismo. Experimentos simples podem ser feitos para analisar a AA *in vitro* e para testar possível efeito pró-oxidante em diferentes alvos moleculares. Essa análise é preliminar a uma investigação mais complexa *in vivo*: um composto pouco efetivo *in vitro* possivelmente não terá melhor ação *in vivo* (ARUOMA, 1999).

Duas abordagens são aplicadas para determinação da AA, direta ou indireta. No método indireto estuda-se mais freqüentemente a habilidade do antioxidante em seqüestrar alguns radicais livres, que não estão associados com a real degradação oxidativa. Radicais livres estáveis e coloridos são populares devido à intensa absorvância. Neste caso, determina-se a atividade antioxidante pela atividade doadora de hidrogênio. Métodos diretos são baseados no estudo do efeito do antioxidante na degradação oxidativa de um sistema teste. Como substrato de oxidação podem ser utilizados lipídios, proteínas, DNA, ou espécies relevantes biologicamente, tais como, plasma sangúineo, LDL, membranas biológicas. Peroxidação lipídica mostra-se como o mais conveniente para este propósito (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Diferentes metodologias são utilizadas para caracterizar a capacidade antioxidante de alimentos, entretanto, não há nenhum método universal pelo qual a AA possa ser medida

precisamente e quantitativamente (PRIOR et al., 2005). A capacidade antioxidante da bebida do café já foi estudada pelos ensaios de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) (SÁNCHEZ–GONZÁLEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; SAURA- CALIXTO, 2005), ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (SÁNCHEZ – GONZÁLEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; SAURA- CALIXTO, 2005; BORRELI et al., 2002), deoxirribose (DAGLIA et al.,2004), DPPH (2,2 Difenil-1- picrilhidrazil) (BORRELI et al., 2002) e determinação de fenólicos totais (BORRELI et al., 2002). No geral, os estudos referem-se ao café verde e torrado e pouco é conhecido sobre a AA do café solúvel.

Informações sobre padronização e validação dessas metodologias e a aplicação aos diferentes produtos são escassas. Para cada produto, é ainda necessário identificar um método ou grupo de métodos que permitam uma avaliação mais adequada da atividade antioxidante. Além disso, o conhecimento sobre a incerteza do método é extremamente valioso quando a comparação de diferentes amostras faz-se necessária.

Assim este trabalho avaliou a adequação e precisão de diferentes técnicas de medida de atividade antioxidante para o café torrado e solúvel, assim como de uma técnica cromatográfica para determinação dos principais compostos potencialmente associados a AA dos produtos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Todas as amostras de café solúvel e torrado foram provenientes da Companhia Iguaçu de Café Solúvel, Cornélio Procópio, Paraná, Brasil. Selecionou-se um produto 100% café robusta na cor clara, tanto para torrado como para solúvel.

Padrões de ácido-5-cafeoilquínico, cafeína, trigonelina, ácido gálico, furfural, hidroximetilfurfural, grau cromatográfico, foram obtidos da Sigma Aldrich- (EUA). Ácido tiobarbitúrico; ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico); DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), deoxirribose, cloreto de ferro III e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foram obtidos da Sigma Chemical CO. (EUA). Trolox (6-hidroxi-. 2,5,7,8-tetrametilchroman-2- ácido carboxílico) e TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil-s-triazina) foram obtidos da Fluka/ Sigma-Aldrich (Dinamarca). Folin-Ciocalteau e peróxido de hidrogênio foram obtidos da Merck (Alemanha).

Nas metodologias de caracterização da AA empregou-se um espectrofotômetro UV-Vis modelo UV mini-1240 (Shimadzu, Japão). Para o estudo cromatográfico, utilizou-se um cromatógrafo à líquido Dionex (Alemanha) composto por bomba gradiente P680, forno para coluna TCC-100, amostrador automático (ASI-100) e detector de Arranjo de Diodos (PDA-100). O sistema estava acoplado a um computador com o software Chromeleon versão 6.6 para processamento dos dados.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação das amostras

Tanto para avaliação da AA como para análise cromatográfica, as amostras de café solúvel foram preparadas diretamente pela dissolução em água na concentração desejada.

Para o café torrado, foi adotado o mesmo procedimento no preparo das amostras para todos os testes, alterando-se apenas a concentração de acordo com o requerido em cada método. Os grãos foram moídos e passados através de uma peneira de 0,35mm. A amostra foi então pesada, dissolvida em água fervente ficando sob agitação durante 5 minutos, e após filtração, coletou-se o material filtrado (CHAMBEL et al., 1997).

2.2.2. Caracterização da atividade antioxidante

Determinação da atividade seqüestradora do radical hidroxil utilizando deoxirribose

A atividade de seqüestro de radicais hidroxílicos pelas soluções de café, baseadas na inibição de degradação de deoxirribose foi avaliada de acordo com Aruoma et al. (1994), com algumas modificações.

Em 1 mL de solução a mistura de reação continha os seguintes reagentes: $FeCl_3$ (20 µM) premisturado com EDTA (100 µM) em tampão KH_2PO_4/KOH; 2deoxi-D-ribose (2,8mM), H_2O_2 (2,8mM), ácido ascórbico (25 µM) e 12µL da solução de café previamente preparada.

As amostras foram incubadas em um banho de água a 37°C por 30 minutos. Para determinar as substâncias reativas ao TBA formadas adicionou-se 1 mL de ácido tiobarbitúrico 1% e 1mL de ácido tricloroacético 2,8%. A mistura foi aquecida em banho a 80°C por 20 minutos. Posteriormente foi mantida em gelo por 5 minutos. A absorvância do sobrenadante foi lida a 532 nm. Concomitantemente, foram preparadas o branco (ausência de

deoxirribose), controle positivo (ausência de amostra) e controle negativo (ausência de ferro). As medidas foram realizadas em triplicata. Para corrigir a interferência de substâncias que podem naturalmente ocorrer nas soluções de café e reagir com ácido tiobarbitúrico e devido à cor da própria amostra, foram analisadas soluções relativas, das amostras e do controle, preparadas conforme descrito, porém sem a adição de ácido ascórbico.

A atividade seqüestradora foi expressa como a porcentagem de inibição da atividade (IA%) da degradação de deoxirribose na presença da solução de café relativa às amostras controle, de acordo com a equação 1:

$$IA(\%) = 100 - \frac{\Delta Absamostra}{\Delta Absamostracontrole} * 100 \qquad \textbf{(equação 1)}$$

Onde:

Δ Abs amostra: (Absorvância da amostra com ácido ascórbico - Absorvância da amostra sem ácido ascórbico)

Δ Abs controle: (Absorvância do controle com ácido ascórbico - Absorvância do controle sem ácido ascórbico)

Determinação da atividade antioxidante pelo método $ABTS^{+\cdot}$

A capacidade antioxidante das soluções de café frente ao radical livre $ABTS^{+\bullet}$ foi realizada de acordo com Sánchez–González; Jiménez-Escrig; Saura- Calixto (2005). A solução ABTS foi preparada em meio aquoso para evitar precipitação dos componentes do café. O cátion $ABTS^{+\bullet}$ foi produzido reagindo 7mM da solução estoque ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A mistura foi armazenada em frasco escuro e em temperatura ambiente por 12-16 horas antes do uso. A solução $ABTS^{+\bullet}$ foi diluída com tampão fosfato (pH 7.4) para uma absorvância de 0,7 a 730 nm. Após a adição de 10µL de amostra ou padrão Trolox para 4mL da solução $ABTS^{+\bullet}$ diluída, as leituras de absorvância a 730 nm foram realizadas após 6 minutos de reação. Soluções de etanol com concentrações conhecidas de trolox (2,5; 5,0; 7,5; 12,5 e 20,0 µMol/L) foram usadas para calibração. Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC - µMol/LTrolox/µg/mL de amostra).

Avaliação do poder de redução pelo teste FRAP

O poder de redução da bebida foi avaliado de acordo com Sánchez–González; Jiménez-Escrig; Saura- Calixto (2005), com algumas modificações.

O reagente de FRAP foi preparado como segue: 2,5 mL de uma solução 10mM TPTZ em HCl 40mM foram adicionados a 2,5 mL de $FeCl_3.6H_2O$ e 25 mL de tampão acetato 0.3 mM pH 3.6. A solução foi incubada a 37°C por 30 minutos.

Para a avaliação da capacidade antioxidante 900 µL do reagente FRAP preparado previamente, foi misturado com 90µL de água destilada e 10 µL da amostra ou padrão. As amostras foram incubadas à 37°C por 30 minutos e a leitura realizada a 595 nm. Soluções padrão com diferentes concentrações de trolox (4,5; 7,5; 10,5; 12,0 e 18,0 µmol/L) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como µmol/L de Trolox / µg/mL de amostra.

Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH$^{\bullet}$

A redução do radical livre DPPH$^{\bullet}$ foi determinada pela mudança colorimétrica medida a 517 nm. O tubo de reação continha os seguintes reagentes: 1mL de tampão acetato, 1 mL de etanol, 500 µl de DPPH 250 µM e 10 µl de amostra. Após 10 minutos à temperatura ambiente realizou-se a leitura em 517 nm. Juntamente foram preparados o branco (sem amostra e sem DPPH) e controle positivo (sem amostra) (CASAGRANDE et al., 2007). O poder antioxidante da bebida foi calculado pela porcentagem de inibição da atividade do radical livre (IA %), de acordo com a equação 2:

*IA (%) = 100- (Absorvância da amostra/ Absorvância do controle)*100* **(equação 2)**

Avaliação da atividade antioxidante por Folin-Ciocalteau

Para determinação de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteau, 100µL das amostras foram adicionados a 7,5 mL de água destilada e 300 µL do reagente de Folin-Ciocalteau 0,9N. Após agitação e mistura, foi acrescentado 1mL de solução Na_2CO_3 20% e 1,1mL de água destilada misturando-se então com auxílio de agitador. A reação foi mantida à temperatura ambiente por 1 hora. A leitura foi realizada a 765 nm. Fez-se uma curva de calibração utilizando ácido gálico como padrão nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 7,0 Mmol/L de ácido gálico. Os resultados foram expressos como mMol/L de ácido gálico/mg/mL de amostra (SINGLETON, ORTHOFER E LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

2.2.3. Validação das metodologias

Inicialmente definiu-se a faixa de trabalho para cada metodologia. Para avaliação dos métodos de atividade antioxidante, as amostras foram preparadas em diferentes concentrações

de maneira que os valores de absorvância, das reações finais, ficassem na faixa de leitura entre 0,2 e 0,7UA. As concentrações selecionadas e validadas em cada metodologia, para o café solúvel e torrado estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações de café solúvel e torrado utilizadas na validação de diferentes metodologias.

	Concentração (mg/mL)	
Métodos	**Solúvel**	**Torrado**
ABTS	1,00	5,00
	3,00	10,00
	5,00	15,00
DPPH	1,00	1,00
	3,00	4,00
	5,00	8,00
FRAP	0,45	0,90
	0,90	1,50
	1,50	3,00
FOLIN	0,50	2,00
	1,00	3,00
	2,00	5,00
DEOXIRRIBOSE	5,00	5,00
	10,00	15,00

Como a atividade antioxidante foi determinada em amostras complexas e não de um composto isolado, não foi possível a análise de alguns parâmetros normalmente considerados na validação de métodos analíticos, sendo estudado somente o parâmetro de precisão e a linearidade para os métodos de Folin, FRAP e ABTS. O parâmetro de precisão foi avaliado como precisão intermediária (inter-dias), com análises realizadas em dias diferentes com diferentes analistas.

A avaliação da precisão foi realizada de acordo com a ISO 5725 (1994) e NBR 14597 (2000), onde é estabelecido que $t.(n-1) \geq 15$; sendo t o grupo de medições e n o número de repetições de cada grupo. Nas metodologias ABTS, FRAP, DPPH e Folin foram realizadas 5 repetições (preparações independentes) em três concentrações para o café solúvel e três concentrações para o café torrado, durante 5 dias consecutivos. Para cada concentração, utilizou-se valor de $t = 5$ (5 dias consecutivos) e $n = 15$ (5 repetições em triplicata). Para a metodologia de deoxirribose, o experimento foi realizado com duas concentrações e 3 repetições, obtendo-se $t = 5$ e $n = 9$.

A linearidade dos métodos de Folin-Ciocalteau, FRAP e ABTS foi estudada na faixa de 0,5 a 7 mMol de ácido gálico; 4,5 a 18,0 µMol/L de Trolox e 2,5 a 20 µMol/L de Trolox, respectivamente.

2.2.4. Avaliação Cromatográfica

A determinação dos compostos trigonelina, furfural, 5-hidroximetilfurfural, cafeína, 5-ACQ, ácido caféico e ácido ferúlico foi realizada no cromatógrafo a líquido, com base nos tempos de retenção dos solutos eluídos da coluna comparados com o do padrão, por co-cromatografia e por comparação dos espectros de absorção. A quantificação foi feita por padronização externa, construindo-se as curvas de calibração considerando-se a área do pico.

As condições cromatográficas foram adaptadas da literatura (ALVES et al., 2006). Utilizou-se coluna Spherisorb ODS2 (Waters, EUA), de 4,6 x 250 mm, partículas 5µm. Para eluição dos compostos utilizou-se um gradiente de ácido acético/água (5:95 v/v) (A) e acetonitrila (B) como segue: 0-5 min: 4% B; 5-10 min: 10% B; 10- 30 min: 10% B; 30-40 min: 0% B; 40-50 min: 4% B, com vazão de 0,7 mL/minuto. A detecção foi feita a 272nm para trigonelina, furfural, 5-HMF e cafeína e 320 nm para 5-ACQ, ácido caféico e ferúlico. As amostras foram filtradas em membrana de 0,22 µm e diretamente injetadas no sistema cromatográfico.

Validação da metodologia cromatográfica

A exatidão foi verificada por ensaios de recuperação. Foi realizada adição de padrões às amostras em 3 quantidades diferentes, variando-se entre 50 a 150% da concentração alvo. Assim, adicionou-se (em µg/mL): 10,15 e 20 para trigonelina; 2, 3 e 5 para HMF; 0,2, 0,3 e 0,5 para furfural; 10,15 e 20 para cafeína e 5-ACQ e 1,5; 2,0 e 4,0 para ácido ferúlico e caféico. As análises para cada concentração foram realizadas em quintuplicata (Garfield, 2000).

Para determinação da precisão, foram analisadas cinco preparações independentes, em três diferentes concentrações da mesma amostra (alta, média e baixa, dentro da faixa de aplicação do método), sujeitas às mesmas condições de extração e análise, no mesmo equipamento, durante cinco dias consecutivos (Garfield, 2000). Para o café torrado empregou-se concentrações de 3; 5 e 8mg/mL e para solúvel, de 0,7; 1,0 e 1,5 mg/mL.

A linearidade foi determinada pela análise em triplicata de misturas padrão em cinco concentrações para cada composto, construindo-se as curvas de calibração e calculando-se o

coeficiente de determinação (R^2) e nível de significância da correlação (p). A faixa de concentração foi determinada baseada em análises prévias e dados da literatura (CHAMBEL et al., 1997).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados utilizando os coeficientes lineares e angulares das curvas analíticas dos ensaios de linearidade (RIBANI et al., 2004), de acordo com a equação 3:

$$CL = \frac{k * s_X}{\bar{a}}$$ **(equação 3)**

onde: CL= concentração limite

k= 3 para LD e 10 para LQ;

sx = desvio padrão entre os coeficientes lineares das curvas

$\bar{a}$ = média aritmética dos coeficientes angulares

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação dos métodos de determinação da atividade antioxidante

A Tabela 2 apresenta, para o café solúvel e torrado, os valores médios de atividade antioxidante obtidos em cada metodologia nas concentrações estudadas. Pode-se também observar os coeficientes de variação entre dias (CV%), que informam o grau de dispersão dos resultados gerados por cada método. O conhecimento do CV dos métodos para uma matriz específica é extremamente importante quando se deseja comparar a atividade antioxidante de diferentes amostras.

Tabela 2. Avaliação da precisão inter-dias em diferentes métodos para o café torrado e solúvel.

Método	Café Torrado *			Café Solúvel *			
	Conc. (mg/mL)	AA	CV (%)	Conc. (mg/mL)	AA	CV (%)	Média do CV (%)**
ABTS	5,00	0,59	9,79	1,00	1,36	7,99	
(µMol/LTrolox/µg.mL^{-1})	10,00	0,48	11,07	3,00	1,16	8,27	9,65
	15,00	0,47	9,07	5,00	1,11	11,97	
média		0,52	***9,98***		1,21	***9,41***	
Deoxi	5,00	29,37	11,24	5,00	45,26	4,26	
(%IA)	15,00	48,14	6,17	10,00	59,70	6,59	7,12
média			***8,81***			***5,43***	
FRAP	0,30	0,62	5,10	0,15	1,28	5,67	
(µMol/LTrolox/µg.mL^{-1})	0,60	0,63	4,42	0,30	1,24	6,29	4,67
	0,90	0,61	2,77	0,45	1,25	3,75	
média		0,62	***4,1***		1,26	***5,24***	
DPPH	3,00	14,57	8,89	1,00	13,26	22,72	
(%IA)	5,00	25,45	4,32	4,00	48,90	5,28	7,61
	10,00	47,25	3,39	8,00	80,22	1,13	
média			***5,5***			***9,71***	
Folin	2,00	7,36	3,30	0,50	17,10	4,87	
(mMol/L ác.gal./mg.mL^{-1})	3,00	7,21	2,26	1,00	16,93	3,72	3,51
	5,00	6,76	3,11	2,00	16,08	4,01	
média		7,11	***2,89***		16,70	***4,12***	

* média de 25 valores (quintuplicatas, 5dias) e CV (%) entre os dias
**média dos valores de CV considerando as 3 concentrações nas duas matrizes

Os valores de atividade antioxidante apresentados correspondem à média obtida das quintuplicatas realizadas durante 5 dias consecutivos (precisão inter-ensaio) e o coeficiente de variação correspondente a estas medidas. Pode-se observar que, para as duas matrizes, todos os métodos apresentaram coeficientes de variação (CV) abaixo de 10%, pelo menos em uma das concentrações estudadas. Mesmo considerando concentrações diferenciadas, apenas o ensaio com DPPH para matriz de café solúvel, na concentração 1mg/mL (CV de 23%), apresentou CV superior ao valor de 15% recomendado pela ANVISA (2003), indicando que seria adequado trabalhar com concentrações mais altas.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 2 pode-se notar que foi encontrada uma variação maior (média dos valores de CV, considerando as duas matrizes em todas as

concentrações acima de 5%) para os métodos onde o seqüestro de radicais é medido, ou seja, DPPH, Deoxirribose e ABTS. No preparo da bebida do produto torrado o teor de sólidos solúveis final, que participará da reação de seqüestro dos radicais, é menor que no caso do solúvel. A diferença de concentração poderia influenciar a reação, resultando em maiores variações em baixos níveis de concentração, o que foi também observado quando a bebida solúvel foi avaliada. Os maiores coeficientes de variação, em geral, foram encontrados no nível mais baixo de concentração estudado. Para os ensaios de ABTS e FRAP, observou-se boa repetibilidade nas duas matrizes independentemente da concentração.

As metodologias ABTS, FRAP e Folin têm seus resultados expressos comparando-se ao teor de um composto utilizado na curva de calibração. Portanto, dentro da faixa selecionada, onde o método é linear (valores de $R \geq 0,99$, para $p \leq 0,01$), a resposta não deve sofrer variação, já que corresponde ao teor de Trolox ou ácido gálico por µg/mL de amostra ou mg/mL, respectivamente.

As metodologias Deoxirribose e DPPH medem a inibição do radical livre pelo antioxidante presente na amostra. Então, espera-se que esta inibição aumente com elevação da concentração de amostra, já que um aumento de antioxidantes ocorrerá frente ao radical livre presente na reação do ensaio. Estes resultados podem ser observados na Tabela 2, indicando uma boa escolha da faixa de trabalho.

Importante mencionar que para as metodologias de ABTS, FRAP e Folin a concentração utilizada teve pouca influência nos resultados observados. No entanto, tanto para Deoxirribose quanto para DPPH, os valores de atividade antioxidante foram dependentes das concentrações empregadas. Isso indica que para essas metodologias, a comparação de resultados com dados de literatura deveria ser realizada levando-se em conta a faixa de concentração estudada, ou utilizando-se de várias concentrações para obtenção dos valores de IC_{50}.

Os resultados demonstram que é possível utilizar todos os métodos estudados para medir a atividade antioxidante do café torrado e solúvel, bem como indicam qual a melhor faixa de trabalho para que mínimas variações nas medidas ocorram.

3.2. Avaliação do Método Cromatográfico

O preparo de amostra utilizado (Chambel et al., 1997) e a adaptação das condições cromatográficas permitiram uma boa resolução para os compostos de interesse nas matrizes de café torrado e solúvel (Figura 1), observando-se separação e quantificação adequadas. A maior dificuldade foi a separação do ácido caféico, que tende a co-eluir juntamente com 5-ACQ ou cafeína, exigindo bom controle das condições cromatográficas e estabilidade do sistema para uma boa resolução. Apesar de terem sido utilizadas amostras com grau de torra claro, a presença de ácidos caféico e ferúlico não foi observada nas amostras.

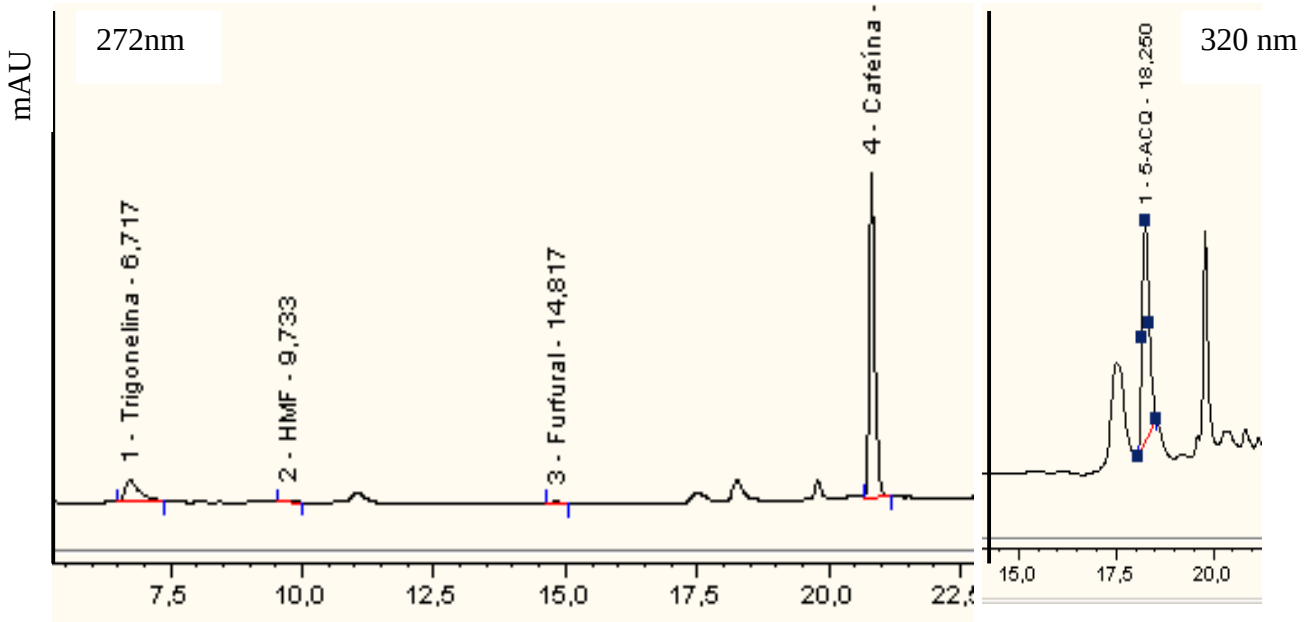


Figura 1. Perfil cromatográfico dos compostos de interesse na matriz de café solúvel. Detecção: 5-ACQ: 320nm; trigonelina, 5-Hidroximetilfurfural (HMF), furfural e cafeína: 272nm.

Validação da Metodologia Cromatográfica

As curvas de calibração mostraram-se lineares na faixa estudada e com alto coeficiente de determinação ($R^2 \geq 0{,}97$, para $p \leq 0{,}001$) (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros da regressão linear das curvas de calibração dos compostos bioativos.

Compostos Bioativos	Equação*	R^{2**}	Faixa de linearidade (µg/mL)
Trigonelina	y = 0,3326 x + 0,4225	0,98	15,0 - 50,0
5-HMF	y = 2,35 x - 0,4106	0,99	0,5 - 8,0
Furfural	y = 2,54 x - 0,0699	0,99	0,05- 1,0
Cafeína	y = 1,5256 x - 5,112	0,97	10,0 -60,0
5-ACQ	y = 1,1679 x - 0,83	0,99	5,0 - 30,0
Ácido Caféico	y = 2,9078 x + 0,3806	0,99	1,0 - 6,0
Ácido Ferúlico	y = 2,183 x - 0,197	0,99	1,0 - 6,0

* x = concentração em µg/mL; y = área do pico cromatográfico.
** $p \leq 0,001$

Observou-se, tanto na matriz de café torrado como café solúvel, boa recuperação para todos os compostos estudados (na faixa de 90 a 108%), dentro da faixa aceitável de recuperação para determinação em ppm (GARFIELD, 2000). Para trabalhos que utilizaram condições de extração semelhantes são descritos valores de recuperação no café torrado de 74 a 104% para cafeína; 85 a 220% para trigonelina e de 88 a 103% para 5-ACQ (PERRONE; DONANGELO; FARAH, 2008; ALVES et al., 2006; CAMARGO; TOLEDO, 1988; NOGUEIRA et al., 2004; CHAMBEL ET al., 1997). Para ácido caféico, ferúlico, HMF e furfural não se encontrou na literatura informação de recuperação para metodogia por CLAE-UV.

Considerando-se a precisão, CV abaixo de 10% foram encontrados para todos os compostos em ambas as matrizes, com exceção do furfural. Puderam ser observados maiores CV na matriz de torrado (8 a 14%), mais uma vez, podendo ser atribuído à etapa adicional de extração dos compostos; assim como uma diminuição do CV com o aumento da concentração das amostras, tanto na matriz de torrado como solúvel. Na literatura são relatados CV variando de 1 a 7% para cafeína, 1 a 6% para trigonelina e 3 a 5% para ácido clorogênico, empregando-se diferentes metodologias para diferentes matrizes (café verde, instantâneo, e torrado) (PERRONE; DONANGELO; FARAH, 2008; ALVES et al., 2006; TRUGO; DE MARIA; WERNECK, 1991; DE MARIA et al., 1995). Para furfural, nas concentrações de 3 e 5mg/mL os valores de CV variaram de 22 a 30%, observou-se no entanto que para a concentração de 8mg/mL o CV foi abaixo de 20%, conforme recomendado por Ribani et al. (2004) para amostras complexas e com baixas concentrações do analito.

Os valores de LD e LQ encontram-se abaixo dos valores determinados nas amostras de café solúvel e torrado. Os valores de LD, LQ de cada composto assim como os seus teores

nas matrizes estão apresentados na Tabela 4. Os ácidos caféico e ferúlico não foram detectados apesar de se ter utilizado torra clara para os cafés torrado e solúvel.

Tabela 4. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e teores dos diferentes compostos encontrados no café torrado e solúvel.

Compostos	**LD**	**LQ**	**Teores (µg/g)**	
	µg/g	**µg/g**	**Café Torrado**	**Café Solúvel**
Trigonelina	4,05	13,51	630 ± 20	642 ± 20
HMF	0,32	1,00	7,2 ± 0,4	229 ± 7
Furfural	0,04	0,12	4,3 ± 0,6	7± 3
Cafeína	0,99	3,30	1342 ± 41	3576 ± 99
5-ACQ	0,62	2,11	484 ± 17	862 ± 26
Ácido caféico	0,14	0,45	nd.	nd.
Ácido ferúlico	0,33	1,11	nd.	nd.

nd: não detectado

4. CONCLUSÃO

As metodologias FRAP, DPPH, ABTS, Folin e Deoxirribose são aplicáveis para avaliação qualitativa e quantitativa da atividade antioxidante em amostras de café torrado e solúvel. Coeficientes de variação inferiores a 10% foram obtidos em todos os ensaios de AA avaliados, entretanto a faixa de concentração avaliada dever ser considerada, já que pode interferir na precisão do ensaio e nos resultados de atividade antioxidante. A metodologia por CLAE apresentou linearidade, precisão e recuperação adequadas a esta técnica, dentro da faixa estudada. Os limites de detecção e quantificação foram abaixo dos teores usualmente encontrados nesses produtos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. T. et al. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova,** São Paulo, v. 29, n. 6, p. 1164-1168, 2006.

ANVISA, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, resolução RE nº 899, de 23 de maio de 2003, Brasil.

ARUOMA, O. I. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. **Methods in Enzymolology**, v.233, p. 57-66, 1994.

ARUOMA, O. I. Free radicals, antioxidants and international nutrition. **Asia Pacific Journal Clinical Nutrition**, Carlton South, v. 8, n.1, p. 53-63, 1999.

BISPO, M. S. et al. Simultaneous determination of caffeine, theobromine and theophylline by high performance liquid chromatography (HPLC). **Journal Chromatography Science,** vol. 40, p. 45-48, 2002.

BORRELI, R. C. et al. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v.50, n.22 p.6527-6533, 2002.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Determinação de cafeína em cafés comerciais brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n.4, p. 421-424, 1998.

CHAMBEL, M.B. et al. Development of a HPLC/Diode Array detector method for simultaneous determination of 5-HMF, furfural, 5- O- Caffeoylquinic acid and caffeine in coffee. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies,** New York**,** v. 20; n.18; p. 2949-2957 ;1997.

DAGLIA, M. et al. In vitro and ex vivo antihydroxil radical activity of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 52, n.6, p. 1700-1704, 2004.

DE MARIA, C. A. B. Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high performance gel filtration chromatograph. **Food Chemistry**, Oxford, v.52, n.4, p. 447-449, 1995.

GARFIELD, F. M. Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories. 3rd ED. AOAC International USA4.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. **Methods in Enzymology**, v.186, p.1-85, 1990.

ISO 5725 (1994) International Organization for Standardization. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 1: General principles and definitions. 1994.

NBR 14597. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Precisão de Métodos analíticos- Determinação da repetibilidade e reprodutibilidade de métodos para ensaios de produtos químicos – estudo intralaboratorial. (2000).

NOGUEIRA, G. C. et al. Otimização da metodologia para determinação simultânea de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico em café utilizando HPLC com coluna de permeação em gel. In: **I SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2000**, Poços de Caldas. I SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. Brasília : EMBRAPA CAFÉ MINASPLAN, 2000. p. 646-649.

PERRONE, D.; DONANGELO, C. M.; FARAH, A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectromtery. **Food Chemistry**, Oxford, v.110, n.4, p. 1030-1035, 2008.

PRIOR, R. L.; XIANLI, W.; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.53, n.10, p.4290-4302, 2005.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Oxford, v.92, n.2, p.235- 254, 2005.

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

TRUGO, L. C.; MARIA, C. A. B.; WERNECK, C. C. Simultaneous determination of total chlorogenic acid and caffeine in coffee by HPLC. **Food Chemistry**, Oxford, v.42, n.1, p. 81-87, 1991.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. (2009c). Atividade Antioxidante, Polifenóis, Cafeína e Melanoidinas de Café Solúvel: Influência das Condições de Processamento e Matéria- Prima.

CAPÍTULO III

Efeito de Variados Graus de Torra nos Compostos Bioativos e na Atividade Antioxidante de Café Arábica e Robusta

Vignoli, J. A.[1], Bassoli, D. G.[1], Benassi, M. T.[2]

1. Companhia Iguaçu de Café Solúvel, BR 369, Km 88, Cornélio Procópio, PR, Brasil
2. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 6, Londrina, PR, Brasil

RESUMO

Este trabalho avaliou a influência do processo de torra na composição química e na AA de cafés arábica e robusta, usando diferentes graus de torra. A AA foi avaliada pelos métodos Folin-Ciocalteau, FRAP e TEAC. Foi monitorado o teor de ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ), cafeína, trigonelina, furfural, 5-HMF (hidroximetilfurfural), e a formação de melanoidinas com a variação das condições do processo. Os resultados foram submetidos à Análise de Componentes Principais. Simultaneamente à redução de 5-ACQ, trigonelina, furfural e 5-HMF ocorreu um aumento no teor de melanoidinas acompanhando a evolução do processo de torra. Apesar da variação na AA ser menos pronunciada que a variação dos teores dos compostos, no geral observou-se que a AA tende a reduzir com o aumento do grau de torra e que este comportamento foi variável com os métodos; observando-se redução nos valores de Folin e ABTS, porém nos resultados da metodologia de FRAP essa variação não foi tão clara. O CP1 (Componente Principal 1) foi caracterizado pela atividade antioxidante, avaliada pelo método de FRAP principalmente, e teores de cafeína, furfural, HMF e trigonelina. O CP2 mostrou-se correlacionado ao 5-ACQ, melanoidinas e AA medida pelo método de Folin e ABTS. Observa-se que o café possui diferentes compostos que contribuem para sua AA e o resultado final será dado pela compensação dos compostos formados e degradados durante o processo de torra.

Palavras- chave: 5-ACQ, trigonelina, furfural, HMF, melanoidinas.

1. INTRODUÇÃO

O café é consumido principalmente devido a seu sabor e aroma agradáveis, às sensações positivas por ele causadas, além de seus efeitos fisiológicos (MAPA, 2008). Comparativamente a outras bebidas, o café destaca-se pelo potencial antioxidante: foi encontrada para café solúvel e espresso uma atividade antioxidante maior que a do vinho tinto e do chá verde (PELLEGRINI et al., 2003).

O café é uma rica fonte de fenólicos, principalmente ácidos clorogênicos e seus produtos de degradação (ácidos caféico, ferúlico e cumárico). Um dos isômeros dos ácidos clorogênicos, ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) tem sido citado como um eficiente antioxidante *in vitro* e *ex vivo* (PULIDO; HERNÁNDEZ-GARCÍA; SAURA-CALIXTO, 2003). Porém, somente uma porcentagem da capacidade antioxidante encontrada no café é atribuída aos ácidos clorogênicos. A presença de outros componentes com atividade antioxidante como ácidos hidroxicinâmicos, cafeína e trigonelina têm sido estudada (DAGLIA et al., 2004).

No entanto, variações na matéria-prima e processamento afetam essa característica. As duas espécies de café de maior valor econômico são *Coffea arabica* e *Coffea canephora* variedade robusta. Bebidas originadas de grãos 100% arábica são mais aceitas pelos consumidores, pela melhor qualidade sensorial comparativamente ao robusta (CNC, 2008). Daglia et al. (2000), estudando bebidas de diferentes grãos, relatam que *Coffea canephora* possui maior capacidade antioxidante que *Coffea arabica.*

O processo de torra conduz a mundanças na composição química e atividade biológica do café: enquanto os compostos fenólicos naturais podem ser perdidos outros compostos antioxidantes, tais como produtos de reação de Maillard, são formados (CZERNY; MAYER; GROSCH, 1999). Del Castilho, Ames e Gordon (2002) descrevem um decréscimo na atividade antioxidante dos grãos com o aumento do grau de torra, associado principalmente à degradação de ácido clorogênico. Por outro lado, o processo de torra também pode formar compostos como as melanoidinas, já relatados como responsáveis pela AA de frações com alto peso molecular isoladas de café torrado (DAGLIA et al., 2000; DELGADO-ANDRADE et al., 2005). Em adição, alguns compostos voláteis heterocíclicos também foram descritos como potencialmente antioxidantes (YANAGIMOTO et al., 2004). Hidroximetilfurfural foi estudado por sua capacidade antioxidante e mostrou uma atividade comparável aos compostos 2,6-dibutil-4-metilfenol e α-tocoferol (SHINGHARA et al., 1998).

Diversas técnicas são utilizadas para caracterizar a capacidade antioxidante. Entretanto, não há nenhum método universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser

medida precisamente e quantitativamente (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). O potencial antioxidante do café vem sendo avaliado por diferentes métodos dentre eles FRAP, ABTS e determinação de fenólicos totais (BORRELI et al., 2002; SÁNCHEZ-GONZALEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; SAURA-CALIXTO, 2005).

Apesar de muitos estudos envolvendo a atividade antioxidante do café torrado, pouco é descrito sobre a relação entre essa atividade biológica e as variações na composição do produto considerando os compostos antioxidantes que são formados e/ou destruídos em diferentes fases do processo de torra. Outra consideração interessante, é que os métodos aqui utilizados para medida da AA apresentam mecanismos de reação diferenciados, podendo assim avaliar o poder antioxidante de diferentes compostos. Assim este trabalho acompanhou os principais compostos descritos como antioxidantes (5-ACQ, cafeína, trigonelina e melanoidinas, além de furfural e 5-HMF, compostos intermediários da reação de Maillard) durante o processo de torra de cafés arábica e robusta, bem como a medida da atividade antioxidante dos produtos por diferentes metodologias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Amostras

As amostras foram fabricadas pela Companhia Iguaçu de Café Solúvel (Cornélio Procópio-PR, Brasil) de maneira a apresentarem diferentes matérias-primas e graus de torra. Grãos de *Coffea arabica* (A) e *Coffea canephora* (R) foram torrados em torrador piloto Rayar (Brasil), com o tempo de processo variando de 7 a 10 minutos, e temperatura de 215 a 225°C, para obtenção de 12 amostras por espécie numa faixa de cor entre 80 e 25 IR, com intervalo de 5 IR entre elas. Esse sistema de avaliação de cor (IR) utiliza discos padronizados, semelhante ao Sistema de Classificação Agtron (SCAA, 1995), onde a coloração do café é comparada com discos padrão, atribuindo a coloração do disco correspondente. O processo de torra foi realizado em triplicata. As amostras foram posteriormente moídas a granulometria de 0,35mm e caracterizadas quanto a cor no sistema CIELAB (luminosidade, L*, e tonalidade cromática, H*) empregando-se um colorímetro Byk Gardner GmbH (Alemanha), com geometria 45/0 e iluminante D65 (Tabela 1).

Para caracterização da atividade antioxidante e a análise dos compostos por CLAE, as amostras foram extraídas dissolvendo-se em 50mL de água à 95°C mantendo em agitação

por 5 minutos com posterior filtração em papel de filtro Whatman n. 4. Uma alíquota do mesmo foi liofilizada para determinação de sua concentração, e os resultados das metodologias foram avaliados considerando-se o teor de sólidos solúveis. A concentração de preparo foi adequada para cada metodologia. Todas as amostras foram preparadas em duplicata, e as leituras foram realizadas em triplicata.

Tabela 1. Valores correspondentes de cores IR em luminosidade (L*) e tonalidade cromática (H*) para cafés torrados e moídos das espécies arábica e robusta[1].

	ROBUSTA		ARÁBICA	
IR	**L***	**H***	**L***	**H***
25	14 ± 1	53 ± 2	12 ± 1	50 ± 3
30	16 ± 1	54 ± 2	20 ± 2	52 ± 2
35	19 ± 1	55 ± 1	16 ± 1	53 ± 1
40	21 ± 1	57 ± 1	20 ± 2	58 ± 0
45	22 ± 1	57 ± 1	21 ± 1	55 ± 1
50	24 ± 1	58 ± 0	25 ± 2	57 ± 2
55	25 ± 1	59 ± 2	24 ± 1	58 ± 0
60	27 ± 1	62 ± 1	27 ± 1	60 ± 1
65	31 ± 1	62 ± 1	28 ± 1	61 ± 1
70	32 ± 3	63 ± 1	30 ± 0	61 ± 0
75	33 ± 1	63 ± 0	30 ± 1	62 ± 0
80	33 ± 1	63 ± 1	31 ± 2	62 ± 1

[1] média e desvio padrão de 9 valores (3 repetições de processo, triplicata de análise)

Reagentes e equipamentos

Padrões de ácido-5-cafeolquínico, cafeína, trigonelina, furfural, 5-HMF, ácido gálico grau cromatográfico, foram obtidos da Sigma Aldrich- (EUA). Ácido tiobarbitúrico; ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico); DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foram obtidos da Sigma Chemical CO. (EUA). Trolox (6-hidroxi-. 2,5,7,8-tetrametilchroman-2- ácido carboxílico) e TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil-s-triazina) foram obtidos da Fluka/ Sigma-Aldrich (Dinamarca). Folin-Ciocalteau, ácido acético e acetonitrila foram obtidos da Merck (Alemanha).

Para obtenção de melanoidinas, foram utilizadas membranas de diálise Spectra/Por (EUA) com limites de exclusão de 12-14KDa.

Utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis modelo UV mini-1240 (Shimadzu, Japão) e um cromatógrafo a líquido Dionex (Alemanha) composto por bomba gradiente P680, forno para coluna TCC-100, amostrador automático (ASI-100) e detector de Arranjo de Diodos (PDA-100). O sistema está acoplado a um computador com o software Chromeleon v. 6.6, para processamento dos dados.

2.2. Métodos

2.2.1. Avaliação da Atividade Antioxidante

Metodologia ABTS (TEAC)

A capacidade antioxidante das soluções de café frente ao radical livre $ABTS^{+\bullet}$ foi realizada de acordo com Sánchez-Gonzalez; Jiménez-Escrig; Saura-Calixto (2005). As amostras foram preparadas na concentração 15mg/mL, resultando num filtrado com concentração 4,33mg/mL de sólidos solúveis. O cátion $ABTS^{+\bullet}$ foi produzido reagindo 7mM da solução estoque ABTS com 2.45 mM de persulfato de potássio. A mistura permaneceu em frasco escuro em temperatura ambiente por 12-16 horas antes do uso. Esta solução foi então diluída com tampão salino fosfato (pH 7.4) para uma absorvância de 0.7 a 730 nm. Após a adição de 10 µL de amostra ou padrão Trolox para 4mL da solução $ABTS^{+\bullet}$ diluída, as leituras a 730 nm, foram realizadas após 6 minutos de reação. Soluções de etanol com concentrações conhecidas de Trolox foram usadas para calibração (2,5; 5,0; 7,5; 12,5 e 20,0 µMol/L). Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) em µMol/L Trolox/$\mu g.mL^{-1}$ amostra.

Metodologia FRAP

O poder de redução da bebida foi avaliado de acordo com Sánchez-Gonzalez; Jiménez-Escrig; Saura-Calixto (2005).

As amostras foram preparadas na concentração de 1,5 mg/mL. O filtrado resultante deste preparo apresentava uma concentração de 0,4 mg/mL. O reagente de FRAP foi preparado pela reação de 2,5 mL de uma solução 10 mM TPTZ em HCl 40mM; adicionados a 2,5 mL de uma solução de $FeCl_3.6H_2O$ 20 mM e 25 mL de tampão acetato 0.3 mM, pH 3.6. A solução foi incubada à 37°C por 30 minutos.

Para a avaliação da capacidade antioxidante 900 µL do reagente FRAP preparado previamente, foi adicionado a 90 µL de água destilada e 10 µL da amostra ou padrão. As

leituras foram realizadas a 595 nm após 30 minutos à 37°C. Soluções nas concentrações de 4,5; 7,5; 10,5; 12,0 e 18,0 µMol/L de Trolox foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como µmol/L de Trolox/µg.ml^{-1} de café.

Metodologia de Folin-Ciocalteau

Para determinação de fenólicos totais, a amostra de café foi preparada a 3 mg/mL. Uma alíquota do filtrado (100 µL) com concentração 0,83 mg/mL de sólidos solúveis foi adicionada a 7,5 mL de água destilada e 300 µL do reagente de Folin-Ciocalteau 0,9N. Após agitação e mistura, foi acrescentado 1mL de solução Na_2CO_3 20% e 1,1mL de água destilada. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora para leitura a 765 nm (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUCIA-RAVENTOS, 1999). Na curva de calibração, utilizou-se padrão de ácido gálico nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 e 7,0 mMol/L. Os resultados foram expressos como mMol/L de ácido gálico/mg.mL^{-1} amostra.

2.2.2. Determinação de 5-ACQ, cafeína, trigonelina, furfural e HMF

Foi utilizada uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação simultânea de cafeína , 5-ACQ, trigonelina, furfural e HMF adaptada de ALVES et al. (2006). Utilizou-se coluna Spherisorb ODS2 (Waters, EUA), de 4,6 x 250 mm, partículas 5µm. Para eluição dos compostos utilizou-se um gradiente de ácido acético 5% (A) e acetonitrila (B) como segue: 0-5 min: 4% B; 5-10 min: 10% B; 10- 30 min: 10% B; 30-40 min: 0% B; 40-50 min: 4% B, com vazão a 0,7mL/minuto. A detecção foi feita a 272nm para cafeína, furfural e HMF e 320 nm para 5-ACQ. A quantificação foi realizada por padronização externa, utilizando uma curva de calibração com 5 pontos em triplicata. 5-ACQ foi avaliado na faixa de 5 a 30 µg/mL, cafeína de 10 a 50 µg/mL, trigonelina de 15 a 50µg/mL, hidroximetilfurfural de 0,5 a 8 µg/mL e furfural de 0,05 a 1µg/mL. Após preparo, conforme descrito anteriormente, as amostras foram filtradas em 0,22µm e diretamente injetadas no sistema cromatográfico.

2.2.3. Determinação de melanoidinas

Foi utilizado um processo de separação em membranas de diálise com limites de exclusão de 12-14KDa, descrito por Bekedam et al. (2006), com algumas modificações. As amostras selecionadas (30 g) foram adicionadas a 200 mL de água fervente, filtradas em papel de filtro Mellita e a concentração de sólidos solúveis do filtrado foi determinada. O filtrado

(30 mL) foi transferido para uma membrana de diálise com limite de exclusão de 12-14 KDa e esta foi colocada em um béquer com 400 mL de água destilada, sob agitação. As trocas de água do recipiente foram realizadas a cada 8 horas, até que não mais fosse observada cor na água externa. O volume total do material retido na membrana foi determinado e uma alíquota deste foi liofilizada. Assim, determinou-se a porcentagem de material com peso molecular superior a 12-14 KDa, considerada aqui como melanoidina, em relação à massa original de sólidos solúveis. Essa fração foi expressa como g de melanoidinas/100g de sólidos solúveis da amostra original. Para determinação de melanoidinas foram selecionadas 5 amostras de café arábica e 5 de café robusta dentro da faixa de estudo (25, 40, 55, 65 e 80 IR). As análises foram realizadas em duplicata.

2.2.4. Análise Estatística

Para avaliação estatística dos resultados de atividade antioxidante e da composição da amostra foram empregadas Análise de Componentes Principais pelo procedimento "Multivariate Exploratory Techniques" – "Principal Componentes & Classification Analysis", do programa Statistica 7.1 (STATSOFT, 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do grau de torra nos compostos bioativos de cafés arábica e robusta

Amostras de cafés arábica e robusta, torradas numa faixa de cores de clara (80 IR, L* de 31 a 33) a escura (25 IR, L* de 12 a 14) (Tabela 1), foram submetidas à análise de composição química e AA. A Figura 1 apresenta o comportamento dos compostos bioativos nas duas espécies em diferentes graus de torra. O café arábica apresentou, em todos os graus de torra, teores superiores ao café robusta de trigonelina, furfural, HMF e 5-ACQ. Para café robusta observou-se teores superiores de cafeína. Cafés das duas espécies apresentaram, comparando-se o mesmo grau de torra, teores similares de melanoidinas. Pode-se observar que para todos os componentes estudados com exceção de cafeína, que é termoestável, e melanoidina, formada no processo, os teores dos compostos apresentaram uma redução com o aumento do grau de torra de 80 IR a 25 IR (Figura 1).

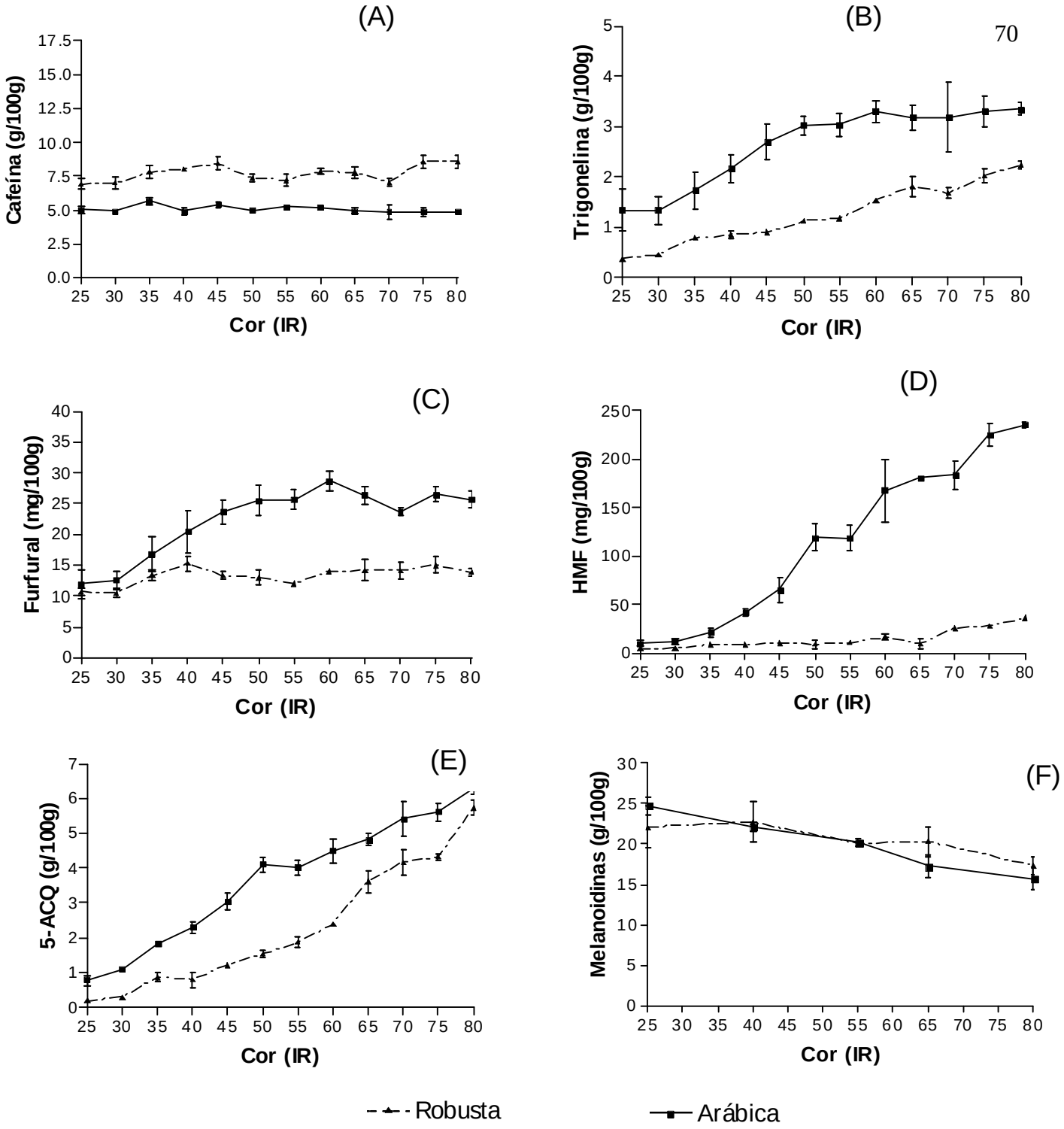


Figura 1. Teores de cafeína (A), trigonelina (B), furfural (C), hidroximetilfurfural (D), 5-ACQ (E) e melanoidinas (F) nas espécies arábica e robusta ao longo do processo de torra.
*valores representados pela média de três torras (9 resultados: 3 torras, 3 repetições de análise) e desvio padrão entre processos.

Para cafeína foram observados valores médios de 4,70, para café arábica e 7,20 g/100g para café robusta (Figura 1 B). A literatura relata que os teores de cafeína variam de acordo com a espécie do grão: cafés provenientes de grãos robusta apresentam teores maiores de cafeína quando comparados aos grãos de café arábica, e perdas pouco expressivas durante a torra, tendo em vista a estabilidade térmica do composto (MONTEIRO; TRUGO, 2005; DIAS, 2005).

Os teores de trigonelina variaram na faixa de 3,3 a 0,4 g/100g para café arábica e de 2,2 a 0,2g/100g para robusta (Figura 1B), com redução média de 89 % com o processo de torra.. O teor de trigonelina presente em café torrado depende do binômio tempo e temperatura de torra uma vez que, durante o processo, a trigonelina é rapidamente degradada, formando voláteis, como as piridinas, e N-metilpirrol e ácido nicotínico (TRUGO, 1984; MONTEIRO; TRUGO, 2005).

Para furfural foram observados teores de 0,01g/100g para robusta e 0,03 a 0,01g/100g para arábica. HMF apresentou teores de 0,23 a 0,00 g/100g para arábica e 0,04 a 0,00 g/100g para robusta. (Figuras 1C e 1D). Esses compostos também sofreram redução expressiva (67% para furfural e 100% para HMF) à medida que o processo de torra se tornou mais severo. Interessante observar que apesar de nas torras claras o teor dos compostos ser bastante superior em café arábica, nas torras escuras os teores nas duas espécies ficam similares. A diferença inicial entre os teores nas espécies é mais expressiva para o HMF. Estes resultados estão de acordo com Murkovic e Bornik (2007), que acompanharam a formação de HMF em cafés arábica e robusta, observando um teor máximo no início da torra, seguido de rápida decomposição, com o composto atingindo níveis similares em ambos cafés. HMF é formado pela desidratação de levulose (SMITH, 1963) e no aquecimento de serina e treonina com sacarose (BALTES; BOCHMANN, 1987). A formação de HMF paralela à degradação de sacarose durante o processo de torra do café é iniciada a 170°C e atinge o máximo a 230°C, ocorrendo uma rápida decomposição a temperaturas superiores (SILWAR; LULLMANN, 1963). Furfural é formado também pela decomposição de pentosanas, como arabinose, (SMITH, 1963) e pela degradação térmica de glicose (HEYNS et al., 1966, FAGERSON, 1969), cisteína e xilose (LEDL e SEVERIN, 1973; SHELDON et al., 1986). Mottram (1991) mostrou que também é formado de compostos de Amadori de uma pentose e um intermediário 3-deoxiosona.

Para 5-ACQ, os teores variaram de 5,96 a 0,22, para arábica, e 6,19 a 0,13g/100g para robusta (Figura 1E). A literatura relata degradação progressiva de ácidos clorogênicos com a torra, contribuindo para a formação do aroma e sabor final da bebida e outros produtos do café torrado; podendo ocorrer perdas de até 90% do conteúdo inicial de ácidos clorogênicos após torra severa dos grãos (TRUGO; MACRAE, 1986). Aproximadamente metade do conteúdo total de ácidos clorogênicos degradados na torrefação pode ser encontrada na fração de pigmentos, na forma de ácido quínico livre e como compostos fenólicos de baixa massa molecular (TRUGO; DE MARIA; WERNECK, 1991).

Simultaneamente à redução de 5-ACQ, trigonelina, furfural e 5-HMF ocorreu um aumento no teor de melanoidinas acompanhando a evolução do processo de torra: de 14,40 a 23,60 para arábica e 18,50 a 27,30 para robusta (Figura 1F). O comportamento foi similar para as duas espécies de café. Durante a torra, a baixa atividade de água e alta temperatura favorecem o desenvolvimento da reação de Maillard, como a formação de produtos da reação entre proteínas e carboidratos. É também provável que compostos fenólicos participem nesta reação, tornando-se parte das melanoidinas do café (NUNES; COIMBRA, 2001; BEKEDAM et al., 2008 a). De acordo com Nicoli et al. (1997) e Daglia et al. (2004), as melanoidinas são um dos principais componentes da bebida do café torrado, contribuindo com aproximadamente 25% da matéria seca. Estes valores estão próximos aos resultados encontrados neste trabalho para produtos com torras escuras (Figura 1F).

3.2. Avaliação da Atividade Antioxidante

As amostras de café arábica e robusta com diferentes graus de torra, foram avaliadas quanto à atividade antioxidante pela medida de fenólicos totais (Folin Ciocalteau), através da capacidade em reagir com o cátion $ABTS^{\cdot+}$e pelo poder redutor medido pelo método FRAP (Figura 2).

Apesar da variação na AA ser menos pronunciada que a variação dos teores dos compostos, no geral é possível observar que a AA tende a reduzir com o aumento do grau de torra. Além disso, o comportamento é variável com os métodos: observa-se redução nos valores de Folin e ABTS (1,66 para 1,1mMol/L ácido gálico/$\mu g.mL^{-1}$; 1,93 a 1,45 µMol/L Trolox/$\mu g.mL^{-1}$, respectivamente, considerando a espécie robusta) provavelmente pela perda dos fenóis que ocorre com o avanço da torra. Para a espécie arábica, comportamento semelhante foi apresentado. Porém nos resultados da metodologia de FRAP essa variação não foi tão clara (variação de 0,66 a 0,64 para robusta e de 0,55 para 0,50 µMol/L Trolox/$\mu g.mL^{-1}$ para arábica). Este comportamento diferenciado provavelmente ocorreu pelo mecanismo diferenciado de FRAP na avaliação da AA, uma vez que este é limitado à medição de compostos que promovam a transferência de elétrons. Folin e ABTS avaliam tanto a transferência de elétrons como de átomos de H (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

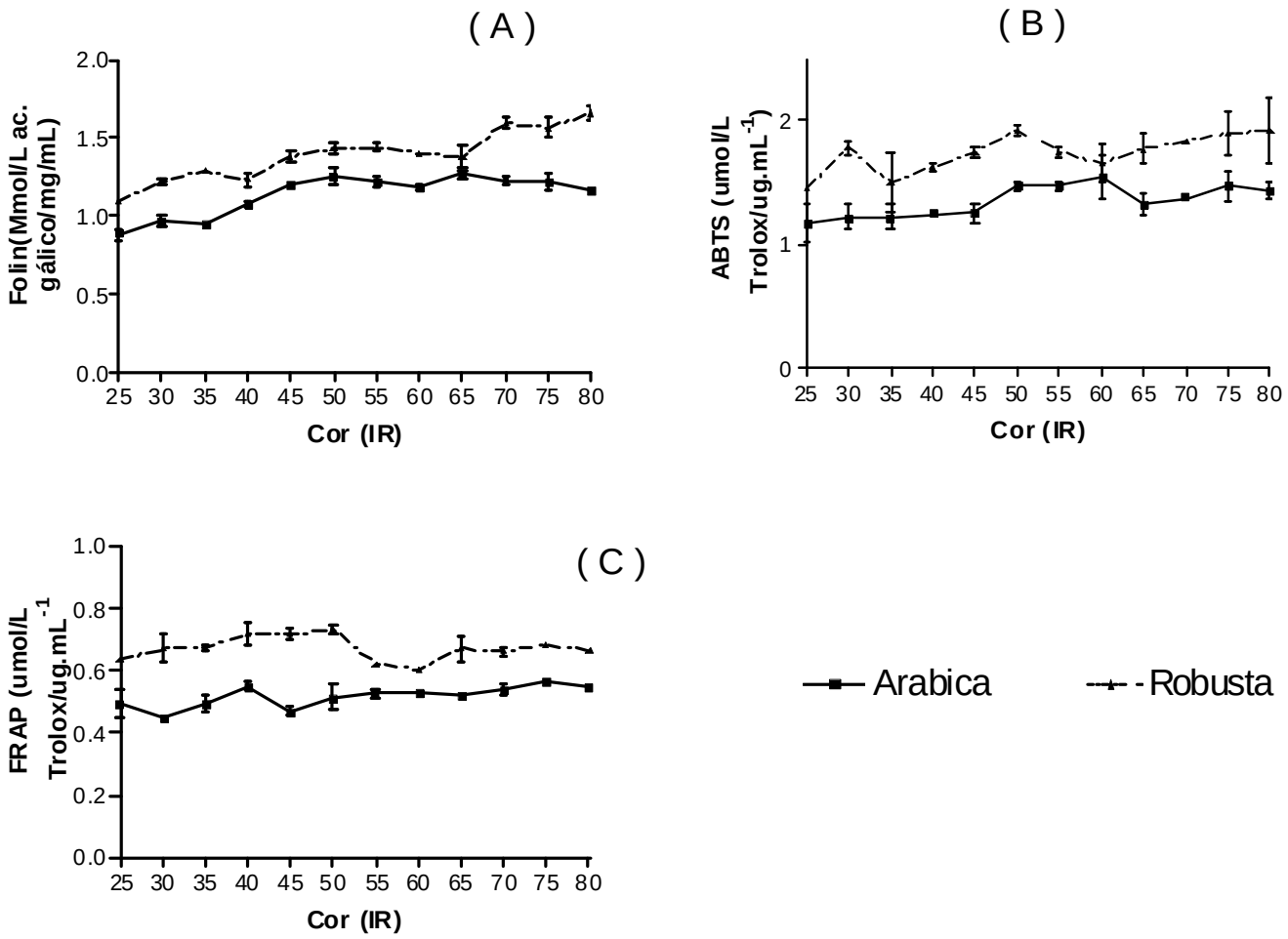


Figura 2. Atividade antioxidante, avaliada pelos métodos de Folin (A), ABTS (B) e FRAP (C), em café arábica e robusta ao longo da torra.

Valores representados pela média de 3 repetições de processo ± desvio padrão

Resultados semelhantes foram encontrados por Sacchetti et al. (2008) avaliando o efeito do grau de torra na atividade de seqüestro de radicais ABTS pela bebida do torrado. Bebidas de torra média mostraram um aumento na atividade de seqüestro dos radicais em comparação com o café verde devido a um aumento na AA da porção não fenólica. Entretanto, quando torras escuras foram avaliadas esta atividade foi reduzida pela perda da fração fenólica, que não teve sua AA equilibrada pelo aumento de AA da porção não fenólica.

A análise de Componentes Principais foi utilizada para avaliar a relação entre a atividade antioxidante e composição química dos diferentes produtos. Foram analisadas as amostras para as quais havia sido determinado o teor de melanoidinas. Os dois primeiros componentes principais explicaram 93% da variância total (Figura 3A e 3B).

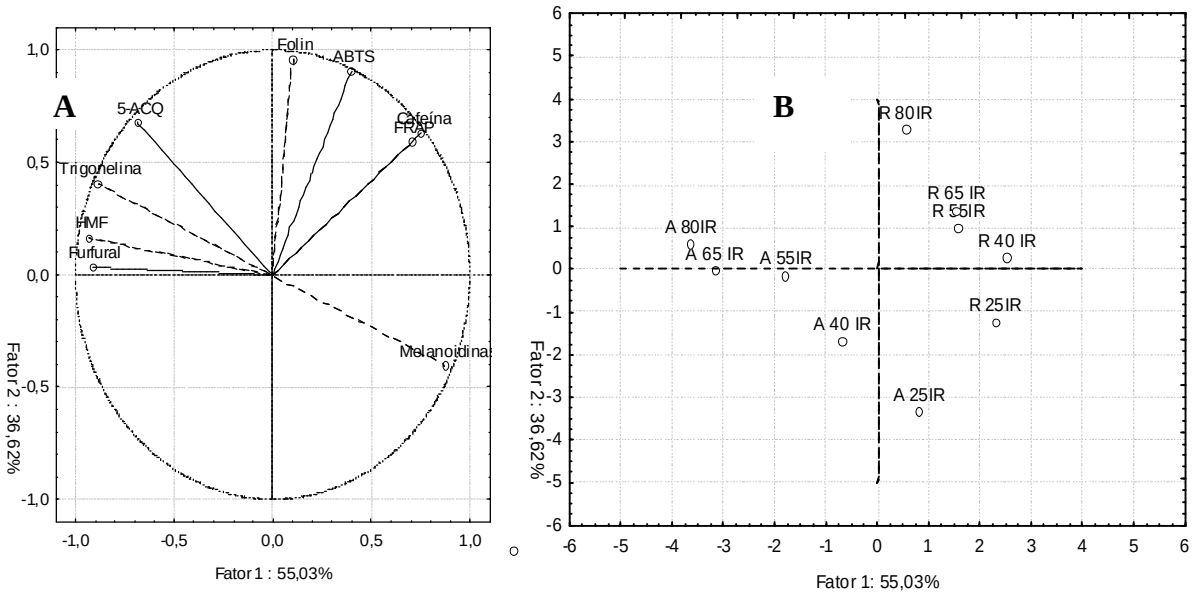


Figura 3. Análise de componentes principais a partir da atividade antioxidante e compostos químicos: projeção das variáveis (A) e gráfico de amostras (B). Espécies: arábica (A) e robusta (R); IR (Índice de Reflectância); Grau de torra de 80 (claro) a 25IR (escuro).

Observou-se que o CP1 foi caracterizado principalmente pelo teor de melanoidinas, furfural, HMF e trigonelina (Figura 3A). O CP2 mostrou-se correlacionado as medidas de AA pelo método de Folin, ABTS e FRAP. Os teores de 5-ACQ e cafeína tiveram influência nos dois componentes. Uma alta correlação entre Folin e ABTS foi encontrada (r: 0,91), porém entre Folin e FRAP a correlação foi moderada (r: 0,57). O método de Folin determina o teor de polifenóis totais, mas apresenta como mecanismo básico uma reação de oxidação/redução, podendo ser considerado na avaliação da atividade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). É provável que os compostos medidos por Folin estivessem também envolvidos com o seqüestro do radical ABTS e em menor extensão com o poder redutor da bebida, avaliado pelo método de FRAP. Dentre os compostos químicos, cafeína foi o único que apresentou alta correlação com os métodos, apresentando r de 0,87; 0,93 e 0,67 para ABTS, FRAP e Folin, respectivamente.

O gráfico das amostras mostra discriminação pela AA e/ou por torra (Figura 3B). Amostras de cor escura (arábica e robusta) foram alocadas na parte inferior da figura e separam-se de amostras de cor clara que apresentavam maior teor de 5-ACQ e menor concentração de melanoidinas. Os cafés arábica foram alocados mais à esquerda no gráfico de amostras, discriminando-se dos cafés robusta que estavam associados a um maior teor de cafeína e maior AA. Assim, considerando a influência da matéria-prima sobre a AA, podemos

observar que de maneira geral, amostras da espécie *C. canephora* mostraram uma maior AA que as de *C. arabica* (Figura 2, Figura 3-B). Resultados semelhantes já foram registrados em outros estudos com café torrado (DAGLIA et al., 2004), e estes têm sido usualmente atribuídos ao maior teor de ácidos clorogênicos no café Robusta. Contudo, observando os dados apresentados na Figura 1, é notável que o isômero 5-ACQ foi encontrado em concentrações semelhantes ou em maior abundância para o café arábica em relação ao robusta. Conforme dito anteriormente, a matriz de robusta, apesar de conter mais ácidos clorogênicos no grão verde, em torno de 10% para robusta contra 8% para arábica (LELOUP, 2006), parece favorecer a perda de alguns compostos com a evolução do processo de torra (DIAS, 2005). Assim, a capacidade antioxidante mais elevada observada para cafés robusta, foi atribuída ao maior teor de cafeína nesta espécie uma vez que estes se correlacionaram positivamente com as AA avaliadas. López-Galilea; De Peña e Cid (2007), em estudo sobre a influência do preparo da bebida, também relatam uma correlação significativa entre cafeína e a atividade antioxidante avaliada por DPPH (0,826) e potencial redox (-0,844). Parras et al. (2007) avaliaram a atividade antioxidante de café de diferentes origens, com diferentes preparos de bebida (espresso, italiano e filtrado) e puderam observar maiores valores de TEAC para produtos com cafeína quando comparado aos seus equivalentes decafeinados. Vignoli; Bassoli e Benassi (2009c), em estudo da AA de café solúvel, observaram maior potencial antioxidante da espécie robusta, associando essa diferença ao teor de cafeína.

Além da cafeína, dentre os demais compostos identificados, somente 5-ACQ apresentou alguma correlação com os resultados de AA, avaliada pelo método de Folin (r:0,50) (Figura 3A). Correlação de AA e os demais compostos não foi observada. Pode-se então inferir que na matriz do café torrado as correlações de AA com compostos específicos não se evidenciam devido à degradação e formação simultâneas de diferentes componentes com pontencial antioxidante ao longo da torra. Este fato pode ser bem evidenciado observando a correlação negativa entre 5-ACQ e melanoidinas. Como ambos os compostos contribuem para a AA do produto, alterações nesse parâmetro, são menos evidentes que as variações de composição química com o processo de torra. Em estudo semelhante com café solúvel, observou-se que, para a matriz do solúvel, a influência do processo de torra (cores de torra 80, 55 e 25 IR) na AA é ainda menos pronunciada (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2009c). Isto ocorre, provavelmente, pela presença de uma etapa posterior de extração no processo de fabricação, que favorece a presença de melanoidinas no produto final, compensando a perda de polifenóis com a torra.

Na literatura, há pouca concordância sobre a influência da torra na AA. Del Castillo et al. (2002) observaram maior AA na bebida de torra média. Duarte et al. (2005) e Santos et al. (2007) encontraram maior AA para bebidas de torra clara, enquanto Nicoli, Anese e Parpinel (1999) relatam AA mais alta para bebidas de torra média a escura. Além disso, os estudos sobre a AA do café atribuem esta propriedade principalmente aos teores de fenólicos e melanoidinas. (BORRELI et al. (2002); DAGLIA et al. (2004); RUFIAN-HENARES ; MORALES (2007)).

Na faixa de teores de trigonelina, furfural e hidroximetilfurfural encontrados nos cafés, não se observou uma relação com a AA. Fuster et al. (2000) observaram que 5-HMF inibiu oxidação de hexanal, superior a 90%, numa concentração de 500µg/mL. Além da utilização de uma concentração mais alta no estudo, deve-se considerar que o comportamento pode ser diferenciado quando se avalia os mesmos compostos presentes em uma matriz complexa como o café. Em um estudo utilizando padrões, Vignoli; Bassoli e Benassi (2009d) investigaram a AA de compostos presentes no café. Em concordância com os resultados aqui obtidos, para trigonelina, furfural e hidroximetilfurfural não se observou AA, independentemente do método utilizado. 5-ACQ e melanoidinas apresentaram AA nos métodos deoxirribose, FRAP, ABTS, Folin e DPPH. Para cafeína somente os resultados do método deoxirribose indicaram AA, demonstrando ser um eficiente seqüestrador de radicais hidroxil.

A escolha de diferentes métodos de avaliação de AA permitiu observar que compostos como 5-ACQ e cafeína apresentam diferentes mecanismos de atuação como antioxidantes. Desta forma, a avaliação, por um único método, da AA pode não representar de forma adequada à capacidade antioxidante de um produto.

4. CONCLUSÃO

A AA final do café torrado resulta da contribuição de diferentes compostos. Além dos compostos fenólicos presentes no café, parcialmente destruídos com o processo de torra outros compostos antioxidantes, como as melanoidinas, podem se formar mantendo ou aumentando a AA. Porém com o aumento da intensidade de torra, a maior destruição dos polifenóis pode não ser mais compensada pela formação de outros compostos. Assim, cafés originados de torras claras mostraram maior capacidade antioxidante devido ao maior conteúdo de polifenóis. Devido a AA da cafeína, cafés robusta apresentaram maior AA que os cafés arábica.

A bebida do café torrado, originado de diferentes intensidades de torra, apresentou um expressivo potencial antioxidante, e este foi influenciado pelas condições de torra e espécie.

5. REFERÊNCIAS

ALVES, S. T. et al. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 29, n.6, p. 1164-1168, 2006.

BALTES, W.; BOCHMANN, G. II. MS Identification of furans and furanones from the reaction of serine and threonine with sucrose under the conditions of coffee roasting. **Z. Lebensm**. **Unters. Forsch.** v. 184, p. 179-86, 1987.

BEKEDAM, E. K. et al. High Molecular Weight Melanoidins from Coffee Brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,Columbus, v. 54, n. 20, p. 7658 – 7666, 2006.

BEKEDAM, E. K. et al. (a). Incorporation of Chlorogenic Acids in Coffee Brew Melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.56, n.6, p. 2055-2063, 2008.

BORRELI, R. C. et al. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v.50, n.22, p. 6527-6533, 2002.

CZERNY M.; MAYER, F.; GROSCH, W**.** Sensory study on the character impact odorants of roasted Arabica coffee**. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.47, n.2, p.695-699, 1999.

DAGLIA, M. et al. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Columbus**,** v.48, n.5, p. 1449-1454, 2000.

DAGLIA, M. et al. In vitro and ex vivo antihydroxil radical activity of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.52, n.6, p. 1700-1704, 2004.

DEL CASTILLO, M. D.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.50, n.13, p.3698- 3703, 2002.

DELGADO-ANDRADE, C.; RUFIÁN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Columbus, v.53, n.20, p.7832-7836, 2005.

DIAS, R. C. E. (2005). Discriminação de espécies de café (Coffea arábica e Coffea canephora) em diferentes graus de torra. Tese de Mestrado. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, 106p. Disponível em: <http://bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000108937> Acesso em: 09 mai 2008.

DUARTE, S. M. S. et al. Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.2, p.387-393, 2005.

FAGERSON, I. S. Thermal degradation of Carbohydrates. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Columbus, v.17, n.4, p. 747-50, 1969.

FUSTER, M. D. et al. Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.48, n.11, p.5600- 5603, 2000.

HEYNS, K.; STUTE, R.; PAULSEN, H. Bräunungsreaktionen und Fragmentierungen von Kohlenhydraten. Dieflüchtigen Abbauprodukte der Pyrolyse von D- glucose. **Carbohydrate Research**, v.2, p.132-49, 1966.

LEDL, F.; SEVERIN, T. Thermische Zersetzung von Cystein und xylose in Tributirin. **Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm**., v.2, p.155-160, 1973.

LELOUP, V. Evaluation of the nutritive value of soluble coffee. **In Proceedings of Asic**, 21st Colloque, Montpellier, France, p. 80-87, 2006.

LÓPEZ-GALILEA, I.; DE PEÑA, M.P.; CID, C. Correlation of Selected Constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: Influence of the brewing procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.55, n.15, p.6110-6117, 2007.

MAPA, 2008. (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO) – Tendências do consumo de café em 2008. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/. Acesso em janeiro de 2009.

MONTEIRO, M.C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras de café torrado. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.4, p.623-641, 2005.

MOTTRAM, D. S. Meat Volatile Compounds. **In Foods and Beverages**. H. Maarse Ed., Marcel Dekker, New York, 107-177, 1991.

MURKOVIC, M.; BORNIK, M. A. Formation of 5-hydroxymethil-2-furfural (HMF) and 5-hydroxymethyl-2-furoic acid during roasting of coffee. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.51, n.4, p.391-394, 2007.

NICOLI, M. C. et al. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. **Lebensmittel-Wissenschat und Technologie**, London, v.30, n.3, p.292-297, 1997.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruits and vegetables. **Trends Food Science Technology**, v.10, n.3, p.94-100, 1999.

NUNES, M. F., COIMBRA, M. A. Chemical characterization of the high molecular weight material extracted with hot water from green and roasted Arabica coffee. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v.49, n.4, p.1773-1782, 2001.

PARRAS, P. et al. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chemistry,** Oxford, v.102, n.3, p.582-592, 2007.

PELLEGRINI, N. et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy by three different in vitro assays. **Journal of Nutrition**, v.133, n.9, p. 2812-2819, 2003.

PRIOR, R. L.; XIANLI, W.; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.53, n.10, p.4290-4302, 2005.

PULIDO; R.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, M.; SAURA-CALIXTO, F. Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the spanish diet. **European Journal of Clinical Nutrition,** 57, p.1275-1282, 2003.

RUFIÁN-HENARES, J.; MORALES, F. Effect of in vitro enzymatic digestion on antioxidant activity of coffee melanoidins and fractions. . **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v.55, n.24, p.10016-10021, 2007.

SACCHETTI, G. et al. Effect of Roasting Degree, Equivalent Thermal Effect and Coffee Type on the Scavenging Activity of Coffee Brews and Their Phenolic Fraction. **Journal of Food Engineering,** v.90, n.1, p.74-80, 2009.

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

SANTOS, M. H.et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante de café (Coffea arábica). **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.3, p.604-610, 2007.

SCAA, 1995. Specialty Coffee Association of America. Disponível em: http://www.scaa.org. Acesso em janeiro de 2009.

SHELDON, S.A.; RUSSEL, G. F.; SHIBAMOTO, T. **Photochemical and thermal activation of model Maillard reaction systems.** 3rd Int. symp. Maillard React., Tokio, Japan, July, 1985, Fujimaka et al. Eds, Kodansa Ltd & Elsevier, pp. 145-54, 1986.

SHINGHARA, A.; MACKU, C.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activity of brewed coffee extracts. **In Functional Foods for Disease Prevention II: Medicinal Plants and Other Foods**, ACS Symposium Series 701; Shibamoto, T.; Terao, J.; Osawa, T. Eds., American Chemical Society: Washington, DC, p. 101-109, 1998.

SILWAR R.; LÜLLMANN, C. Investigation of aroma formation in robusta coffee during roasting. **Café, Cacao, Thé,** v. 37, p.145-51, 1993.

SINGLETON V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUCIA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and others oxidation substrates and antioxidants by mean Folin- Ciocalteau reagent. **Methods in Enzymoloy,** v.299, p.152-179, 1999.

SMITH, R. F. The determination of caffeine in coffee and in coffee mixtures. 1st Int. Coll. Chem. Coffee (Paris, 20-22.05.1963), **Café, Cacao, Thé**, v.3, p.223-30, 1963.

STATSOFT, INC (2005). STATISTICA – Data analysis software system. Versão 7.1.

TRUGO L. C., MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. **Analyst**, v. 109, n.3, p.263-266, 1984.

TRUGO, L. C. ; MARIA, C. A. B. ; WERNECK, C. C. Simultaneous determination of total chlorogenic acid and caffeine in coffee by HPLC. **Food Chemistry**, Oxford, v.42, n.1, p. 81-87, 1991.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. An Investigation of cofee roasting using high perfomance liquid chromatography. **Food Chemistry**, Oxford, v. 19, p. 1-9, 1986

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. (2009c). Atividade Antioxidante, Polifenóis, Cafeína e Melanoidinas de Café Solúvel: Influência das Condições de Processamento e Matéria- Prima.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. (2009d). Investigação e Avaliação de Constituintes do Café com Atividade Antioxidante.

YANAGIMOTO, K. et al. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 52, n.3, p.592-596, 2004.

CAPÍTULO IV

Atividade Antioxidante, Polifenóis, Cafeína e Melanoidinas de Café Solúvel: Influência das Condições de Processamento e Matéria- Prima

J. A. Vignoli [1*]; D. G. Bassoli [1]; M. T. Benassi [2]

[1] Companhia Iguaçu de Café Solúvel, BR 369, Km 88, Cornélio Procópio, PR, Brasil

[2] Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 6, Londrina, PR, Brasil

RESUMO

O processo de fabricação de café solúvel começa com a seleção dos grãos, seguindo os processos de torrefação, granulação, extração e secagem. Cafés solúveis liofilizados, produzidos a partir de grãos arábica e robusta, nas torras clara, média e escura com diferentes métodos de extração foram avaliados quanto à atividade antioxidante (AA) pelas técnicas de ABTS, Folin, DPPH e FRAP. Foram também quantificados 5-ACQ, cafeína e melanoidinas. Os dados foram submetidos a Análise de Componentes Principais. Encontrou-se correlação entre a AA avaliada pelos diferentes métodos. A torra levou à degradação de 5-ACQ, acompanhada pela correspondente formação de melanoidinas, assim a AA foi pouco afetada pelo grau de torra. O processo de extração do café solúvel foi mais relevante na definição da AA para produtos com menor grau de torra, principalmente por favorecer a extração de 5-ACQ. O maior teor de cafeína em café Robusta conferiu a produtos elaborados com essa espécie maior AA. Todos os produtos de café solúvel estudados apresentam potencial antioxidante, conferido pela concentração de fenólicos, cafeína e melanoidinas.

Palavras-chave: *Coffea arabica, Coffea Canephora,* grau de torra, extração

1. INTRODUÇÃO

O café é a segunda mercadoria mais importante para a economia mundial depois do petróleo (BORRELI et al., 2002). As espécies mais cultivadas são *Coffea arabica* (arábica) e *Coffea canephora,* (robusta). Apesar de *Coffea canephora* apresentar qualidade sensorial inferior ao arábica, apresenta como vantagem permitir uma alta extração de sólidos solúveis, podendo ser utilizado em misturas e na indústria de café solúvel. Bebidas preparadas a partir do café torrado são consumidas pelos sabor e aroma agradáveis e também por seus efeitos fisiológicos. A opção de consumo por diferentes tipos de bebidas do café está estritamente associada aos hábitos sociais e à cultura dos países. O café solúvel é uma importante modalidade de consumo (45% na Europa Oriental, 53% na Ásia/Pacífico e 79% na Austrália), destacando-se nos países onde o chá é a bebida tradicional (GEA-GROUP COFFEE, 2008). Na cadeia do café brasileiro, a indústria de café solúvel é o principal gerador de receita pela exportação de produto com maior valor agregado: para cada US$ de matéria prima utilizada na indústria, gera-se outro US$ na industrialização (ABICS, 2008).

Atualmente, estudos científicos têm ressaltado os efeitos positivos do café à saúde humana (COUGHLIN, 2006). No geral, os autores relatam que existem poucas evidências de risco a saúde e consideráveis evidências de benefícios para adultos no consumo moderado de café (HIGDON; FREI, 2006). A bebida vem sendo destacada também pela contribuição como fonte de antioxidantes na dieta, atribuída a compostos como cafeína (DEVASAGAYAM et al., 1996; SHI; DALAL, 1991), ácidos clorogênicos (MOREIRA et al., 2005; GÓMEZ-RUIZ, LEAKE; AMES, 2007), ácidos hidroxicinâmicos (GALLARDO; JIMÉNEZ; GARCIA-CONESA, 2006), e produtos de reações de Maillard, como as melanoidinas (BORRELI et al., 2002; DELGADO-ANDRADE, RUFIÁN-HENARES; MORALES, 2005). Verifica-se assim, que a capacidade antioxidante está relacionada tanto à presença de constituintes naturais como a compostos formados no processamento. O potencial antioxidante da bebida de café vem sendo avaliado por diferentes métodos como FRAP, ABTS, DPPH e determinação de fenólicos totais (BORRELI et al., 2002; SÁNCHEZ-GONZALEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; SAURA-CALIXTO, 2005).

O método de FRAP mede a redução férrica de 2,4,6-tripiridil -s- triazina (TPTZ) para um produto colorido. A reação detecta compostos com potencial redox < 0,7V (o potencial redox do Fe^{+3}- TPTZ). Os ensaios utilizando o radical ABTS entre eles o TEAC, são baseados na habilidade dos antioxidantes em seqüestrar o radical de longa vida $ABTS^{\bullet}$. Assemelhando-se a este mecanismo, o ensaio DPPH mede a redução do radical estável DPPH (2,2-diifenil-1-

picrilhidrazil), monitorado pela diminuição da absorvância deste radical a 515nm. Folin-Ciocalteau, utilizado por anos como medida de fenólicos totais, tem sido citado na avaliação da atividade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; BENZIE, 1996).

Comparativamente a outras bebidas, o café destaca-se pelo potencial antioxidante; alguns autores descrevem para café solúvel e espresso uma atividade antioxidante maior que a do vinho tinto e do chá verde (PELLEGRINI et al., 2003). No entanto, variações na composição dos grãos utilizados e processamento afetam essa característica. Daglia et al. (2000), estudando bebidas de diferentes grãos, relatam que *Coffea canephora* possui maior capacidade antioxidante que *Coffea arabica.* Del Castillo, Ames e Gordon (2002) observaram um decréscimo na atividade antioxidante dos grãos com o aumento do grau de torra, associado principalmente à degradação de ácido clorogênico. Por outro lado, o processo de torra também pode formar compostos como as melanoidinas, já relatadas como responsáveis pela AA de frações com alto peso molecular isoladas de café torrado (DAGLIA et al., 2000).

A maioria dos estudos na literatura refere-se à AA do produto torrado. Apesar da grande expressão econômica do café solúvel, pouco é relatado sobre o seu potencial antioxidante e a influência das condições de processamento. Para se tornar solúvel, o café passa por um processo de extração, onde os grãos torrados e moídos são submetidos a sucessivas extrações com água em percoladores, a temperaturas variando de aproximadamente 100 a 180°C. Quimicamente, a extração com água resulta numa solubilização seletiva de sólidos do café. Mecanismos de despolimerização e degradação podem ocorrer durante a extração a altas temperaturas (LELOUP, 2006) e variações no processo podem levar a produtos com diferentes características.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das condições do processamento de café solúvel (torra e método de extração) bem como das matérias-primas (espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora*), sobre a capacidade antioxidante do produto final, relacionando-se a AA medida por diferentes técnicas à composição química.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Amostras

As amostras foram fabricadas pela Companhia Iguaçu de Café Solúvel (Cornélio Procópio-PR, Brasil) de maneira a apresentarem diferentes graus de torra, condições de extração e matéria-prima.

Grãos de café arábica (A) e robusta (R) foram torrados em torrador piloto Rayar, capacidade 80Kg/h, com o tempo de processo variando de 7 a 10 minutos, e temperatura de 215 a 225°C, até obtenção de amostras nas cores de torra clara (L), média (M) e escura (D), correspondentes aos valores médios de L* de 33, 25 e 14, respectivamente. A luminosidade (L*) foi determinada empregando-se um colorímetro (Byk Gardner GmbH, Alemanha), com geometria 45/0 e iluminante D65, fazendo-se a leitura em triplicata. Os cafés foram moídos na granulometria especificada para o processamento posterior (30% de retenção na peneira de 4mm; 60% de retenção na peneira de 2mm e 10% de retenção na peneira de 1mm)

As amostras foram submetidas a dois procedimentos de extração: convencional (1) e com duas correntes de água (2). No processo convencional (1), a água a 180°C foi alimentada no primeiro estágio (coluna com o café mais antigo) seguindo na seqüência e percolando os estágios seguintes, até atingir o café mais novo. No último estágio, o extrato encontra o café recém carregado, do qual extrai parte dos sólidos solúveis em condições que favorecem a preservação do aroma e do sabor. Durante o processo, os sólidos solúveis do extrato aumentam, mas a temperatura diminui, então a última coluna contendo café fresco foi extraída a uma temperatura próxima a 100°C estando o produto sujeito a danos térmicos mínimos. O extrato originado deste processo foi submetido ao processo de liofilização. No processo com duas correntes de água (2), a primeira corrente foi alimentada em estágios selecionados com temperaturas e pressões mais amenas, proporcionando um extrato de melhor qualidade. A segunda corrente de água foi alimentada nos outros estágios com temperatura e pressão maiores, para aumento da solubilização. Uma liga contendo 50% de extrato de cada corrente foi submetida ao processo de liofilização.

Para caracterização da atividade antioxidante, as amostras foram diretamente dissolvidas em água, na concentração adequada para cada metodologia. Todas as amostras foram preparadas em duplicata, e as leituras foram realizadas em triplicata.

Reagentes e equipamentos

Padrões de ácido-5-cafeoilquínico, cafeína, trigonelina, ácido gálico, furfural, hidroximetilfurfural, maltol e guaiacol, grau cromatográfico, foram obtidos da Sigma Aldrich-(EUA). Trolox (6-hidroxi-. 2,5,7,8-tetrametilchroman-2- ácido carboxílico) e TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil-s-triazina) foram obtidos da Fluka/ Sigma-Aldrich (Dinamarca). Folin-Ciocalteau foi obtido da Merck (Alemanha).

Para obtenção de melanoidinas, foi utilizada membrana de diálise Spectra/Por (EUA) com limite de exclusão de 12-14KDa.

Utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis modelo UV mini-1240 (Shimadzu, Japão) e um cromatógrafo à líquido Dionex (Alemanha) composto por bomba gradiente P680, forno para coluna TCC-100, amostrador automático (ASI-100) e detector de Arranjo de Diodos (PDA-100). O sistema está acoplado a um computador com o software Chromeleon versão 6.6 para processamento dos dados.

2.2. Métodos

2.2.1. Metodologias de Determinação da Atividade Antioxidante

Metodologia ABTS (TEAC)

As amostras foram preparadas na concentração 3mg/mL. A capacidade antioxidante das soluções de café frente ao radical livre $ABTS^{+\bullet}$ foi realizada de acordo com Sánchez-Gonzalez, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005). O cátion $ABTS^{+\bullet}$ foi produzido reagindo 7mM da solução estoque ABTS com 2.45 mM de persulfato de potássio. A mistura permaneceu em frasco escuro em temperatura ambiente por 12-16 horas antes do uso. Esta solução foi então diluída com tampão salina fosfato (pH 7.4) para uma absorvância de 0.7 a 730 nm. Após a adição de 10µL de amostra ou padrão Trolox para 4mL da solução $ABTS^{+\bullet}$ diluída, as leituras a 730 nm , foram realizadas após 6 minutos de reação. Soluções de etanol com concentrações conhecidas de Trolox foram usadas para calibração (2,5 ; 5; 7,5; 12,5 e 20 µMol/L). Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC- µMol/L Trolox/$\mu g.mL^{-1}$ amostra).

Metodologia FRAP

As amostras de café foram preparadas na concentração de 0,9mg/mL. O poder de redução da bebida foi avaliado de acordo com Sánchez-Gonzalez, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005). O reagente de FRAP foi preparado pela reação de 2.5 mL de uma solução 10mM TPTZ em HCl 40mM; adicionados a 2.5 mL de uma solução de $FeCl_3.6H_2O$ 20mM e 25 mL de tampão acetato 0.3 mM, pH 3.6. A solução foi incubada à 37°C por 30 minutos. Para a avaliação da capacidade antioxidante, 900µL do reagente FRAP preparado previamente, foi adicionado a 90µL de água destilada e 10 µL da amostra ou padrão. As leituras foram realizadas a 595nm após 30 minutos à 37°C. Soluções nas concentrações de 4,5; 7,5; 10,5; 12,0 e 18,0 µMol/L de Trolox foram utilizadas para calibração.. Os resultados foram expressos como µmol/L de Trolox/$\mu g.mL^{-1}$ de café.

Metodologia DPPH

As amostras de café foram preparadas nas concentrações de 2, 3, 4, 6, 10 e 15mg/mL. A redução do radical DPPH foi determinada pela mudança colorimétrica medida a 517nm conforme descrito em Casagrande et al. (2007). Para medida do seqüestro do radical 10 µl de amostra foram adicionados em uma mistura contendo 1mL de tampão acetato de sódio pH 5,5, 1mL de etanol e 0,5 mL de DPPH 250µM. Após 10 minutos à temperatura ambiente foi realizada leitura a 517nm. Foram realizadas leituras do branco (1mL de tampão acetato + 1,5mL de etanol) e controle positivo (todos os reagentes sem a amostra). O poder antioxidante da bebida foi calculado pela porcentagem de inibição da atividade do radical livre DPPH (IA%) (equação1). A partir das concentrações utilizadas foi possível obter o cálculo do IC50 (concentração de amostra necessária para inibição do radical em 50%).

IA (%) = 100- (Abs da amostra/ Abs do controle)*100 (**equação 1)**

Metodologia de Folin-Ciocalteau

Para determinação de fenólicos totais, 100µL da amostra de café na concentração 1mg/mL foram adicionados a 7,5 mL de água destilada e 300 µL do reagente de Folin-Ciocalteau 0,9N. Após agitação e mistura, foi acrescentado 1mL de solução Na_2CO_3 20% e 1,1mL de água destilada. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora para leitura a 765 nm (SINGLETON, ORTHOFER E LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Na curva de calibração utilizou-se ácido gálico como padrão nas concentrações 0,5; 1; 2; 5 e 7 mMol/L. Os resultados foram expressos como mMol/L de ácido gálico/$mg.mL^{-1}$ amostra.

2.2.2. Determinação dos Compostos Bioativos do Café Solúvel

Determinação de 5-ACQ e cafeína

Foi utilizada uma metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação simultânea de cafeína e 5-ACQ (ALVES et al., 2006). Utilizou-se coluna Spherisorb ODS2 (Waters, EUA), de 4,6 x 250mm, partículas 5µm. Para eluição dos compostos utilizou-se um gradiente de ácido acético 5% (A) e acetonitrila (B) como segue: 0-5 min: 4% B; 5-10 min: 10% B; 10- 30 min: 10% B; 30-40 min: 0% B; 40-50 min: 4% B, com vazão de 0,7mL/minuto. A detecção foi feita a 272nm para cafeína e 320 nm para 5-ACQ. A quantificação foi realizada por padronização externa, utilizando uma curva de calibração com 5 pontos em triplicata: 5-ACQ foi avaliado na faixa de 5 a 30 µg/mL e cafeína de 10 a 50 µg/mL. As amostras foram dissolvidas em água ultra-pura, filtradas em 0,22µm e diretamente injetadas no sistema cromatográfico.

Determinação de melanoidinas

Foi utilizado um processo de separação em membranas de diálise com limite de exclusão de 12-14KDa, descrito por Bekedam et al. (2006), com algumas modificações. Foram preparados 20 mL de uma solução de café solúvel a 45% de concentração. A solução foi transferida para a membrana e esta colocada em um béquer com 400 mL de água destilada, sob agitação. As trocas de água do recipiente foram realizadas a cada 8 horas, até que não fosse mais observada cor na água externa. O material retido na membrana foi liofilizado, permitindo estimar a porcentagem de material com peso molecular superior a 12-14 KDa em relação a massa original. Essa fração, considerada aqui como melanoidina, foi expressa como g de melanoidinas/100g de amostra.

2.4. Análise Estatística

Para avaliação dos resultados de atividade antioxidante e da composição da amostra foi empregada Análise de Componentes Principais pelo procedimento “Principal Componentes & Classification Analysis”, do programa Statistica 7.1 (STATSOFT, 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bebidas de café solúvel preparadas dos produtos obtidos nas diferentes condições de torra, extração e matéria-prima (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) foram avaliadas quanto à sua atividade antioxidante através da capacidade em reagir com o cátion ABTS, pelo poder redutor medido pelo método de FRAP, pela medida de fenólicos totais (Folin Ciocalteau) e pela habilidade em seqüestrar o radical livre DPPH (Tabela1). Compostos do café usualmente relacionados com o poder antioxidante, como cafeína, 5-ACQ e melanoidinas, foram também determinados (Tabela 2).

Tabela 1. Valores de capacidade antioxidante do café solúvel avaliados por diferentes métodos, para as diferentes condições de processo e espécies.*

		ARABICA		ROBUSTA	
ENSAIOS	**COR TORRA**	**EXTRAÇÃO 1**	**EXTRAÇÃO 2**	**EXTRAÇÃO 1**	**EXTRAÇÃO 2**
ABTS	clara	0,75 ± 0,04	0,93 ± 0,00	1,09 ± 0,01	1,29 ±0,13
µMol/LTrolox/ug.mL^{-1}	média	0,84 ± 0,09	0,94 ± 0,03	1,44 ± 0,07	1,31 ± 0,02
	escura	0,95 ± 0,01	0,99 ± 0,00	1,33 ± 0,06	1,11 ± 0,15
FRAP	clara	0,77 ± 0,09	1,00 ± 0,00	1,05 ± 0,06	1,19 ± 0,02
µmol/L de trolox/ µg.mL^{-1}	média	1,00 ± 0,02	1,23 ± 0,02	1,36 ± 0,03	1,38 ± 0,04
	escura	1,11 ± 0,01	1,04 ± 0,02	1,40 ± 0,03	1,19 ± 0,07
	clara	0,71 ± 0,03	0,88 ± 0,01	0,88 ± 0,00	1,09 ± 0,03
FOLIN	média	0,77 ± 0,01	0,89 ± 0,06	0,98 ± 0,02	1,02 ± 0,02
Mmol/L ác. gálico/mg.mL^{-1}	escura	0,79 ± 0,00	0,77 ± 0,02	0,93 ± 0,01	0,79 ± 0,02
	clara	24,92 ± 0,55	16,11 ± 0,26	16,35 ± 0,34	14,81 ± 0,37
DPPH	média	19,87 ± 1,38	18,8 ± 0,47	16,14 ± 0,11	14,70 ± 0,20
IC50 (ug/mL)	escura	20,51 ± 0,18	20,23 ± 1,02	16,79 ± 1,04	19,47 ± 0,35

***média de 6 valores (**duplicatas, com três repetições) ± desvio padrão

Tabela 2. Teores de 5-ACQ, cafeína e melanoidinas do café solúvel para as diferentes condições de processo e espécies*.

		ARABICA		ROBUSTA	
	COR TORRA	**EXTRAÇÃO 1**	**EXTRAÇÃO 2**	**EXTRAÇÃO 1**	**EXTRAÇÃO 2**
5-ACQ (g/100g)	clara	3,53 ± 0,02	4,11 ± 0,11	2,79 ± 0,06	4,24 ± 0,05
	média	1,87 ± 0,13	2,55 ± 0,03	1,71 ± 0,04	2,26 ± 0,11
	escura	0,62 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,25 ± 0,03
Cafeína (g/100g)	clara	2,84 ± 0,02	3,44 ± 0,05	3,98 ± 0,08	5,33 ± 0,02
	média	3,07 ± 0,36	4,12 ± 0,35	5,82 ± 0,11	5,54 ± 0,14
	escura	3,64 ± 0,04	3,34 ± 0,15	4,75 ± 0,11	4,88 ± 0,64
Melanoidinas (g/100g)	clara	23,80 ± 0,77	20,13 ± 0,59	27,30 ± 0,51	22,89 ± 0,38
	média	18,07 ± 0,45	22,08 ± 0,04	19,66 ± 2,04	21,28 ± 1,65
	escura	29,64 ± 1,59	25,42 ± 0,01	30,44 ± 1,84	26,50 ± 0,19

*Média de duas medidas ± desvio padrão

Análise de Componentes Principais foi utilizada para avaliar a relação entre a atividade antioxidante e composição química dos diferentes produtos, sendo que os dois primeiros componentes principais (CP 1 e 2) explicaram 87% da variância total.

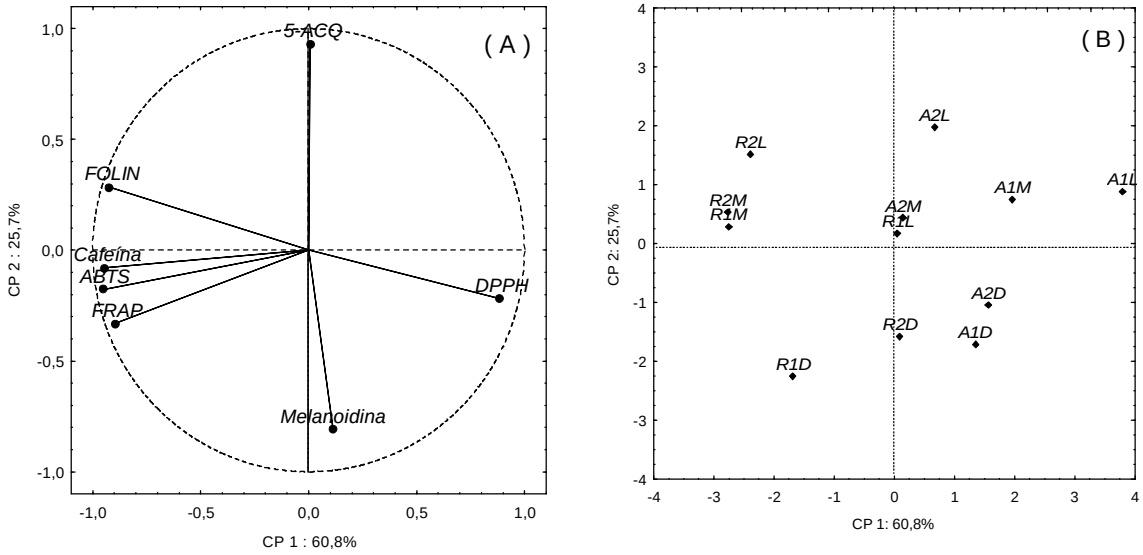


Figura 1. Análise de componentes principais a partir da atividade antioxidante e composição: projeção das variáveis (A) e gráfico de amostras (B). Espécies: arábica (A), robusta (R); Cores: D: escura, M: média; L: clara.

O CP1 foi caracterizado pela atividade antioxidante da bebida e teor de cafeína, que apresenta estabilidade ao processo térmico (Figura 1 A). É importante observar que todos os métodos caracterizaram as amostras de forma semelhante com relação à atividade antioxidante, apesar de diferirem quanto aos mecanismos envolvidos nas reações de óxido-redução (Tabela 1). DPPH está representado como valores de IC50, portanto quanto menores forem estes, maior será o poder antioxidante. Assim, este método tem a mesma indicação de atividade antioxidante que os demais.

Uma alta correlação entre Folin e os demais métodos estudados foi encontrada (Figura 1A). O método de Folin determina o teor de polifenóis totais, mas apresenta como mecanismo básico uma reação de oxidação/redução, podendo ser considerado na avaliação da atividade antioxidante (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Em estudo sobre a influência do preparo da bebida na atividade antioxidante, Sánchez-Gonzalez, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005) também observaram correlação entre o conteúdo de polifenóis por Folin e os valores de FRAP. Neste trabalho a maior correlação foi encontrada entre Folin e DPPH (r: 0,88) sugerindo um seqüestro deste radical por compostos fenólicos. Além disso, os compostos medidos por Folin estariam também envolvidos com o poder redutor da bebida, avaliado pelo método de FRAP (r: -0,72) e com o seqüestro do radical ABTS (r:0,82).

O CP2 estava correlacionado ao teor de 5-ACQ e melanoidinas, e, portanto, a compostos degradados ou produzidos durante o processo de torra. Observou-se entre estes compostos uma correlação negativa, ou seja, à medida que o teor de 5-ACQ diminuiu, ocorreu um aumento no teor de compostos de alto peso molecular. Além disso, não se observou correlação entre as concentrações de 5-ACQ e melanoidinas e os resultados de AA (CP1), constatando-se uma AA semelhante em amostras de torra clara e escura. (Tabela 1 e 2, Figura 1A).

Dessa forma a ACP permitiu separar as amostras pela AA (CP1) e/ou por torra (CP 2) (Figura 1B). Nos dois quadrantes inferiores, pode se observar um grupo distinto formado por amostras de cor escura, independentemente da matéria prima ou método de extração empregados no processamento. Nos quadrantes superiores ficaram alocadas as amostras de torras clara e média, sendo alocadas mais à esquerda os cafés robusta (com maior AA) e configurados à direita os cafés arábica.

Considerando a influência da matéria-prima sobre a AA, podemos observar que de maneira geral, amostras da espécie *C. canephora* mostraram uma maior AA que as de *C. arabica* (Tabela 1, Figura 1B). Resultados semelhantes já foram registrados em outros estudos com café torrado (DAGLIA et al., 2004), e estes têm sido usualmente atribuídos ao maior teor

de ácidos clorogênicos no café Robusta. Entretanto, os dados observados aqui mostraram que o isômero 5-ACQ, foi encontrado em concentrações semelhantes ou em maior abundância para o café solúvel arábica em relação ao café robusta (Tabela 2). A matriz de robusta, apesar de conter mais ácidos clorogênicos no grão verde, em torno de 10% para café robusta contra 8% para café arábica, segundo Leloup (2006), parece favorecer a perda de alguns compostos com a evolução do processo de torra. Clifford (1997) relata que para um grau de torra similar, o café robusta perde uma maior quantidade absoluta de ácidos clorogênicos produzindo fenóis voláteis e guaiacol. Trugo e Macrae (1984) e Dias (2005) também descrevem o mesmo comportamento estudando cafés arábica e robusta com diferentes graus de torra. Assim, a capacidade antioxidante mais elevada observada para cafés Robusta, foi atribuída ao maior teor de cafeína nesta espécie (Tabela 2), uma vez que este se correlacionou positivamente com as AA avaliadas (Figura 1). Lopez-Galilea; De Pena e Cid (2007), em estudo sobre a influência do preparo da bebida, também relatam uma correlação significativa entre cafeína e a atividade antioxidante avaliada por DPPH (0,826) e potencial redox (-0,844). Parras et al. (2007) avaliaram a atividade antioxidante de café de diferentes origens, com diferentes preparos de bebida (espresso, italiano e filtrado) e puderam observar maiores valores de TEAC para produtos com cafeína quando comparado aos seus equivalentes decafeinados.

Com relação à influência da torra sobre a AA, é interessante observar que existe pouca concordância na literatura mesmo para café torrado, que tem sido o produto mais estudado. Del Castillo et al. (2002) observaram maior AA na bebida de torra média. Duarte et al. (2005) encontraram maior AA para bebidas de torra clara, enquanto Nicoli, Anese e Parpinel (1999) relatam AA mais alta para bebidas de torra média a escura. Dados para café solúvel não foram encontrados; porém deve-se considerar que o produto após a torra ainda passa por uma etapa adicional onde foi aplicado um tratamento térmico: extração a altas temperaturas.

Para os cafés solúveis, o grau de torra mostrou pouca influência sobre a AA do produto final. Constatou-se que os compostos que tem sua concentração afetada pela torra (5-ACQ e melanoidinas) não foram diretamente relacionados ao potencial antioxidante das bebidas. Esse resultado pode a princípio parecer contraditório tendo em vista a reconhecida atividade antioxidante desses compostos. Foi descrito por Moreira et al. (2005) uma alta correlação entre o conteúdo de ácido clorogênico e o método de FRAP, particularmente dos isômeros cafeoilquínicos. Borreli et al. (2002) avaliaram a AA das melanoidinas comparando café verde e torrado (cores clara, média e escura). O método ABTS mostrou AA em todas as frações: baixo (1,0 a 3,0 KDa), médio e alto peso (acima de 100 KDa); entretanto as frações

de alto peso, contendo melanoidinas, bem como as frações de baixo peso, rica em fenólicos, foram as mais ativas. Daglia et al. (2004) encontraram resultados similares para café torrado, associando a AA a habilidade em seqüestrar radicais hidroxil. Neste trabalho frações de alto peso molecular originadas do café verde também foram avaliadas, porém não apresentaram AA, o que demonstra que o processo de torra é responsável pela formação de compostos com AA.

Na literatura muitas vezes os trabalhos de AA são focados em uma classe específica de compostos (ácidos clorogênicos, cafeína ou melanoidinas) ou em apenas uma condição de torra. Uma análise mais abrangente, de produtos com características de torra, extração e composição diferenciadas, nos permitiu observar que AA final da bebida foi o resultado da compensação entre compostos degradados e formados na torra. O 5-ACQ é degradado com aumento do grau de torra, polímeros de alto peso molecular são formados, fazendo com que atividade antioxidante não se altere com a modificação das condições de torra. Assim, conclui-se que nas condições estudadas esses dois compostos apresentam contribuição similar para a AA, a redução de um pode ser compensada pela formação do outro justificando a AA semelhante observada em amostras de torra clara e escura. Dessa forma, pode-se dizer que AA foi mais dependente da composição dos cafés do que da torra.

Em relação ao tipo de extração do café solúvel constatou-se um comportamento diferenciado entre processos dependendo do grau de torra (Tabela 2). Tanto para os produtos originados de arábica como de robusta, foi possível observar uma extração favorecida de 5-ACQ nas cores de torra clara e média quando se utilizou o processo em duas correntes (2). Ressalta-se ainda que o processo 2 também favoreceu a extração de cafeína na torra clara para as duas espécies e, na torra média, apenas para o produto de arábica. Na torra escura, o processo de extração deixou de influenciar a liberação destes compostos. Aparentemente, a partir do momento em que a matriz já está bastante “danificada” pelo processo de torra, a extração dos compostos é facilitada e ocorre de forma mais ou menos independente do processo usado. No caso do café robusta, em que a matriz é mais sensível a processos de degradação, isso já pode ser observado para alguns compostos mesmo no grau de torra médio.

Apesar da extração 2 provocar aumento tanto de cafeína como de 5-ACQ no produto final com torras mais claras, é provável que este aumento tenha ocorrido de maneira diferenciada para cada um deles. 5-ACQ, sendo um composto termolábil, provavelmente teve seus teores preservados na primeira corrente desta extração que utilizou temperaturas amenas. Já considerando a cafeína, que é termoestável, pode-se dizer que a extração 2 no geral permitiu uma maior liberação de compostos da matriz nas torras mais claras. Observando o

comportamento das melanoidinas, no geral, sua extração é favorecida pelo processo 1. Não somente os teores, mas também a composição da fração de alto peso molecular, considerada como melanoidina, é influenciada por condições de torra e extração. Ao mesmo tempo em que o peso molecular aumenta com o tratamento térmico, condições severas também levam a degradação destes compostos. Leloup (2006) avaliou a influência da temperatura no perfil de peso molecular de carboidratos. Foi possível observar a formação de mono e dissacarídeos com aumento da temperatura de extração, entretanto para condições moderadas a médias ocorre a presença de moléculas acima de 10 KDa. Na extração 2, utilizou-se duas correntes de água, sendo uma delas com temperatura mais elevada e provavelmente nesta fase foram também degradados compostos de alto peso molecular.

Com relação à contribuição da extração para a AA, observou-se que para torras mais claras a maior extração de 5-ACQ e cafeína obtida no processo 2 aumenta a AA do produto. Nesse caso observa-se a importância da concentração de 5-ACQ na definição da AA. Em processos menos intensos de torra, uma extração que permita maiores concentrações de 5-ACQ é vantajosa, à medida que esse composto se degrada e aumenta o teor de melanoidina o processo de extração é menos determinante para a AA.

A bebida do café solúvel apresenta então, um excelente potencial antioxidante, já que na sua fabricação é tradicionalmente utilizada grande proporção do café robusta associada a processos de extração em que se pode favorecer um enriquecimento de componentes com potencial antioxidante como 5-ACQ e cafeína.

4. CONCLUSÃO

Todos os produtos de café solúvel estudados apresentam potencial antioxidante, conferido por um balanço na concentração de compostos fenólicos, cafeína e melanoidinas. A geração de compostos de alto peso molecular com a degradação dos fenólicos fez com que a AA do produto fosse pouco afetada pelas condições de torra. O processo de extração empregado foi mais relevante para definição da AA para produtos com menor grau de torra. O maior teor de cafeína presente em *C. canephora* conferiu a produtos elaborados com esta espécie uma maior AA, mostrando que a atividade antioxidante do produto final depende principalmente das espécies utilizadas nos blends.

5. REFERÊNCIAS

ABICS Associação Brasileira da Indústria de Café Solúvel. Papel do café solúvel na abertura de mercados para o café brasileiro:<*http://www.abics.com.br/relatorios/dodirex3-cafe-soluvel-futuro.pdf*> Acesso em: 12 abr. 2008.

ALVES, S. T. et al. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.6, p.1164-1168, 2006.

BEKEDAM, E. K. et al. High Molecular Weight Melanoidins from Coffee Brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.54, n.20, p.7658 – 7666, 2006.

BENZIE, I. F. F. An automated, specific, spectrophotometric method for measuring ascorbic acid in plasma (EFTSA). **Clinical Biochemistry**, Winnipeg, v.29, p. 111-116, 1996.

BORRELI, R. C. et al. Chemical caracterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Columbus, v.50, n.22, p.6527-6533, 2002.

CASAGRANDE, R. et al. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.328, p.183-190, 2007.

CLIFFORD, M. N. The nature of chlorogenic acids. Are they advantageous compounds in coffee? **In ASIC, 17° Colloque**, Nairobi, p. 79-89, 1997.

COUGHLIN, J. R. Coffee and health: the holistic approach. **In ASIC, 21st Colloque,** Montpellier, France p.29-35, 2006.

DAGLIA, M. et al. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Columbus, v.48, n.5, p.1449-1454, 2000.

DAGLIA, M. et al. In vitro and ex vivo antihydroxil radical activity of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.52, n.6, p. 1700-1704, 2004.

DEL CASTILLO, M. D.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.50, n.13, p.3698- 3703, 2002.

DELGADO-ANDRADE, C.; RUFIÁN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Columbus**,** v.53, n.20, p. 7832-7836, 2005.

DEVASAGAYAM, T. P. et al. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1282, p. 63-70, 1996.

DIAS, R. C. E. (2005). Discriminação de espécies de café (Coffea arábica e Coffea canephora) em diferentes graus de torra. Tese de Mestrado. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, 106p. Disponível em: <http://bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000108937> Acesso em: 09 mai 2008.

DUARTE, S. M. S. et al. Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, p. 387-393, 2005.

GALLARDO, C.; JIMÉNEZ, L.; GARCIA-CONESA, M. T. Hydroxycinnamic acid composition and in Vitro antioxidant activity of selected grain fractions. **Food Chemistry**, Oxford, v.99, p. 455-463, 2006.

GEA- Group (2008). Coffee - The drink that changed the world. Disponível em: <http://www.geagroup.com/en/loesungen/kaffee.html>. Acesso em: 04 abr 2008.

GÓMEZ-RUIZ, J. A.; LEAKE, D. S.; AMES, J. M. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Columbus, v.55, n.17, p.6962-6969, 2007.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 101-123, 2006.

LELOUP, V. Evaluation of the nutritive value of soluble coffee. **In Proceedings of Asic**, 21st Colloque, Montpellier, France, p.80-87, 2006.

LÓPEZ-GALILEA, I.; DE PEÑA, M. P.; CID, C. Correlation of selected constituents with the antioxidant capacity of coffee beverages: influence of the brewing procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.55, n.15, p.6110-6117, 2007.

MOREIRA, D. P. et al. Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.53, n.5, p. 1399-1402, 2005.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. Antioxidants properties of Coffee Brews in Relation to the Roasting Degree. **Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie**, London v. 30, n.3, p. 292-297, 1997.

PARRAS, P. et al. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chemistry**, Oxford, v. 102, n.3, p.582-592, 2007.

PELLEGRINI, N. et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy by three different in vitro assays. **Journal of Nutrition**, v.133, p.2812-2819, 2003.

PRIOR, R. L.; XIANLI, W.; SCHAICH, K. Standardized Methods for Determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 53, n.10, p.4290-4302, 2005.

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

SHI, X.; DALAL, N. S. Antioxidant behavior of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. **Food Chemistry Toxicology**, v.29, p.1-6, 1991.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocateau reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.152- 178, 1999.

STATSOFT, INC (2005). STATISTICA – Data analysis software system. Versão 7.1.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. **Analyst,** v. 109, n.3, p.263-266, 1984.

CAPÍTULO V

Investigação e Avaliação de Constituintes do Café com Atividade Antioxidante

Vignoli, J. A.[1]; Bassoli, D. G.[1]; Benassi, M. T.[2]

[1]Companhia Iguaçu de Café Solúvel, BR 369, Km 88, Cornélio Procópio, PR, Brasil

[2]Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 6, Londrina, PR, Brasil

RESUMO

Constituintes do café relatados como bioativos foram avaliados quanto à sua capacidade antioxidante pelos métodos de Folin, ABTS, FRAP, DPPH e Deoxirribose. Nas concentrações estudadas furfural, 5-HMF (5- Hidroximetilfurfural) e trigonelina não apresentaram atividade antioxidante pelos métodos utilizados. Cafeína mostrou-se um eficiente seqüestrador de radicais hidroxílicos, assim como guaicol, 5-ACQ e maltol. Maltol destacou-se pela alta atividade contra o radical $ABTS^{\cdot +}$. 5-ACQ foi o composto mais ativo considerando o método DPPH, seguido por guaiacol. Para Folin-Ciocalteau a ordem de atividade foi: guaiacol > 5-ACQ> melanoidinas. Melanoidinas, extraídas de café solúvel, correspondente à fração de alto peso molecular (acima de 12KDa), também demonstraram AA em todos os outros métodos. Uma fração de compostos de peso molecular inferior a 3,5KDa, extraídos do mesmo café solúvel, mostrou AA, igual ou superior às melanoidinas, dependendo do método de avaliação. Compostos com peso molecular intermediário tiveram um reduzido poder antioxidante. Assim, podemos dizer que 5-ACQ, guaiacol, maltol, melanoidinas e cafeína demonstraram, de maneira diferenciada para cada método, capacidade antioxidante. Deve-se considerar que apesar desses compostos apresentarem um potencial de atuação como antioxidantes, o impacto de cada um na AA no produto final vai ser dependente da concentração e interações de sinergismo ou supressão entre eles.

Palavras-chave: Cafeína, 5-ACQ, melanoidinas, maltol, guaiacol.

1. INTRODUÇÃO

Atividade antioxidante (AA) é uma das características de grande interesse atualmente em estudos com alimentos. No café torrado, esta propriedade é geralmente focada no teor de compostos fenólicos, bem como em produtos de reação de Maillard (BEKEDAM et al., 2008a). No entanto, componentes como cafeína, que representa cerca de 2,2% da matéria seca em café robusta e 1,26% em arábica (LELOUP, 2006) e tem se mostrado um eficiente seqüestrador de radicais hidroxil (DEVASAGAYAM et al., 1996; SHI; DALAL, 1991), apresentam um potencial antioxidante. Além da cafeína, outros nitrogenados como trigonelina (DAGLIA et al. 2004) e alguns voláteis heterocíclicos típicos (FUSTER et al., 2000; YANAGIMOTO et al., 2002) encontrados no café também têm sido estudados por sua AA. Yanagimoto et al. (2004) relataram que compostos heterocíclicos presentes em frações de um extrato diclorometano, foram responsáveis pela parte da AA do café. Hidroximetilfurfural, por exemplo, mostrou uma atividade comparável ao α-tocoferol (SHINGHARA et al., 1998).

Para alguns destes compostos o mecanismo de ação antioxidante já foi elucidado ou sugerido. Para metilxantinas, incluindo cafeína e alguns derivados, deve-se à presença de um anel imidazol intacto e a existência de um doador de elétrons na posição C8 do grupo imidazol (Figura 1) (GÓMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007). Nos fenólicos, AA está relacionada aos grupos hidroxilas: aumento no número de hidroxilas conduz a um aumento no seqüestro de radicais livres (GÓMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007). Tem sido descrito também que a ligação dupla na cadeia de derivados de ácidos hidroxicinâmicos participa na estabilização do radical por ressonância (NATELLA et al., 1999). Já para produtos da reação de Maillard, particularmente melanoidinas, as propriedades químicas e funcionais não são completamente entendidas devido à composição química complexa e variável destes compostos. A AA é atribuída, em parte, a incorporação de ácidos clorogênicos na estrutura da melanoidina (BEKEDAM et al., 2008).

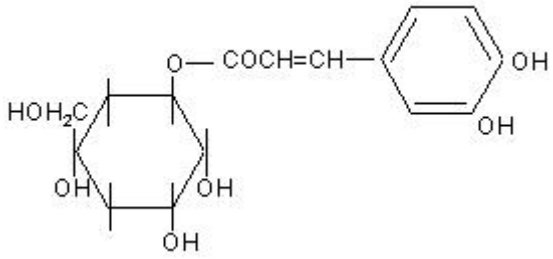
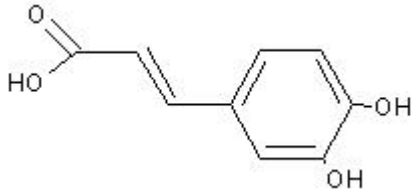
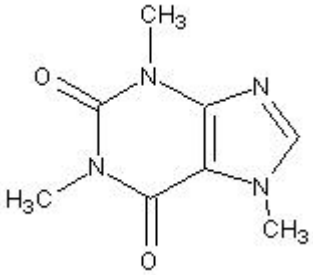
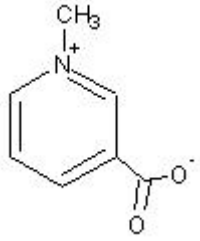
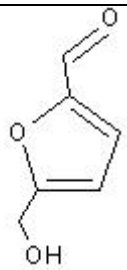
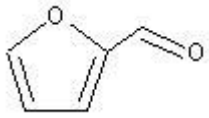
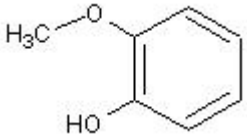
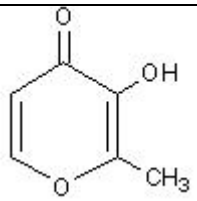
 5-ACQ	 Ácido Caféico
 Cafeína	 Trigonelina
 5- HMF	 HMF
 Guaiacol	 Maltol

Figura 1. Estrutura química dos principais compostos do café relacionados à atividade antioxidante.

É importante mencionar que uma vez que cada composto pode atuar de maneira diferenciada, na avaliação de componentes com estruturas variadas (Figura 1) diversos métodos devem ser utilizados em conjunto para estimar de maneira mais abrangente a AA. O método FRAP avalia o poder redutor de um composto, permitindo boa correlação com o grau de hidroxilação e extensão de conjugação em polifenóis (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000), não detecta, porém, compostos que atuam bloqueando radicais pela transferência de H. FRAP mede somente os mecanismos de transferência de elétrons,

podendo, em combinação com outros métodos, ser útil na distinção de mecanismos dominantes com diferentes antioxidantes (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Métodos utilizando ABTS, entre eles o TEAC, são baseados na habilidade dos antioxidantes em seqüestrar o radical: o composto pode reduzir o $ABTS^{\bullet+}$ quando tem um potencial redox menor que este (0,68V), como observado para fenólicos. O ensaio pode ser usado para determinar a capacidade antioxidante de extratos lipofílicos e hidrofílicos e em uma grande faixa de pH, possibilitando o estudo de efeitos do pH em mecanismos antioxidantes (AWIKA et al., 2003). O ensaio DPPH avalia principalmente a reação de transferência de elétron sendo a abstração do átomo de hidrogênio uma reação de via marginal (OU; PRIOR; HUANG, 2005). A metodologia de deoxirribose permite identificar a capacidade de seqüestrar o radical OH, muito reativo e que pode ser gerado em condições fisiológicas (PARRAS; MARTÍNEZ-TOMÉ; JIMÉNEZ, 2007). Outro método tradicionalmente utilizado para determinar capacidade antioxidante é o Folin-Ciocalteu (F-C) ou Fenólico Total, porém sempre há controvérsia sobre o que está sendo detectado neste ensaio de capacidade antioxidante: somente fenóis ou fenóis mais agentes redutores e possivelmente metais quelantes.

Os trabalhos da literatura com café usualmente se atem a uma única classe de compostos ou determinação da AA por uma técnica, não permitindo uma comparação adequada da importância de cada composto na AA do produto. Neste trabalho, compostos naturalmente presentes ou formados no processo (ácidos clorogênicos, representados pelo 5-ACQ, cafeína, trigonelina, frações com diferentes PM incluindo melanoidinas, furfural, 5-HMF, maltol e guaiacol) foram selecionados com base na sua potencial contribuição para a AA do café. Esses compostos foram submetidos à avaliação da AA por métodos associados a diferentes mecanismos de atuação (Folin-Ciocalteau, TEAC, FRAP, DPPH e deoxirribose). O objetivo foi avaliar comparativamente o impacto dos constituintes de café na atividade antioxidante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

Padrões de ácido-5-cafeoilquínico, cafeína, trigonelina, ácido gálico, furfural, hidroximetilfurfural, maltol e guaiacol, grau cromatográfico, foram obtidos da Sigma Aldrich-(EUA). Ácido tiobarbitúrico; ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico); DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), deoxirribose, cloreto de ferro III e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foram obtidos da Sigma Chemical CO. (EUA). Trolox (6-

hidroxi-. 2,5,7,8-tetrametilchroman-2- ácido carboxílico) e TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil-s-triazina) foram obtidos da Fluka/ Sigma-Aldrich (Dinamarca). Folin-Ciocalteau e peróxido de hidrogênio foram obtidos da Merck (Alemanha).

Para obtenção de melanoidinas, foram utilizadas membranas de diálise Spectra/Por (EUA) com limites de exclusão de 3,5 e 12-14KDa. Foi utilizado um processo de separação descrito por Bekedam et al. (2006), com algumas modificações. Foram preparados 20 mL de uma solução de café solúvel a 45% de concentração. A solução foi transferida para a membrana de 3,5KDa e esta colocada em um béquer com 400 mL de água destilada, sob agitação. As trocas de água do recipiente foram realizadas a cada 8 horas, até que não fosse mais observada cor na água externa. O material eluido da membrana, menor que 3,5KDa, foi liofilizado e utilizado na avaliação de sua AA. O material retido na membrana foi transferido para a membrana de 12-14 KDa. Após passar pelo mesmo processo de diálise anterior, as frações eluídas e retidas pela membrana de 12-14 KDa foram liofilizadas e submetidas a avaliação da AA. A fração de 12-14KDa foi considerada o padrão de melanoidina.

Café solúvel, 100% robusta, proveniente de uma torra escura e processo convencional de extração que apresentava boa capacidade antioxidante e alto teor de melanoidinas (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2009c), foi utilizado para produção das frações de diferentes pesos moleculares. A amostra original também foi submetida aos métodos de análise da AA.

2.2 Métodos

2.2.1.Medida da Atividade Antioxidante

A concentração dos padrões empregada em cada técnica foi definida considerando a especificidade dos métodos, de maneira a utilizar leituras dentro da faixa de linearidade (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2009a). As concentrações não correspondem, assim, necessariamente às observadas em produtos de café, mas permitem a comparação direta entre a eficiência dos compostos. Cada solução de padrão foi preparada em duplicata e as análises foram realizadas em triplicata.

Metodologia de Folin-Ciocalteau

Para determinação de fenólicos totais, apenas 5-ACQ, melanoidinas e guaiacol foram avaliados, já que este método é específico para fenólicos. Estes foram diretamente dissolvidos

em água e avaliados nas concentrações de 0,5mg/mL e 1mg/mL para 5-ACQ e melanoidinas, respectivamente. 100µL das soluções foram adicionados a 7,5 mL de água destilada e 300 µL do reagente de Folin-Ciocalteau 0,9N. Após agitação e mistura, foi acrescentado 1mL de solução Na_2CO_3 20% e 1,1mL de água destilada A reação foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora para leitura a 765 nm (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUCIA-RAVENTOS, 1999). Na curva de calibração utilizou-se ácido gálico como padrão nas concentrações 0,5; 1; 2; 5 e 7 mMol/L. Os resultados foram expressos como mMol/L de ácido gálico/mg.mL^{-1} amostra.

Metodologia ABTS (TEAC)

A capacidade antioxidante dos diferentes compostos frente ao radical livre $ABTS^{\bullet+}$ foi realizada de acordo com Sánchez-González, Jiménez-Escrig, Saura-Calixto (2005). Adicionou-se 10 µL da solução teste ou padrão Trolox para 4mL da solução $ABTS^{+\bullet}$ diluída, as leituras a 730 nm , foram realizadas após 6 minutos de reação. Cada composto foi avaliado em diferentes concentrações: cafeína e trigonelina nas concentrações de 1,25 e 2,5µg/mL; 5-ACQ na concentração de 1,25µg/mL; guaiacol e maltol a 0,25µg/mL; furfural e HMF a 1µg/mL. Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC- µMol/L Trolox/µg.mL^{-1} do composto).

Metodologia FRAP

O poder de redução dos compostos foi avaliado de acordo com Sánchez-González, Jiménez-Escrig, Saura-Calixto (2005). Para a avaliação da capacidade antioxidante 900µL do reagente FRAP preparado previamente, foi adicionado a 90µL de água destilada e 10 µL da solução teste ou padrão. As leituras foram realizadas a 595nm após 30 minutos à 37°C. O poder redutor de cada composto foi avaliado nas seguintes concentrações: cafeína e trigonelina (5 e 10µg/mL); 5-ACQ (2,5µg/mL); guaiacol (5µg/mL); maltol (1µg/mL); Furfural e 5-HMF (2 e 10µg/mL). Os resultados foram expressos como µMol/L de Trolox/µg.ml^{-1} do composto.

Metodologia DPPH

A redução do radical DPPH foi determinada pela mudança colorimétrica medida a 517nm conforme descrito em Casagrande et al. (2007). Para medida do seqüestro do radical 10 µl das soluções dos compostos foram adicionados em uma mistura contendo 1mL de

tampão acetato de sódio pH 5,5, 1mL de etanol e 0,5 mL de DPPH 250µM. Após 10 minutos à temperatura ambiente foi realizada leitura a 517nm. O poder antioxidante de cada composto foi calculado pela determinação do IC50 (concentração do composto necessária para inibir a atividade do radical em 50%).

Metodologia Deoxirribose

A atividade de seqüestro dos diferentes compostos baseada na inibição de degradação de deoxirribose por radicais hidroxil foi avaliada de acordo com Aruoma et al. (1994), com algumas modificações. Os compostos foram avaliados na concentração de 5µg/mL. A atividade seqüestradora foi expressa como a porcentagem de inibição da atividade (IA%) da degradação de deoxirribose na presença dos compostos relativa à amostra controle, de acordo com a equação:

$$IA(\%) = 100 - \frac{\Delta Absamostra}{\Delta Absamostracontrole} * 100 \qquad \text{equação 1}$$

Onde:

Δ Abs amostra: (Absorvância da amostra com ácido ascórbico - Absorvância da amostra sem ácido ascórbico)

Δ Abs controle: (Absorvância do controle com ácido ascórbico - Absorvância do controle sem ácido ascórbico)

2.2.2. Análise Estatística

Os resultados da AA dos compostos determinados por diferentes técnicas foram submetidos à Análise de Variância, considerando-se o tipo de composto como causa de variação, e comparados pelo teste de Tukey ($p<0,05$), no programa Statistica 7.1 (STATSOFT, 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os resultados das determinações de AA dos compostos avaliadas por diferentes metodologias. Para efeito de comparação está destacado o resultado obtido com os mesmos métodos em um produto: o café solúvel do qual foram extraídas as frações com diferentes PM.

Tabela 1. AA* de compostos puros e café solúvel avaliada pelos diferentes métodos.

Compostos		Folin (mMol/L ác.gál./mg.mL^{-1})	ABTS (µMol/L Trolox/µg.mL^{-1})	FRAP (µMol/L Trolox/µg.mL-1)	DPPH (IC50- µg.mL^{-1})	Deoxi (IA% a 5 ppm)
FRAÇÕES COM DIFERENTES PESOS MOLECULARES	< 3,5 Kda	0,62 ± 0,01^{d}	1,18 ± 0,01^{c}	1,25 ± 0,02^{c}	19,27 ± 0,00^{c}	47,17 ± 0,37^{e}
	3,5< p.m.<12 KDa	0,35 ± 0,02^{e}	0,33 ± 0,00^{d}	0,25 ± 0,02^{d}	40,28 ± 0,41^{e}	n.a.
	>12 Kda (melanoidinas)	0,71 ± 0,03^{c,d}	1,05 ± 0,05^{c}	1,10 ± 0,00^{c}	23,54 ± 0,77^{d}	42,29 ± 0,13^{f}
5-ACQ		3,94 ± 0,20^{b}	1,27 ± 0,01^{c}	3,44 ± 0,03^{b}	8,57 ± 0,19^{a}	70,58 ± 0,04^{c}
Cafeína		n.a.	n.d	n.d.	n.d.	52,44 ± 0,18^{d}
Trigonelina		n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d
Guaiacol		8,24 ± 0,11^{a}	16,73 ± 0,38^{b}	11,72 ± 0,28^{a}	12,05 ± 0,35^{b}	97,31 ± 0,83^{a}
Maltol		n.a.	20,69 ± 0,12^{a}	n.d.	n.d.	83,87 ± 0,23^{b}
Furfural		n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HMF		n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Café solúvel		**0,93 ± 0,01**	**1,33 ± 0,06**	**1,40 ± 0,03**	**16,79 ± 1,04**	**46,55 ± 0,38**

*valores representados por média (seis valores, duas repetições em triplicata) ± desvio padrão. Diferentes letras na mesma coluna, indicam diferença significativa para $p < 0,05$. n.a.: não avaliado; n.d.: não detectado.

Os compostos 5-ACQ, cafeína, guaiacol, maltol e as frações de diferentes PM foram caracterizados como apresentando AA por pelo menos um dos métodos empregados na avaliação, mas o impacto na AA diferiu dependendo do método considerado. Para efeito de comparação entre os métodos, a fração de maior PM será considerada como melanoidinas, seguindo orientação da literatura, onde tais compostos foram avaliados como material de peso molecular superior a 12KDa (BEKEDAM et al., 2006; BEKEDAM et al., 2008 a).

Cabe destacar, que para os compostos 5-ACQ, trigonelina, furfural, 5- HMF, guaiacol e maltol foram empregados padrões puros, e que as frações de diferentes PM foram extraídas e separadas por membranas. Assim, não foram purificadas, podendo-se admitir que outros compostos do café, que apresentam mesma faixa de peso molecular, possam estar presentes em cada fração. Para a fração acima de 12KDa, pode haver, por exemplo, diluição com polissacarídeos, o que implicaria em considerar que a avaliação da AA dessa fração pode subestimar o potencial antioxidante da melanoidina.

Para trigonelina, furfural e 5-HMF não se observou indicação de AA, na faixa de concentração estudada, independentemente do método utilizado (Tabela 1). Lopez-Galilea, De Peña e Cid (2007) também não encontraram nenhuma atividade para furfural e HMF utilizando os métodos DPPH e determinação do potencial redox. Os mesmos autores, no

entanto, descrevem correlação entre o teor de trigonelina e o valor do potencial redox (r de -0,767) e AA medida por DPPH (r:0,744). Fuster et al. (2000) também relatam AA para 5-HMF, através da redução de oxidação do hexanal. Vignoli, Bassoli e Benassi (2009.b.), trabalhando com cafés torrados arábica e conilon com diferentes graus de torra também observaram que os teores de trigonelina, HMF e furfural não se correlacionaram com a AA do produto medida por Folin, ABTS e FRAP.

Folin- Ciocalteau

Como essa metodologia é utilizada na determinação de fenóis totais foi aplicada apenas para 5-ACQ, melanoidinas e guaiacol. Guaiacol foi o composto com maior resposta a esta técnica (8,24 mMol/L ácido gálico/mg.mL^{-1}) , seguido por 5-ACQ (3,94 mMol/L ácido gálico/mg.mL^{-1}). A alta atividade demonstrada por estes compostos deve-se às suas estruturas e à especificidade da técnica a compostos fenólicos. Ambos mostraram maior teor fenólico em relação às melanoidinas (0,71 mMol/L ácido gálico/mg.mL^{-1}) (Tabela 1). Apesar da estrutura não conhecida, estudos recentes demonstram que as melanoidinas incorporam fenólicos à sua estrutura, o que explica sua resposta a esta técnica. Bekedam et al. (2008 a) investigaram a presença de ácidos clorogênicos (ACG) nestas moléculas e puderam observar a presença dos ácidos caféico e quínico (derivados de ACG) após saponificação de frações de melanoidinas. Além disso, já foi demonstrada a potencial atividade biológica destes compostos após digestão gastrintestinal (RUFIÁN-HENARES; MORALES, 2007). As frações de baixo peso molecular originadas após digestão apresentaram maior AA. ACG também é responsável pela liberação de metabólitos com AA. Gómez-Ruiz, Leake e Ames (2007) avaliaram a contribuição dos metabólitos de ACG, como m-cumárico e ácido dihidroferúlico que mostraram alta AA.

ABTS

Os compostos com maior capacidade de seqüestrar o radical livre ABTS$^{\cdot+}$ foram maltol e guaiacol (20,69 e 16,73 µMol/L/µg.mL^{-1}, respectivamente) seguido pelo isômero de ACG, 5-ACQ que não se diferenciou das melanoidinas e da fração de menor peso molecular (1,24; 1,05 e 1,18 µMol/L/µg.mL^{-1}, respectivamente) (Tabela 1).

Guaiacol e maltol, que fazem parte da fração volátil do café, já foram descritos por diferentes autores (FUSTER et al., 2000; YANAGIMOTO et al., 2002 e YANAGIMOTO et al., 2004) como apresentando um potencial antioxidante. Maltol pôde inibir a oxidação de hexanal em 100% na concentração de 250ug/mL. A AA do guaicol foi atribuída

principalmente a sua estrutura fenólica (Figura 1). (YANAGIMOTO et al., 2002; YANAGIMOTO et al., 2004).

Atividade de 5-ACQ contra o radical $ABTS^{\cdot+}$ foi também relatada por Gómez-Ruiz, Leake e Ames (2007) em estudo sobre o poder antioxidante dos metabólitos. Neste trabalho 5-ACQ, caféico e ferúlico apresentaram atividade superior a cafeína e seus metabólitos.

Para cafeína não foi detectada atividade contra ABTS nas concentrações estudadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Gómez-Ruiz, Leake e Ames (2007) que relataram que a cafeína apesar de mostrar atividade contra o radical peroxil (avaliado pelo método ORAC) não apresentava atividade contra o radical $ABTS^{\cdot+}$. Esses resultados são discordantes com o descrito por Parras et al. (2007), que avaliaram a AA de café com diferentes origens e preparos de bebida (espresso, italiano e filtrado) e observaram maiores valores de TEAC para produtos com cafeína quando comparado aos equivalentes decafeinados. Porém, uma relação estrutura/atividade não foi ainda estabelecida para o método $ABTS^{\cdot+}$, e isto é atribuído à falta de conhecimento do mecanismo de reação envolvido entre antioxidantes e radicais $ABTS^{\cdot+}$ (NENADIS et al. 2004), dificultando a identificação de compostos responsáveis pelas reações de oxi-redução.

Análise de FRAP

Guaiacol, 5-ACQ, melanoidinas e maltol apresentaram atividades de 18,06, 3,44, 1,11 e 0,13 µMol/LTrolox/µg.mL^{-1}, respectivamente (Tabela 1). O composto fenólico guaiacol apresentou AA 5 vezes superior ao 5-ACQ, que por sua vez teve AA 3 vezes superior às melanoidinas, indicando uma correlação entre o método de FRAP e o teor de compostos fenólicos. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores em estudo sobre a influência do preparo da bebida na atividade antioxidante, Sánchez-Gónzales, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto (2005) observaram correlação entre o conteúdo de polifenóis por Folin e os valores de FRAP. Vignoli, Bassoli e Benassi. (2009 b e c) observaram em estudos com solúvel e torrado, que os métodos de Folin, FRAP e ABTS mostraram correlações positivas. Conforme discutido anteriormente, durante o processo de formação de melanoidinas em café, compostos fenólicos são incorporados à estrutura, assim estas também apresentaram poder de redução do Fe, avaliado pelo método de FRAP. No entanto, como a estrutura não é conhecida não é possível afirmar se estes seriam os únicos responsáveis por esta AA.

Cafeína não apresentou poder de redução do Fe nas concentrações estudadas neste trabalho, ao contrário do observado em estudos com café solúvel e café torrado onde uma alta

correlação foi encontrada entre a AA das bebidas (Vignoli, Bassoli e Benassi, 2009 b e c) avaliada por FRAP e o teor de cafeína. Lopez-Galilea, De Peña e Cid (2007), também encontraram alta correlação entre o potencial redox (r=-0,844) e cafeína.

Método de DPPH

O método de DPPH avalia o poder de seqüestro do radical estável DPPH, que está associado à capacidade de um composto de doar elétrons ou hidrogênio. Valores mais baixos de IC50 para 5-ACQ (8,57 µg/mL) indicaram uma maior capacidade antioxidante, bastante próxima ao guaiacol (12,05 µg/mL), e superior a observada compostos presentes na fração de peso molecular inferior a 3,5KDa, melanoidinas e na fração de peso molecular intermediária (3,5 <PM < 12 KDa) (19,27; 23,54 e 40,28 µg/mL, respectivamente) (Tabela 1).

A AA de cafeína contra este radical não foi detectada, apesar de López-Galilea; De Peña e Cid (2007), em estudo sobre a influência do preparo da bebida, relatarem correlação entre teor de cafeína e a AA avaliada por DPPH (r:0,826).

Além disso, é possível novamente observar uma concordância entre os resultados de AA obtidos pelos métodos Folin, FRAP, e DPPH, principalmente relacionada a presença de guaiacol e as frações com diferentes pesos moleculares, incluindo-se melanoidinas.

Metodologia Deoxirribose

Guaiacol (97,31), maltol (83,87) e 5-ACQ (70,58) apresentaram a maior atividade antioxidante contra o radical $OH^{\cdot}$ (Tabela 1), expressa pela porcentagem de inibição da atividade do radical pelos compostos na concentração de 5µg/mL. Cafeína e as frações de baixo e alto PM inibiram a atividade do radical em 52,44%, 47,17% e 42,29%, respectivamente. A atividade de compostos fenólicos e melanoidinas contra o radical OH já foi detectada em estudos com frações do café (Daglia et al., 2004) e compostos fenólicos isolados (ZANG et al., 2003). Estudos realizados por Shi e Dalal (1991) e Devasagayam et al. (1996) também demonstraram a habilidade de cafeína em seqüestrar este radical. Além da cafeína seus metabólitos também apresentam AA. Gómez-Ruiz, Leake e Ames (2007) demonstraram que metabólitos da cafeína, em concentrações relevantes fisiologicamente, foram capazes de retardar por mais de 13 horas a oxidação do LDL pelo cobre.

Considerando os diferentes compostos pode-se observar que guaiacol apresentou uma atividade superior até mesmo ao 5-ACQ na maioria das metodologias, entretanto os teores de cada composto nos produtos de café devem ser considerados para que se tenha uma idéia do impacto de cada componente na AA do produto.

Por exemplo, Gómez-Ruiz, Leake e Ames (2007) demonstraram que apesar de cafeína e seus metabólitos mostrarem menor AA comparado aos fenólicos, deve-se considerar a importância deste resultado, pois após o consumo do café, cafeína e seus metabólitos podem ser encontrados no plasma em concentrações muito maiores que ácido caféico ou ACG. Conclusão semelhante pode ser estendida às melanoidinas que podem representar 25% da composição de café torrado, por exemplo, enquanto 5-ACQ e cafeína representam 0,98% e 2,65% respectivamente, e maltol e guaiacol apenas 1,89 e 0,47µg/100g de café respectivamente (VIGNOLI et al., 2009 e).

Foi possível observar a semelhança nos valores de AA, medida por diferentes técnicas, comparando-se as frações de baixo (<3,5KDa) e de alto peso molecular (>12-14 KDa) e a amostra de café solúvel original. Os ácidos clorogênicos e a cafeína encontram-se na fração de menor peso molecular e as melanoidinas na fração de alto peso. Vignoli, Bassoli e Benassi trabalhando com café torrado (2009b) e café solúvel (2009c), relataram que nesses produtos o processo de torra apresentou grande influência na composição (com a torra à medida que o teor de melanoidinas aumentava ácidos clorogênicos eram perdidos) e menor influência sobre a AA. As pequenas variações da AA do produto com a torra podem ser atribuídas ao fato dessas duas frações apresentarem AA similar, assim ao longo do processo de torra a perda de uma é compensada pelo aumento da outra. Esses resultados reforçam a hipótese que melanoidinas, polifenóis e cafeína são os principais responsáveis pela AA do café, principalmente quando se observa a menor AA da fração de peso molecular intermediária, que não contém nem ACG, nem melanoidinas.

3. CONCLUSÃO

Entre vários compostos presentes no café, 5-ACQ, guaiacol, maltol, melanoidinas e cafeína foram identificados como potenciais antioxidantes. Outros componentes como trigonelina, furfural e 5-HMF não demonstraram AA, nas condições avaliadas. É necessário para avaliação comparativa do potencial antioxidante de diferentes compostos a utilização de vários métodos, de maneira a abranger diferentes mecanismos de atuação. A separação de uma amostra de café solúvel em frações com diferentes pesos moleculares mostrou que ácidos clorogênicos, melanoidinas e cafeína estão intimamente associados a AA do café. Além destes compostos voláteis como maltol e guaiacóis demonstraram uma alta capacidade antioxidante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARUOMA, O. I. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. **Methods in Enzymology,** v. 233, p.57-66, 1994.

AWIKA, J. M. et al. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (Sorghum bicolor) and sorghum products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 51, n.23, p.6657-6662, 2003.

BEKEDAM, E. K. et al. Incorporation of Chlorogenic Acids in Coffee Brew Melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.56, n.6, p. 2055-2063, 2008.

BEKEDAM, E. K. et al. High Molecular Weight Melanoidins from Coffee Brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.54, n.20, p.7658 – 7666, 2006.

CASAGRANDE, R. et al. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.328, p.183-190, 2007.

DAGLIA, M. et al. In vitro and ex vivo antihydroxil radical activity of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.52, n.6, p.1700-1704, 2004.

DEVASAGAYAM, T. P. et al. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1282, p. 63-70, 1996.

FUSTER, M. D. et al. Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.48, n.11, p. 5600- 5603, 2000.

GÓMEZ-RUIZ, J. A., LEAKE, D. S., AMES, J. M. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 55, n.17, p. 6962-6969, 2007.

LELOUP, V. Evaluation of the nutritive value of soluble coffee. **In Proceedings of Asic**, 21st Colloque, Montpellier, France, p.80-87, 2006.

LÓPEZ-GALILEA, I.; DE PEÑA, M.P.; CID, C. Correlation of Selected Constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: Influence of the brewing procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 55, n.15, p. 6110-6117, 2007.

NATELLA F. et al. Benzoic and cinnamic acids derivatives as antioxidants: structure-activity relation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.47, n.4, p.1453-1459, 1999.

NENADIS, N. et al. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using $ABTS^{\cdot+}$ assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.52, n.15, p.4469-4476, 2004.

OU, B.; PRIOR, R.L.; HUANG, D. The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays**.** **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

PARRAS, P. et al. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chemistry,** Oxford**,** v.102, n.3, p.582-592, 2007.

PRIOR, R. L.; WU, ; SCHAICH, K. Standardized Methods for Determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.53, n.6, p.4290-4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v.48, n.8, p.3396- 3402, 2000.

RUFIÁN-HENARES, J.; MORALES, F. Effect of in vitro enzymatic digestion on antioxidant activity of coffee melanoidins and fractions. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v.55, n. 24, p. 10016-10021, 2007.

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

SHI, X., DALAL, N. S. Antioxidant behavior of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. **Food Chemistry Toxicology,** v. 29, n.1, p.1-6, 1991.

SHINGHARA, A.; MACKU, C.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activity of brewed coffee extracts. **In Functional Foods for Disease Prevention II: Medicinal Plants and Other Foods**, ACS Symposium Series 701; Shibamoto, T.; Terao, J.; Osawa, T. Eds., American Chemical Society: Washington, DC, p. 101-109, 1998.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocateau reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152- 178, 1999.

STATSOFT, INC (2005). STATISTICA – Data analysis software system. Versão 7.1.

VIGNOLI, J. A. et al. (2009 e). Influência do Preparo da Bebida na Extração dos Compostos Bioativos e na Atividade Antioxidante de Café Arábica.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. (2009 a). Padronização e Validação de Métodos para Avaliação da Atividade Antioxidante e Quantificação dos Compostos Bioativos de Café Torrado e Solúvel.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. (2009 b). Efeito de Variados Graus de Torra nos Compostos Bioativos e na Atividade Antioxidante de Café Arábica e Robusta.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. (2009c). Atividade Antioxidante, Polifenóis, Cafeína e Melanoidinas de Café Solúvel: Influência das Condições de Processamento e Matéria- Prima.

YANAGIMOTO et al. Antioxidant activity of hetocyclicic compounds found in coffee volatiles produced by Maillard reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 50, n.19, p. 5480-5484, 2002.

YANAGIMOTO, K. et al. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.52, n.3, p.592-596, 2004.

CAPITULO VI

Influência do Preparo da Bebida na Extração dos Compostos Bioativos e na Atividade Antioxidante de Café Arábica

Vignoli, J. A.[1]; Viegas, M. C.[1]; Bassoli, D. G.[1]; Benassi, M. T.[2]

[1]Companhia Iguaçu de Café Solúvel, BR 369, Km 88, Cornélio Procópio, PR, Brasil

[2]Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 6, Londrina, PR, Brasil

RESUMO

A partir de café arábica foram preparadas três bebidas: espresso, café de filtro e solúvel. A AA presente nas bebidas foi avaliada pelos métodos Folin, FRAP, ABTS (TEAC), DPPH e Deoxirribose. Os compostos bioativos foram determinados por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. A bebida de café espresso mostrou um maior teor de sólidos solúveis em relação ao torrado e solúvel. Considerando-se a AA e o teor dos compostos bioativos foi possível observar similaridade entre as bebidas de filtro e espresso, que se diferenciaram somente pela maior extração de cafeína e melanoidina do espresso. Apenas os teores de melanoidinas foram similares no café solúvel e espresso, pois menores concentrações de trigonelina, furfural, cafeína, 5-ACQ e alguns voláteis (furfural, HMF, maltol, guaiacóis) foram detectadas no solúvel. O solúvel apresentou maior concentração de HMF. Pelo método de deoxirribose que as três bebidas apresentam igual capacidade de seqüestro de radicais hidroxil, mas para os métodos Folin, ABTS e FRAP as bebidas de expresso e filtro apresentaram maior AA. Pode-se concluir que o preparo apresentou influência na extração dos compostos bioativos, mas que o processo de produção afetou mais a composição e capacidade antioxidante das bebidas do que o método de preparo estudado.

Palavras-chave: Espresso, filtro, solúvel, CLAE, CG/MS.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, devido a um grande interesse em alimentos que promovam funções fisiológicas, a relação entre café e saúde tem sido extensivamente estudada. A bebida do café vem se destacando entre outras pelo seu potencial antioxidante, além de seu sabor e aroma agradáveis (HIGDON, FREI, 2006).

Das muitas espécies de café, duas são de maior importância econômica, *Coffea arabica* e *Coffea canephora* variedade robusta (PARRAS et al., 2007). Bebidas originadas de grãos 100% arábica são geralmente preferidas pelos consumidores, já que este apresenta melhor qualidade sensorial que o café robusta (ABIC, 2008).

Setenta e cinco por cento das bebidas tipo *soft drink* consumidas regularmente no mundo são a base de café; sendo que os tipos de bebidas e a modalidade de consumo são fortemente associados com os hábitos sociais e culturas dos diferentes países (LÓPEZ-GALILEA, DE PENA, CID, 2007). Estatísticas de consumo para o café torrado e o solúvel revelam um expressivo grau de variação entre os diferentes mercados. Canadenses e americanos preferem, na grande maioria (95%), o café torrado, similiar ao observado na Europa Ocidental, África, Oriente Médio e América Latina onde 90% dos consumidores consome café torrado. Na Europa Oriental e região da Ásia-Pacífico, uma menor proporção dos consumidores (65% e 46%, respectivamente) também opta pelo produto torrado. Reino Unido (90%) e Australásia (79%) apresentam tendência oposta consumindo majoritariamente o café solúvel. Observa-se, assim, que o café solúvel destaca-se nos países onde o chá é uma bebida tradicional (GEA COFFEE, 2008). Independentemente da forma de consumo, estudos indicam a contribuição desta bebida como fonte de antioxidantes para a dieta, principalmente em países como Espanha, Noruega e Itália (PELLEGRINI et al. 2003).

Foi descrito para café solúvel e espresso uma atividade antioxidante maior que a do vinho tinto e do chá verde (PELLEGRINI et al., 2003). A capacidade antioxidante do café é usualmente atribuída a diversos compostos como cafeína, ácidos hidroxicinâmicos e produtos formados durante o processo de torra, como melanoidinas e heterocíclicos voláteis (pirróis, furanos e tiofenos) (VIGNOLI, BASSOLI e BENASSI, 2009 c e d, FUSTER et al. (2000), YANAGIMOTO et al. (2002), YANAGIMOTO et al. (2004), SHINGHARA et al. (1998)).

O processamento, destacando-se o processo de torra e extração (empregado para solúvel), e a matéria-prima utilizados na fabricação do café são responsáveis por produtos com diferentes AA, mas a literatura indica que o procedimento de preparo da bebida também tem um papel importante na sua capacidade antioxidante. Os compostos com potencial

antioxidante, tais como cafeína (BELL, WETZEL, GRAND, 1996) polifenóis (SÁNCHEZ-GONZALEZ, JIMÉNEZ-ESCRIG; SAURA-CALIXTO, 2005) ou melanoidinas (BEKEDAM et al., 2008; VIGNOLI, BASSOLI e BENASSI, 2009d) são extraídos diferentemente dependendo do preparo da bebida de café.

No entanto, muitas vezes a comparação entre bebidas é feita com amostras adquiridas do mercado, ou em condições em que não é possível controlar todos os parâmetros de processo (matéria-prima, torra, extração). Dessa forma, o acompanhamento apenas do procedimento de preparo, não garante que as diferenças encontradas são devidas só a essa etapa. Esse trabalho teve como objetivo estudar da influência do preparo da bebida de café arábica (filtrado, espresso e solúvel) na sua AA, avaliada pelos métodos de FRAP, ABTS, DPPH, deoxirribose e determinação de fenólicos totais, relacionando-a a composição química das bebidas e dos voláteis. As mesmas amostras (matéria-prima) foram processadas para café torrado (bebida de torrado e espresso) e posteriormente extraídas e liofilizadas para produção de café solúvel (bebida de solúvel).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1. Material e Preparo das amostras

As amostras foram fabricadas pela Companhia Iguaçu de Café Solúvel (Cornélio Procópio-PR, Brasil). Grãos de café arábica, *Coffea arabica*, foram torrados em torrador piloto Rayar, até a obtenção da cor 40 IR (índice de reflectância), avaliada por um colorímetro Photovolt, correspondendo a um grau de torra médio (L* de 19,5). Estes grãos seguiram para a produção das bebidas café de filtro, espresso e solúvel (liofilizado) de acordo com os processos descritos abaixo. Cada procedimento foi realizado em triplicata e as bebidas originadas foram utilizadas para as análises de composição química e atividade antioxidante.

Preparo da bebida por filtragem: O preparo da bebida por filtragem foi realizado seguindo recomendação da ABIC (2008). O café torrado foi moído e 25 gramas foram pesadas, colocadas em papel de filtro tipo Mellita e extraídas com 250 mL de água aquecida à 90°C.

Preparo da bebida tipo espresso: O preparo da bebida tipo espresso foi realizado de acordo com Petracco (2005). Os grãos foram moídos sendo 7g da amostra carregados numa máquina de espresso, marca De-Longhi-BAR 41 (Itália), e extraídos a uma pressão de 9 bar por 20 segundos. Este procedimento forneceu 50 mL de bebida, com uma densa camada de espuma conforme recomendado na referência acima.

Preparo do solúvel: Os grãos torrados foram submetidos ao processo convencional de fabricação do café solúvel. Após a torra foram granulados e alimentados no sistema de extração. A água a 180°C foi alimentada no primeiro estágio (coluna com o café mais antigo) seguindo na seqüência, percolando os estágios seguintes, até atingir o café mais novo. O extrato originado deste processo foi submetido ao processo de liofilização. O produto liofilizado foi então utilizado para o preparo da bebida. 1,2 g do pó liofilizado foram dissolvidos em água a 90°C para uma xícara de 50mL. Esta concentração foi selecionada seguindo recomendação de preparo dos fabricantes.

2.1.2. Reagentes e equipamentos

Padrões de ácido-5-cafeoilquínico, cafeína, ácido gálico, furfural, hidroximetilfurfural e os demais compostos voláteis identificados apresentavam grau cromatográfico, e foram obtidos da Sigma Aldrich- (EUA). Ácido tiobarbitúrico; ABTS (2,2-azinobis-3 ethyl benzothiazoline-6-ácido sulfônico); DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), deoxirribose, cloreto de ferro III e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foram obtidos da Sigma Chemical CO. (EUA). Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8,-tetrametilchromane -2-carboxylic acid) e TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil-s-triazina) foram obtidos da Fluka/ Sigma-Aldrich (Dinamarca). Peróxido de Hidrogênio, Folin-Ciocalteau, ácido acético e acetonitrila foram obtidos da Merck (Alemanha).

Para obtenção de melanoidinas, foram utilizadas membranas de diálise Spectra/Por (EUA) com limites de exclusão de 3,5 e 12-14KDa.

Utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis modelo UV mini-1240 (Shimadzu, Japão) e um cromatógrafo à líquido Dionex (Alemanha) composto por bomba gradiente P680, forno para coluna TCC-100, amostrador automático (ASI-100) e detector de Arranjo de Diodos (PDA-100). O sistema está acoplado a um computador com o software Chromeleon versão 6.6, para processamento dos dados. Compostos voláteis foram analisados por cromatografia

gasosa num sistema Agilent 6890N (Modo Scan - varredura 35 a 400 u.m.a) acoplado com detector de massas (GC-MS). Este sistema está ligado ao computador com software Chemstation G1701EA.

2.2. Métodos

2.2.1. Avaliação da Atividade Antioxidante

Metodologia ABTS (TEAC)

A capacidade antioxidante das soluções de café frente ao radical livre $ABTS^{+\bullet}$ foi realizada de acordo com Sánchez-Gonzalez, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto. (2005). Os resultados foram expressos como capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC- µMol/L Trolox/µg.mL^{-1} amostra e µMol/LTrolox/xícara).

Metodologia FRAP

O poder de redução da bebida foi avaliado de acordo com Sánchez-Gonzalez, Jiménez-Escrig e Saura-Calixto. (2005). As bebidas de café solúvel, espresso e de filtro foram diluídas até a concentração necessária para leitura na faixa estabelecida pela curva de calibração. Os resultados foram expressos como µmol/L de Trolox/µg.ml^{-1} de café e µMol/LTrolox/xícara.

Metodologia de Folin-Ciocalteau

Para determinação de fenólicos totais, as bebidas originadas dos diferentes preparos foram diluídas e 100µL foram adicionados a 7,5 mL de água destilada e 300 µL do reagente de Folin-Ciocalteau 0,9N. Após agitação e mistura, foi acrescentado 1mL de solução Na_2CO_3 20% e 1,1mL de água destilada. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora para leitura a 765 nm (SINGLETON, ORTHOFER e LAMUCIA-RAVENTOS, 1999). Na curva de calibração utilizou-se ácido gálico como padrão nas concentrações 0,5; 1; 2; 5 e 7 mMol/L. Os resultados foram expressos como mMol/L de ácido gálico/mg.mL^{-1} amostra e mMol/L de ácido gálico/xícara.

Metodologia DPPH

A redução do radical DPPH foi determinada pela mudança colorimétrica medida a 517nm conforme descrito em Casagrande et al. (2007). O poder antioxidante da bebida foi

calculado pela porcentagem de inibição da atividade do radical livre DPPH (IA%) pelas diferentes bebidas após uma diluição de 5 vezes.

$$IA(\%) = 100 - \frac{\Delta Absamostra}{\Delta Absamostracontrole} * 100 \qquad \textbf{(equação 1)}$$

Metodologia Deoxirribose

A atividade de seqüestro dos diferentes compostos baseada na inibição de degradação de deoxirribose por radicais hidroxil foi avaliada de acordo com Aruoma et al. (1994), com algumas modificações. Os compostos foram avaliados na concentração de 5ug/mL. A atividade seqüestradora foi expressa como a porcentagem de inibição da atividade (IA%) da degradação de deoxirribose na presença dos compostos relativa à amostra controle, de acordo com a equação:

$$IA(\%) = 100 - \frac{\Delta Absamostra}{\Delta Absamostracontrole} * 100 \qquad \text{equação 1}$$

Onde:

Δ Abs amostra: (Absorvância da amostra com ácido ascórbico - Absorvância da amostra sem ácido ascórbico)

Δ Abs controle: (Absorvância do controle com ácido ascórbico - Absorvância do controle sem ácido ascórbico)

2.2.2. Determinação de melanoidinas

Foi utilizado um processo de separação em membranas de diálise com limites de exclusão de 12-14KDa, descrito por Bekedam et al. (2006), com algumas modificações. 45 mL de cada bebida foram transferidos para uma membrana de diálise com limite de exclusão de 12-14 KDa e esta foi colocada em um béquer com 400 mL de água destilada, sob agitação. As trocas de água do recipiente foram realizadas a cada 8 horas, até que não mais fosse observada cor na água externa. O volume total do material retido na membrana foi determinado e uma alíquota deste foi liofilizada, para determinação da porcentagem de material com peso molecular superior a 12-14 KDa em relação à massa original de sólidos solúveis. Essa fração, considerada aqui como melanoidina, foi expressa como g de melanoidinas/100g de sólido solúvel de cada bebida. As medições foram realizadas em duplicata.

2.2.3. Determinação de 5-ACQ, cafeína, furfural e hidroximetilfurfural por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi utilizada uma metodologia por CLAE para determinação simultânea de cafeína, trigonelina, 5-ACQ, furfural e hidroximetilfurfural (VIGNOLI, BASSOLI, BENASSI, 2009 a). Alíquotas de cada bebida foram diluídas, quando necessário, filtradas em membranas de 0,22µm e diretamente injetadas no sistema cromatográfico. Análises foram realizadas em duplicata.

2.2.4. Determinação dos compostos voláteis por cromatografia gasosa (CG)

Compostos voláteis usualmente estudados pela sua atividade antioxidante (maltol, guaiacóis, furfural, 5-HMF) foram detectados por CG e espectrometria de massas (EM). Após preparo das bebidas transferiu-se uma alíquota de 10 mL para vials Agilent de 20 mL, que foram selados imediatamente com septos de silicone. Os voláteis foram extraídos pela técnica de SPME (Solid Phase Microextraction), onde a fibra foi exposta ao headspace da amostra à temperatura constante de 70 ºC. Após 30 minutos de extração, a fibra foi inserida diretamente no injetor do CG-MS. Foi utilizada uma coluna capilar polar HP-Innowax (60 m x 320 µm x 0.25 µm) (Agilent Technologies, EUA). O injetor operou em modo splitless com temperatura constante de 250ºC. O forno foi programado para uma temperatura inicial de 40ºC (5 min), 40 a 60ºC 4ºC/min (5 min), 60 a 250 ºC 8ºC/min (3 min). O gás de arraste hélio (5,0 analítico) manteve o fluxo constante igual a 1,2 mL/min. O detector de massas operou nas seguintes condições: energia de ionização: 70 eV, temperatura da interface: 280ºC, temperatura do quadrupolo: 150ºC, temperatura da fonte de íons: 230ºC. Os dados gerados foram analisados utilizando o software MSD Chemstation acoplado com a biblioteca de espectros de massas NIST/2002. A quantificação foi conduzida por padronização externa (VIEGAS; BASSOLI, 2007). As análises foram realizadas em duplicata.

2.2.5. Análise Estatística

Os resultados de atividade antioxidante e da composição das bebidas foram submetidos à Anova (Análise de Variância), considerando-se o método de preparo como causa de variação, e comparados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) no programa Statistica 7.1 (STATSOFT, 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição química e Atividade Antioxidante

Cromatogramas típicos de bebidas de café solúvel, espresso e filtro, onde estão identificados compostos de interesse quanto à AA desses produtos, podem ser observados nas Figuras 1 (CG/MS) e 2 (CLAE).

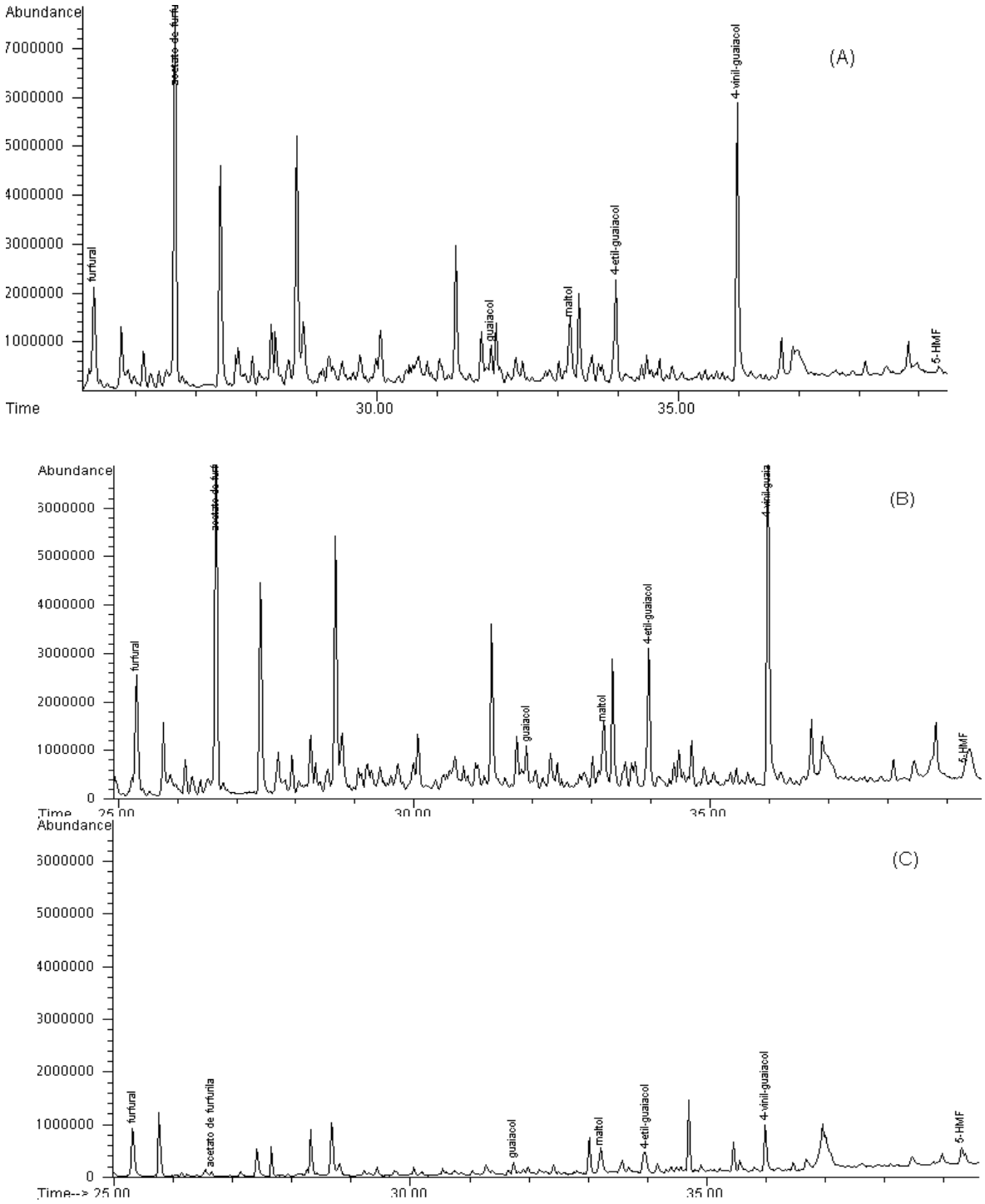


Figura 1: Cromatogramas típicos das bebidas por análise em GC-MS identificando os picos de interesse: (A) Bebida de Filtro; (B) Bebida Café Espresso; (C) Bebida Café Solúvel. Condições cromatográficas no texto.

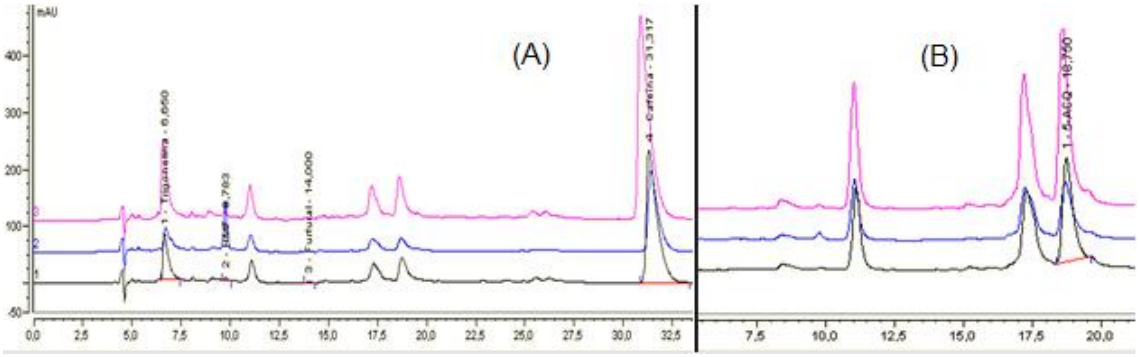


Figura 2. Cromatogramas típicos das bebidas na análise por CLAE, identificando os picos de interesse nas bebidas de Filtro, Espresso e Solúvel. Detecção a 230nm (A) e 320 nm (B). Condições cromatográficas no texto

Considerando-se as bebidas, preparadas por diferentes procedimentos, observou-se que o teor de sólidos solúveis do café espresso (3,41%) diferenciou-se do obtido para as bebidas do solúvel (2,66%) e café de filtro (2,04%). As porcentagens de extração das bebidas espresso e de filtro (24 e 20,40%, respectivamente) estão dentro da faixa proposta como mais aceitável. De acordo com Lingle (1996), bebidas de café abaixo de 16% são consideradas subdesenvolvidas e aquelas acima de 24% são consideradas demasiadamente extraídas. Apesar de terem sido utilizados procedimentos padrão para preparo de cada bebida, não necessariamente essas condições serão as utilizadas pelos consumidores. Tendo em vista que mudanças na proporção de água/café implicam em rendimentos diferenciados, optou-se por utilizar como base para os cálculos o teor de sólidos solúveis obtido em cada procedimento. Dessa forma, foi possível comparar mais diretamente os efeitos dos processos com relação à eficiência na extração de cada composto. Os teores dos compostos bioativos obtidos na CLAE e CG (Tabela 1) foram, assim, apresentados considerando-se o teor de sólidos solúveis presentes (µg ou g por 100g de sólidos solúveis).

Considerando-se o balanço da composição química na bebida e voláteis, observou-se maior proximidade entre os resultados do café de filtro e da bebida tipo espresso, preparados a partir do mesmo café torrado, distanciando-se da bebida solúvel, onde o processo de extração empregado na produção já havia anteriormente afetado a composição.

Tabela 1. Teores dos compostos bioativos voláteis e não voláteis nas bebidas.

	Compostos	Filtro	Espresso	Solúvel
Compostos Bioativos não voláteis (g/100g)	Trigonelina	2,34±0,07[a]	2,32±0,09[a]	0,58±0,01[b]
	HMF	0,02±0,00[b]	0,02±0,00[b]	0,29±0,00[a]
	Furfural	0,01±0,00[a]	0,01±0,00[a]	0,00±0,00[c]
	Cafeína	4,92±0,09[b]	5,17±0,10[a]	2,65±0,05[c]
	5-ACQ	1,96± 0,01[a]	2,01±0,03[a]	0,98±0,02[b]
	Melanoidinas	20,08±0,54[b]	26,89±0,20[a]	25,82±0,00[a]
Compostos Voláteis (µg/100g)	Maltol	3,28±0,7	3,37±1,9[a]	1,89±0,13
	acetato de furfurila	12,04±1,28[a]	13,93±2,01[a]	0,03±0,01[b]
	4-etil-2-metoxi-fenol	1,93± 0,36[a]	2,50±0,34[a]	0,23±0,03[b]
	4-vinil-2-metoxi-fenol	10,07±1,56[b]	13,99±0,63[a]	1,76±0,21[c]
	2-metoxi-fenol (guaiacol)	2,13±0,25[a]	2,46±0,43[a]	0,47±0,01[b]
	furfural	3,85±0,82[a]	5,15±0,21[a]	2,60± 0,20[b]
	5-HMF	0,28±0,05[b]	0,1±0,01[b]	1,50±0,14

Valores médios de três repetições verdadeiras ± desvio padrão; para melanoidinas, duas repetições. Diferentes letras numa mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$.

Com relação à composição das bebidas, o café de filtro e o espresso diferenciaram-se apenas pela maior extração de cafeína e melanoidinas no processo de preparo do espresso, não se observando diferença nos teores dos outros compostos da bebida (trigonelina, 5-ACQ, furfural e 5-HMF) (Tabela 1).

A bebida do solúvel destacou-se pela menor concentração de cafeína e maior teor de HMF comparativamente ao café de filtro e espresso (Tabela 1). Este comportamento do HMF foi anteriormente observado por Vignoli, Bassoli e Benassi (2009c) e também está de acordo com Murkovic e Bornik (2007) que acompanharam a formação de HMF em cafés arábica e robusta, durante o processo de torra, e observaram um conteúdo máximo deste composto após 3 a 4 minutos de torra, com posterior degradação; sendo assim, pode-se considerar que as altas temperaturas de extração levaram à formação de 5-HMF presente no café solúvel, após sua degradação no processo de torra.

Furfural, trigonelina e 5-ACQ apresentaram menores teores na bebida de solúvel (Tabela 1) do que para as bebidas preparadas a partir do torrado. Como já observado por

Vignoli, Bassoli e Benassi (2009c), o processo de extração utilizado na produção de café solúvel foi responsável por alterações no teor de 5-ACQ, o que explica a diferenciação desta bebida. É provável que outros componentes termolábeis tenham seguido a mesma tendência dos ácidos clorogênicos, resultando numa menor concentração na bebida do solúvel.

Em relação à fração de voláteis, 5- HMF apresentou o mesmo comportamento observado na bebida: maior concentração para o café solúvel. Todos os compostos voláteis da bebida de café solúvel apresentaram concentração inferior a observada nas bebidas de filtro e espresso, que no geral apresentaram composição similar de voláteis. Apenas 4-vinil-2-metoxi-fenol destacou-se pela maior extração no processo de preparo do café espresso (Tabela1).

Para melanoidinas, compostos de alto peso molecular, observou-se concentração inferior (20 g/100g) para a bebida de filtro em comparação com as demais (em torno de 26 g/100g para as bebida espresso e solúvel) (Tabela 1). Segundo Leloup (2006) o procedimento de extração do café solúvel proporciona uma maior liberação destes componentes, pelas altas temperaturas e pressão utilizadas. É provável que o mesmo efeito seja observado no procedimento de preparo da bebida espresso, onde a pressão da máquina poderia facilitar a liberação de melanoidinas, até atingir teores equivalentes aos encontrados no solúvel.

López-Galilea, De Peña e Cid (2007) comparando o mesmo produto preparado por filtro e espresso também relataram maiores teores de cafeína e melanodinas para a bebida espresso. Entretanto, descreveram que o espresso apresentou maior concentração de 5-ACQ e maior AA, diferença que não foi encontrada neste estudo. Deve-se considerar que estes autores utilizaram uma razão água/sólidos diferenciada, o que pode explicar a variação de composição química e, conseqüentemente na AA.

No geral observou-se que, desde que se considere em base de sólidos solúveis, a composição química foi muito mais influenciada pelo processo de produção do que pelo método de preparo do café. As bebidas tipo espresso e de filtro, preparadas diretamente a partir do grão torrado e moído, preservaram a maioria dos compostos bioativos sensíveis a degradação térmica tanto na bebida quanto nos voláteis. O processo de preparo do espresso, no entanto, permite ainda aumentar o teor de compostos como melanoidinas (de alto PM) e 4-vinil-2-metoxi-fenol (de baixa solubilidade em água), que foram favorecidos pela extração com o uso de pressão. A grande diferença apresentada pela bebida do solúvel foi atribuída à etapa adicional de extração a que este produto é submetido. Deve-se destacar, no entanto, que em paralelo a perda de compostos termolábeis, aumenta a concentração de outros bioativos como melanoidinas.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados de AA encontrados pelas diferentes metodologias nas bebidas de filtro, espresso e solúvel. Como não há um método universal pelo qual a AA possa ser medida totalmente, e considerando a complexidade da matéria-prima utilizada, optou-se pelo emprego de vários métodos na avaliação das diferentes bebidas. Nas metodologias onde foi possível, a AA foi expressa tanto pela concentração de cada bebida como pela massa de café presente nas xícaras, de maneira a se obter informação mais completa. A AA expressa em concentração de amostra, permitiu uma melhor avaliação da influência do preparo, já que as diferentes bebidas são comparadas na mesma grandeza. Quando o cálculo foi realizado para a xícara, a solubilização influencia a AA, mascarando o efeito do procedimento de preparo. No entanto, essa forma de expressão permite avaliar o produto da forma como seria consumido, desde que as condições de preparo e proporção água/café seguissem o padrão aqui citado.

Tabela 2. Atividade antioxidante das bebidas solúvel, de filtro e espresso avaliadas por diferentes métodos.

Métodos de avaliação da AA	AA-Filtro	AA- Espresso	AA- Solúvel
FOLIN (mMoL/L AG /mg/mL)	0,96 ± 0,02 [a]	0,99 ± 0,02 [a]	0,79 ± 0,03 [b]
FOLIN (mMol/L AG /xícara)	97,39 ± 1,20 [b]	149,44 ± 4,36 [a]	79 ± 3,60 [c]
FRAP (µMoL/L Trolox /ug/mL)	1,10 ± 0,04 [a]	1,10 ± 0,05 [a]	0,90 ± 0,03 [b]
FRAP (µMol/L Trolox/ xícara)	130,75 ± 12,01[a]	124,38 ± 19,39 [a]	89,80 ± 3,40 [b]
ABTS (µMoL/L Trolox /µg/mL)	1,19 ± 0,10 [a]	1,28 ± 0,05 [a]	0,96 ± 0,03 [b]
ABTS (µMol/L Trolox/ xícara)	142,82 ± 29 [a, b]	192,78 ± 28,45 [a]	95,79 ± 2,28 [b]
DPPH (%IA pela bebida)	59,56 ± 3,11 [b]	73,03 ± 3,10 [a]	53,76 ± 1,22 [b]
Deoxirribose (%IA pela bebida)	69,63 ±0,38 [a]	71,09 ± 2,24 [a]	72,35 ± 4,08 [a]

Diferentes letras numa mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$.
AA: Atividade Antioxidante
IA DPPH: Inibição da atividade do radical livre DPPH.
IA Deoxirribose: Inibição dos danos causados a deoxirribose pelo radical hidroxil

Quando se observa o teor de antioxidantes presentes em uma xícara de café (Tabela 2), é possível notar a maior AA encontrada em uma xícara de café espresso, avaliada pelo método Folin, ABTS, FRAP e DPPH. Pela presença dos compostos bioativos em maior concentração esta bebida foi extremamente favorecida no teor de antioxidantes na xícara. Segundo Svilaas et al. (2004), a ingestão de 4 a 5 xícaras de café (filtro) por dia é suficiente para suprir cerca de 64% do total de antioxidantes necessário na dieta.

Menor variação foi encontrada entre as bebidas, independentemente da metodologia, quando a AA foi expressa pela concentração. Observou-se valores de Folin, FRAP e ABTS menores para a bebida do solúvel, do que para os cafés de filtro e espresso. A maior diferença foi detectada pelo método de Folin-Ciocalteau. Considerando-se que este método destina-se à medida específica de polifenóis, os resultados da AA podem ser relacionados aos teores de 5-ACQ (Tabela 1). Sacchetti et al. (2009) avaliou o efeito do grau de torra na atividade de seqüestro de radicais ABTS pela bebida do torrado. Bebidas de torra média mostraram um aumento na atividade de seqüestro dos radicais em comparação com o café verde devido a um aumento na AA da porção não fenólica. Entretanto, quando torras escuras foram avaliadas esta atividade foi reduzida pela perda da fração fenólica, que não teve sua AA equilibrada pelo aumento de AA da porção não fenólica; o que demonstra a importância dos fenóis para a AA do café, além disso a bbida do solúvel apresentou valores inferiores de cafeína.

Interessante observar que a maior concentração de sólidos presentes na xícara de espresso comparada com café de filtro não foi suficiente para causar um aumento na AA deste, particularmente nos ensaios FRAP e ABTS. Portanto a concentração de compostos bioativos (envolvidos nas reações destes métodos) da bebida de filtro já foi suficiente para garantir a mesma AA que a bebida espresso.

Quando se considera a AA medida pelo método deoxirribose, não foi encontrada diferença entre as bebidas. Este método avalia o seqüestro do radical hidroxil (OH·); que é extremamente reativo e pode ser gerado sob condições fisiológicas no organismo humano, e reagir com proteínas, DNA, ácidos graxos insaturados e a maioria das membranas biológicas (PARRAS et al. 2007); sendo usado para detectar possíveis seqüestradores dos radicais OH. Através deste trabalho é possível considerar que o café apresenta em sua composição seqüestradores deste radical, e que as bebidas provenientes de café solúvel, espresso e de filtro são igualmente eficientes neste mecanismo, mesmo apresentando diferenças na composição (Tabela 2).

Dentre os compostos químicos, cafeína tem se destacado como um potencial seqüestrador de radicais OH· (SHI; DALAL, 1991; DEVASAGAYAM et al., 1996; VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2009 d). Concentrações de cafeína em bebidas de café são bastante variáveis, porém é freqüentemente assumido que uma xícara de café (bebida de filtro) forneça em torno de 100mg de cafeína. Tem sido considerado ainda que o consumo moderado de café, equivalendo a 3-4 xícaras/dia, promova benefícios à saúde, fornecendo de 300-400mg/dia de cafeína (HIGDON; FREI, 2006). Ainda que café espresso e de filtro apresentassem maiores teores de cafeína, estes não apresentaram diferenças entre si quanto à

inibição da degradação de deoxirribose; sugerindo que outros componentes da bebida também estejam envolvidos neste mecanismo, com já foi demonstrado para compostos fenólicos e melanoidinas em frações do café (DAGLIA et al., 2004). Além disso, Vignoli, Bassoli e Benassi (2009d) demonstraram que compostos voláteis como guaiacol e maltol apresentaram uma inibição da degradação de deoxirribose de 97,31 e 83,87%, respectivamente, seguidos por 5-ACQ, melanoidinas e cafeína.

Na inibição da atividade do radical DPPH, a bebida espresso mostrou-se mais eficiente que as de filtro e solúvel. É provável que esse efeito possa ser atribuído a concentração da bebida, considerando-se que café de filtro e solúvel apresentam concentrações de sólidos solúveis semelhantes.

No geral, o processo de fabricação do solúvel, mais especificamente a etapa de percolação, parece ocasionar uma diminuição na capacidade antioxidante medida por alguns métodos (Folin, FRAP, ABTS). Pode-se observar que o preparo teve uma menor influência, uma vez que as bebidas de filtro e espresso, originadas da mesma matéria-prima, só apresentaram diferença na AA medida pelo método de DPPH. Deve-se enfatizar, no entanto que neste estudo a bebida solúvel foi preparada a partir de *Coffea arabica*, numa cor de torra média, para que não houvesse nenhuma variação entre as bebidas além do preparo. Esse padrão é bastante usual para bebidas de filtro e espresso, mas não para café solúvel, que comumente é produzido com a espécie *Coffea canephora*, e cores de torra mais escuras. O preparo no método mais usual provavelmente levaria a resultados diferentes, uma vez que o café robusta possui maior AA que arábica e que torras escuras podem levar a uma maior produção de melanoidinas levando a um aumento da AA até um momento determinado (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2009 b e c).

A comparação com a literatura também é dificultada devido à variabilidade no preparo e matéria prima, bem como o método escolhido para avaliação, havendo muita divergência sobre a AA das bebidas.

Parras et al. (2007) avaliaram a capacidade antioxidante de bebidas tipo espresso e filtro contra os radicais lipoperoxil e $OH^{\bullet}$ (deoxirribose) e não observaram diferença entre a AA das bebidas. Considerando a capacidade em reagir com H_2O_2 o café de filtro foi mais eficiente que o espresso. No mesmo trabalho também foi testado à proteção destas bebidas contra a oxidação de manteiga, sendo que a bebida espresso forneceu maior proteção que a bebida de filtro.

Resultados diferenciados desse trabalho foram descritos por Sánchez-González, Jiménez-Escrig e Saura_Calixto (2005), que compararam a AA de bebidas tipo espresso,

italiano, filtro e solúvel liofilizado pelos métodos FRAP e ABTS. Os autores encontraram que AA da bebida do solúvel foi maior que as demais, que não se diferenciaram. Deve-se considerar, no entanto, que os dados foram apresentados considerando-se a massa de café total utilizada.

4. CONCLUSÃO

As bebidas de café apresentaram expressiva AA, destacando-se a grande capacidade de seqüestro do radical OH•, independente do método de preparo. Considerando-se o balanço da composição química na bebida e voláteis e AA, observou-se maior proximidade entre os resultados do café de filtro e da bebida tipo espresso, preparados a partir do mesmo café torrado, distanciando-se da bebida solúvel, onde o processo de extração empregado na produção mostrou afetar a composição. Foi possível concluir que o processo de fabricação é o principal responsável pela AA das bebidas e que o método de preparo está diretamente envolvido na extração dos compostos bioativos, que em algumas situações podem favorecer a AA da bebida espresso pela maior concentração de sólidos usual para esta bebida e preservação dos voláteis.

5. REFERÊNCIAS

ABIC- Associação Brasileira da Indústria de Café. Disponível em: <http://www.abic.com.br>. Acesso em: 19 de jan. 2009.

ALVES, S. T. et al. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.6, p. 1164-1168, 2006.

BEKEDAM, E. K. et al. Incorporation of Chlorogenic Acids in Coffee Brew Melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 56, n.6, p. 2055-2063, 2008.

BEKEDAM, E. K. et al. High Molecular Weight Melanoidins from Coffee Brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 54, n.20, p. 7658-7666, 2006.

BELL, L.N.; WETZEL, C.R.; GRAND, A.N. Caffeine content in coffee as influenced by grinding and brewing techniques. **Food Research International**, Ottawa, v. 29, n.8, p. 785-789, 1996.

CASAGRANDE, R. et al. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.328, p.183-190, 2007.

DAGLIA, M. et al. In vitro and ex vivo antihydroxil radical activity of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.52, n.6, p. 1700-1704, 2004.

DEVASAGAYAM, T. P. et al. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1282, p.63-70, 1996.

FUSTER, M. D. et al. Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.48, n.11, p.5600-5603, 2000.

GEA- Group (2008). Coffee - The drink that changed the world. Disponível em: <http://www.geagroup.com/en/loesungen/kaffee.html>. Acesso em: 04 abr 2008.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p.101-123, 2006.

LELOUP, V. Evaluation of the nutritive value of soluble coffee. **In Proceedings of Asic**, 21st Colloque, Montpellier, France, pp. (80-87), 2006.

LINGLE, T. R. Coffee brewing control chart. **In The Coffee Brewing Handbook**. A Systematic Guide to Coffee Preparation; Lingle, T. R., Ed. Specialty Coffee Association of America: Long Beach, 1996.

LÓPEZ-GALILEA, I.; DE PEÑA, M.P.; CID, C. Correlation of Selected Constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: Influence of the brewing procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 55, n.15, p. 6110-6117, 2007.

MURKOVIC, M.; BORNIK, M. A. Formation of 5-hydroxymethil-2-furfural (HMF) and 5-hydroxymethyl-2-furoic acid during roasting of coffee. **Molecular Nutrition & Foof Research,** v.51, n.4, p.391-394, 2007.

PARRAS, P. et al. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chemistry,** Oxford, v. 102, n.3, p.582-592, 2007.

PELLEGRINI, N. et al. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy by three different in vitro assays. **Journal of Nutrition**, v. 133, p.2812-2819, 2003.

SACCHETTI, G. et al. Effect of Roasting Degree, Equivalent Thermal Effect and Coffee Type on the Scavenging Activity of Coffee Brews and Their Phenolic Fraction. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n.1, p.74-80, 2009.

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

SHI, X., DALAL, N. S. Antioxidant behavior of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. **Food Chemistry Toxicology,** v.29, n.1, p.1-6, 1991.

SHINGHARA, A.; MACKU, C.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activity of brewed coffee extracts. **In Functional Foods for Disease Prevention II: Medicinal Plants and Other Foods**, ACS Symposium Series 701; Shibamoto, T.; Terao, J.; Osawa, T. Eds., American Chemical Society: Washington, DC, p. 101-109, 1998.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocateau reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.152 - 178, 1999.

STATSOFT, INC (2005). STATISTICA – Data analysis software system. Versão 7.1.

SVILAAS, A. et al. (2004) Intakes of Antioxidants in Coffee, Wine and Vegetables are Correlated with Plasma Carotenoids in Humans. **Journal of the American Society for Nutritional Sciences,** n.134, p.562-567.

VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. **Química Nova**, São Paulo, vol.30, n.8, 2007.

VIGNOLI, J. A. et al. (2009 e). Influência do Preparo da Bebida na Extração dos Compostos Bioativos e na Atividade Antioxidante de Café Arábica.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. (2009 a). Padronização e Validação de Métodos para Avaliação da Atividade Antioxidante e Quantificação dos Compostos Bioativos de Café Torrado e Solúvel.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. (2009 b**).** Efeito de Variados Graus de Torra nos Compostos Bioativos e na Atividade Antioxidante de Café Arábica e Robusta.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. (2009c). Atividade Antioxidante, Polifenóis, Cafeína e Melanoidinas de Café Solúvel: Influência das Condições de Processamento e Matéria- Prima.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. (2009d). Investigação e Avaliação de Constituintes do Café com Atividade Antioxidante.

YANAGIMOTO et al. Antioxidant activity of hetocyclicic compounds found in coffee volatiles produced by Maillard reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 50, n. 19, p.5480-5484, 2002.

YANAGIMOTO, K. et al. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.52, n.3, p.592-596, 2004.

CONCLUSÃO GERAL

Os métodos validados e empregados na determinação da AA e composição química do café permitiram observar que a AA do café torrado resulta, principalmente, da contribuição de compostos fenólicos, cafeína e melanoidinas. Outros compostos presentes na fração volátil do café como maltol e guaiacol, podem contribuir para sua AA.

Apesar dos compostos fenólicos sofrerem degradação com o processo de torra, outros componentes antioxidantes, como as melanoidinas, podem se formar, mantendo ou aumentando a AA. Porém, com o aumento da intensidade de torra, a maior destruição dos polifenóis pode não ser mais equilibrada pela formação de outros compostos. Assim, cafés originados de torras mais claras apresentaram maior capacidade antioxidante. A expressiva contribuição da cafeína na AA permitiu que cafés robusta apresentassem maior AA que os arábica.

O processo de extração do café solúvel também influenciou sua AA, principalmente em produtos com menor grau de torra, devido a maior preservação de polifenóis na extração com duas correntes de água e maior extração de cafeína.

A bebida do café torrado, originado de diferentes intensidades de torra, demonstrou potencial antioxidante, e este foi influenciado pelas condições de torra e espécie. Entretanto, o procedimento de preparo também influenciou a AA da bebida. Bebidas de filtro e espresso apresentaram similaridade na composição química e dos voláteis, distanciando-se da bebida solúvel. O método de preparo influenciou a extração dos compostos bioativos, o que favoreceu a AA da bebida espresso pela maior concentração de sólidos e preservação dos voláteis usual para esta bebida. Bebidas de café (filtro, espresso e solúvel) apresentaram AA, destacando-se a grande capacidade de seqüestro do radical OH•, independente do método de preparo.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo