

Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras

Bioactive compounds, acids groups and antioxidant activity analysis of arabic coffee (Coffea arabica) and its defective beans from the Brazilian savannah submitted to different roasting degrees

Sérgio Antônio Lemos de MORAIS^{1*}, Francisco José Tôrres de AQUINO¹, Evandro Afonso do NASCIMENTO¹, Grasielle Silva de OLIVEIRA¹, Roberto CHANG¹, Neide Carolina dos SANTOS¹, Gabriel Marques ROSA¹

Resumo

O presente trabalho estudou os compostos bioativos (ácidos clorogênicos, trigonelina, cafeína, fenóis totais e proantocianidinas), grupos hidroxila ácidos e atividade antioxidante de um café arábica proveniente do Cerrado Mineiro e de seu PVA (grãos pretos, verdes e ardidos). As amostras foram preparadas nas torras clara (180 ± 10 °C; $6,0 \pm 1,0$ minutos), média (180 ± 10 °C; $8,0 \pm 1,0$ minutos) e escura (180 ± 10 °C; $10,0 \pm 1,0$ minutos). Considerando-se a média das três torras do café e do PVA, a diferença observada no teor de todos os constituintes acima não foi significativa ($p > 0,05$), exceto com o teor de grupos hidroxila ácidos que foi ligeiramente superior no PVA e cafeína calculada pelo método semiquantitativo que foi superior no café. Portanto, dentre esses constituintes, os compostos com grupos ácidos seriam os únicos que poderiam contribuir para explicar a grande diferença de sabor existente entre o café de grãos sadios e o de PVA. Tanto o café como o PVA apresentaram atividade seqüestradora do radical DPPH nas três torras, sendo a atividade do café sempre superior. Analisando-se as variações dos teores de cafeína, fenóis totais, proantocianidinas, grupos hidroxila ácidos, trigonelina e ácidos clorogênicos, não foi possível explicar a atividade antioxidante superior apresentada pelo café da torra média (CE_{50} de $2,3 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ de DPPH).

Palavras-chave: DPPH; CE_{50} ; café do cerrado; café torrado.

Abstract

This work reports the results of the investigation of bioactive compounds (chlorogenic acids, trigonelline, caffeine, total phenolics, and proanthocyanidins), total acid groups, and the antioxidant activity of the Arabian coffee (*Coffea arabica*) from the Brazilian cerrado (vast tropical savannah) (Minas Gerais state) and its defective beans (Black, green, and sour beans). The samples were prepared using three roasting degrees: light (180 ± 10 °C; $6,0 \pm 1,0$ minutes), medium (180 ± 10 °C; $8,0 \pm 1,0$ minutos), and dark (180 ± 10 °C; $10,0 \pm 1,0$ minutos). Considering the average of the three roasts per coffee and defective beans, the difference observed for the content of all constituents listed above was not significant ($p > 0,05$). Exceptions are the content of acid hydroxyl groups, which were slightly greater in the coffee defective beans and the content of caffeine, calculated using the semi-quantitative method, which was higher in the coffee itself. Both the coffee and its defective beans presented scavenging activity against DPPH radical; however, the coffee antioxidant activity was always higher. The variations observed in the content of caffeine, total phenols, proanthocyanidins, phenolic acid groups, trigonelline, and chlorogenic acid levels can not explain the higher antioxidant activity observed for the medium roasted coffee (EC_{50} of $2,3 \text{ mg}\cdot\text{mg}^{-1}$ of DPPH).

Keywords: DPPH; EC_{50} ; savannah coffee; roasted coffee.

1 Introdução

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, sendo responsável por 30% do mercado internacional desta commodity. É também o segundo mercado consumidor, atrás somente dos Estados Unidos (ABIC, 2005). Segundo a CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), a safra 2005/06 de café em grãos foi de 32,9 milhões de sacas de 60 kg e a safra de 2006/07 é estimada em 42,0 milhões (GLAUCO, 2006).

Os principais estados brasileiros produtores de café são: Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Espírito Santo, Bahia e Rondônia. A produção do café arábica (*Coffea arabica*) concentra-se principalmente em Minas Gerais, São Paulo e Paraná, enquanto que o Espírito Santo é o grande produtor do café conilon (*Coffea*

canephora) embora os Estados de Rondônia e Bahia estejam ampliando as suas produções (LUNA-FILHO, 2007).

O Brasil apresenta um parque cafeeiro complexo e diversificado, dispõe de grandes extensões de terra de diferentes altitudes e produz, conseqüentemente, uma grande variedade de tipos de bebidas, o que o favorece em relação aos outros países concorrentes. Além disso, o País lidera o processo de desenvolvimento tecnológico, com destaque para a irrigação, fertirrigação e mecanização (SAES; NAKAZONE, 2004). Na produção do café arábica, o Brasil destaca-se por possuir o menor custo de produção e alta produtividade, o que lhe garante a competitividade no mercado internacional.

Recebido para publicação em 1/6/2007

Aceito para publicação em 4/3/2008 (002568)

¹ Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, Av. João Naves de Ávila, 2121, CEP 38408-100, Uberlândia - MG, Brasil, E-mail: salemos@ufu.br

*A quem a correspondência deve ser enviada

Dentre essas regiões, a do Cerrado e a do sul de Minas vêm se destacando por produzirem cafés de melhor qualidade, pelos quais a procura tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. A região do sul de Minas é a mais antiga e a maior produtora de café do Estado. O clima ameno, a altitude entre 1.100 e 1.350 m e o índice pluviométrico de 1.700 mm/ano fazem com que haja duas e até três floradas por ano (PIMENTA, 2003).

Os grãos pretos, verdes e ardidos (PVA) constituem defeitos intrínsecos do café e resultam da colheita atrasada ou adiantada, excesso de umidade ou de grãos que permaneceram muito tempo no chão. Segundo os especialistas, sua utilização na torração reduz a qualidade da bebida, pois altera sua cor, aroma e sabor (TOLEDO; BARBOSA, 1998; SAES; FARINA, 1999; MENDONÇA et al., 2003; AKIYAMA et al., 2005). Atualmente, com a utilização de sensores eletrônicos nas máquinas mais modernas de beneficiamento de café, o PVA pode ser separado facilmente (SCHALLER; BOSSET; ESCHER, 1998). Entretanto, por mais contraditório que possa parecer, ele não é descartado e sim avidamente procurado pelas torrefadoras porque permite a redução de custos dos cafés vendidos no mercado interno. Recentemente o governo tentou tirar o PVA do mercado via Instrução Normativa (BRASIL, 2003). Ele teve o apoio dos produtores e, naturalmente, dos consumidores, mas devido às pressões dos exportadores e dos industriais que utilizam o PVA nas suas formulações, o governo recuou e disse que esta instrução só valia para compras federais (MASCHIO, 2003).

Nos últimos anos, inúmeras evidências têm indicado que os radicais livres e outros oxidantes são os grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao avanço da idade, tais como: câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI et al., 2005). Os compostos bioativos são reconhecidos por suas propriedades benéficas à saúde humana. Inúmeros estudos têm sugerido que dietas ricas em vegetais e frutas podem reduzir os riscos de incidência de muitas doenças crônicas como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (SVILAAS et al., 2004).

Principalmente por possuir substâncias bioativas, o café apresenta atividade antioxidante (ANESE; NICOLI, 2003; YANAGIMOTO et al., 2004; YEN et al., 2005). Pesquisas mostram que o café, além da cafeína, apresenta muitos outros compostos bioativos como a vitamina B-3, ácidos clorogênicos, quinídeos (formados na torra do café a partir dos ácidos clorogênicos) dentre centenas de outros, a maioria volátil, que precisam ser mais bem estudados (MONTEIRO; TRUGO, 2005; WINSTON; HARDWICK; JABERI, 2005; TOCI; FARAH; TRUGO, 2006). Várias pesquisas mostram que o consumo de café pode ajudar a amenizar diversas doenças neurológicas crônicas como o mal de Parkinson e Alzheimer, doenças de origem metabólica como doenças no fígado (cirrose e carcinoma hepatocelular), diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (WINSTON; HARDWICK; JABERI, 2005; ANDERSEN, 2006; DE LAU; BRETELER, 2006; HIGDON; FREI, 2006; PEREIRA; PARKER; FOLSOM, 2006). Johnson et al. (2002) sugerem que pode haver um efeito positivo do consumo de café na velocidade de raciocínio nas pessoas idosas, e o trabalho de Kawachi et al. (1996) mostra que há uma relação inversa entre o consumo de café e o risco de suicídio.

Segundo Nebesny e Budryn (2003), os ácidos clorogênicos figuram entre os principais constituintes bioativos responsáveis pela ação antioxidativa dos cafés. A Figura 1 apresenta as estruturas dos compostos bioativos (ácidos clorogênicos principais, cafeína e trigonelina) presentes na bebida do café (OLIVEIRA, 2006).

Entre os métodos utilizados para a determinação da atividade antioxidante de compostos orgânicos, encontra-se o método espectrofotométrico baseado na redução do radical estável DPPH. Existem dois tipos de radicais livres (DPPH) comercializados pela mesma sigla que são os radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, também encontrados pela nomenclatura 1,1-difenil-2-picrilhidrazila e 2,2-di(4-*t*-octilfenil)-1-picrilhidrazila, Figura 2 (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; NEBESNY; BUDRYN, 2003; SIGMA-ALDRICH, 2007). A conversão do radical DPPH em DPPH-H resulta no declínio relativamente rápido da absorvância a 515 e 531 nm, respectivamente. Nesta reação, o radical DPPH é reduzido pelos constituintes antioxidantes presentes nos cafés (AH). Os radicais A gerados reagem de várias formas resultando em novos compostos (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Em continuidade aos nossos estudos com os cafés de Minas Gerais (MORAIS et al., 2002; NASCIMENTO; MORAIS; ROCHA, 2003; ALVES, 2004; ALVES et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2006; OLIVEIRA, 2006), o presente trabalho teve como objetivo caracterizar duas amostras, uma de café de grãos sadios e outra do PVA obtido de sua purificação. Estas amostras são provenientes do Cerrado Mineiro e foram submetidas a diferentes pontos de torras e analisadas por métodos químicos, espectrofotométricos e cromatográficos. Foram quantificados os compostos bioativos (trigonelina, ácidos clorogênicos, ácido caféico e cafeína), fenóis totais, porcentagem de grupos ácidos e calculadas a atividade antioxidante e a concentração efetiva média (CE₅₀).

2 Material e métodos

2.1 Solventes e padrões

Os solventes químicos usados foram de grau analítico e adquiridos da Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro - Brasil. Os padrões ácido gálico, ácido clorogênico, ácido nicotínico, catequina, ácido caféico, cafeína, trigonelina e os reagentes DPPH e hidróxido de lítio foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo - Brasil.

2.2 Amostragem

As amostras de café arábica e de PVA foram cedidas pela Cooperativa de Produção dos Cafeicultores do Cerrado de Araguari Ltda (COOCACER). Todas as amostras foram secadas ao sol em terreiro de cimento e pertencem à safra de 2004/2005.

2.3 Torra

A torração dos grãos foi realizada em um microtorrador elétrico de bancada, marca Pinhalense modelo TC-0, à temperatura de 180 °C (temperatura média de 180 ± 10 °C). O ponto de torra clara foi atingido em aproximadamente 6,0 ± 1,0 minutos, torra

Ácidos Clorogênicos (ACG)

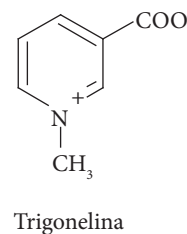
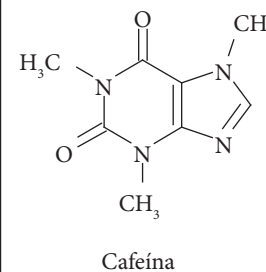
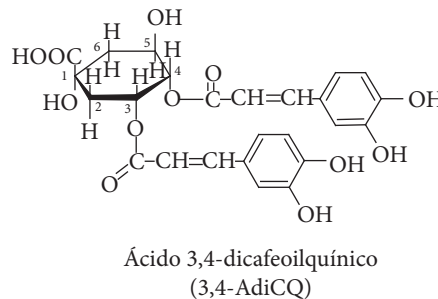
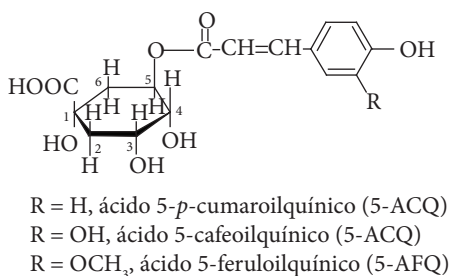
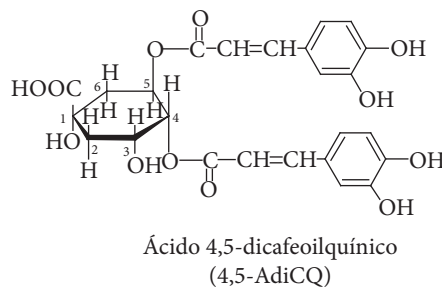
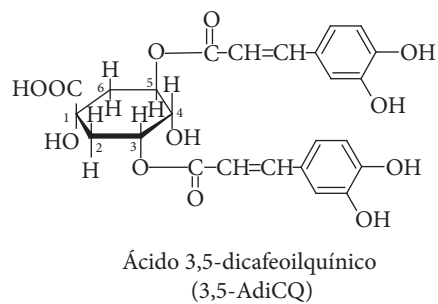


Figura 1. Principais compostos bioativos do café: ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina.

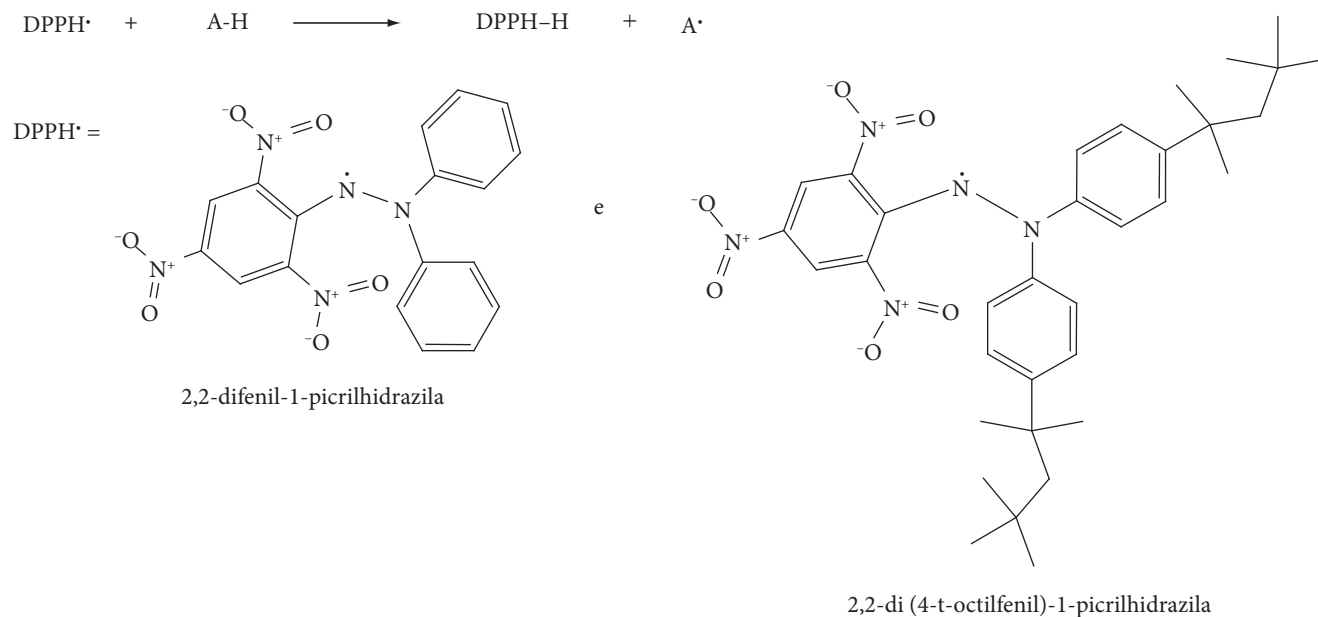


Figura 2. Estrutura dos radicais livres e estáveis DPPH e sua redução para DPPH-H pelos antioxidantes A-H presentes no café.

média em $8,0 \pm 1,0$ minutos e torra escura em $10 \pm 1,0$ minutos. As amostras foram moídas, peneiradas com peneira de malha de 0,710 mm (24 meshes), acondicionadas em sacos plásticos e mantidas refrigeradas a $-18,0 \pm 3,0$ °C até o momento da análise.

2.4 Determinação semiquantitativa de cafeína

O teor semiquantitativo de cafeína foi calculado de acordo com o método da AOAC, (1945). Cerca de 2,000 g de amostra

foram aciduladas com 4,00 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%) e aquecidas em banho-maria por 15 minutos. Em seguida, 50,00 mL de água quente foram adicionados e aqueceu-se por mais 15 minutos. Filtrou-se a quente, e o filtro foi lavado com mais 3 porções de 10,00 mL de uma solução de ácido sulfúrico 1,0 N a quente. O filtrado e as águas de lavagem foram recolhidos em um funil de separação. Após resfriamento, foi adicionado clorofórmio (30,00 mL). A mistura foi agitada e

esperou-se a separação das camadas. A camada clorofórmica foi decantada através de um filtro umedecido com clorofórmio para um balão de fundo chato, previamente tarado. A extração com clorofórmio foi repetida com mais 3 porções de 30,00 mL. A fase orgânica foi destilada até reduzir o volume à cerca de 20,00 mL e levada a banho-maria até *secura*. Logo após, o resíduo foi aquecido em estufa a 100 °C, por 1 hora, resfriado em dessecador e pesado. Foram realizadas três análises para cada amostra e calculou-se a média. O cálculo da percentagem de cafeína foi obtido através da Equação 1:

$$\text{Cafeína (\%)} = \frac{100 \times m}{P} \quad (1)$$

onde: m = gramas de cafeína; e P = gramas de amostra.

2.5 Obtenção do extrato metanólico

Cerca de 1,000 g de café torrado foi colocado em um béquer com 30,00 mL da mistura metanol: água (8:2, v/v). A mistura foi deixada por 24 horas à temperatura ambiente, com agitação e no escuro. A seguir, foi filtrada em papel de filtro qualitativo (Whatmann nº 4) e, deste filtrado, retirou-se uma alíquota de 1,00 mL para o cálculo de rendimento dos sólidos do extrato. O restante do filtrado obtido foi evaporado a uma temperatura menor de 40 °C para eliminar o metanol, resultando o extrato bruto (EB). Os teores de fenóis totais e proantocianidinas foram determinados a partir deste extrato (HAGERMAN, 2006).

2.6 Determinação do teor de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu

Retirou-se 0,10 mL do extrato bruto (EB), que foi diluído com metanol até o volume de 50,00 mL. Retirou-se desta solução uma alíquota de 0,50 mL que foi transferida para um tubo de ensaio ao qual adicionaram-se 2,50 mL de uma solução aquosa do reativo de Folin-Ciocalteu a 10% e 2,00 mL de uma solução recém-preparada de carbonato de sódio a 7,5%. Manteve-se esta mistura em um banho de água a uma temperatura de 50 °C por 5 minutos. Esfriou-se a amostra e registrou-se a absorvância, utilizando-se um espectrofotômetro de UV/VIS Hitachi 2000, a 760 nm contra um branco contendo os reagentes e água no lugar da amostra. Fez-se, também, uma curva de calibração com soluções aquosas de ácido gálico (10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). As soluções para construções das retas passaram pelas mesmas condições das amostras. As leituras foram feitas contra um branco. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (AKIYAMA, 2005; HAGERMAN, 2006).

2.7 Determinação de proantocianidinas (taninos condensados) pelo método da vanilina

Retirou-se 0,10 mL do extrato bruto e diluiu-se com água até o volume de 10,00 mL. Em um tubo de ensaio, colocou-se 1,00 mL do extrato diluído e adicionaram-se 2,00 mL de uma solução recém-preparada de vanilina em ácido sulfúrico 70% na concentração de 10,00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Aqueceu-se a solução resultante em banho de água a 50 °C por 15 minutos. Registrou-se a absorvância a 500 nm. Juntamente com os extratos, preparou-se uma curva de calibração com catequina (10, 15, 20, 25, 35 e 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Tanto as amostras quanto os padrões da curva de

calibração passaram pelo mesmo tratamento. A leitura foi feita contra um branco. Os resultados estão expressos em equivalentes de catequina (HAGERMAN, 2006).

2.8 Determinação de OH fenólicos e carboxílicos

O teor de OH fenólicos e carboxílicos foram determinados por titulação condutivimétrica (SARKANEN; SCHUERCH, 1955; ZAKIS, 1994). Cerca de 0,200 g de amostras foram solubilizadas em água (30,00 mL). Em seguida, os respectivos filtrados foram colocados em um balão de três bocas e titulados condutivimetricamente com uma solução de LiOH 0,1 molar, sob agitação em atmosfera de nitrogênio. Foram registradas as curvas de calibrações que apresentam o ponto de equivalência para a ionização dos grupos carboxílicos e hidroxílicos. A porcentagem de hidroxilas (carboxílicas e fenólicas) foi determinada pela Equação 2:

$$\text{OH}_{\text{total}} (\%) = \frac{M \times V \times 1700}{m} \quad (2)$$

onde: M = molaridade da solução de LiOH; V = volume da solução de LiOH (mL); e m = massa de café em mg.

2.9 Determinação de compostos bioativos por CLAE

Os compostos bioativos (trigonelina, ácidos clorogênicos, ácido caféico e cafeína) foram determinados simultaneamente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (CASAL; OLIVEIRA; FERREIRA, 1998). Cerca de 2,000 g de cada amostra livre de umidade foi submetida a uma extração com 20,00 mL de água em ebulição por 5 minutos com agitador magnético. O extrato foi transferido para um balão volumétrico de 100,00 mL e diluído para o volume marcado. Uma alíquota do balão foi filtrada, através de um filtro de ponta de seringa de porosidade de 0,45 μm , e utilizada nas análises cromatográficas. A CLAE foi realizada em um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu modelo SCL-10A VP equipado com detector SPD-M10A VP do tipo *diode-array*. Foi usada uma coluna de fase reversa da marca Shimadzu modelo CLC-ODS (M), empacotada com grupo octadesil. O volume injetado (*loop*) foi de 20,0 μL . Foi usado um sistema de solventes com gradiente de tampão de fosfato (A) preparado com 5% de solução de fosfato diácido de potássio 0,2 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ e metanol (B).

Foram feitas curvas de calibração para os padrões utilizados. A leitura da absorvância foi medida em 213 nm para trigonelina; 263 para o ácido nicotínico; 269 nm para cafeína; 310 nm para ácido caféico; e 323 nm para o ácido 5-cafeoilquinico, sendo registradas as absorvâncias máximas para cada composto.

2.10 Atividade antioxidante e cálculo de CE_{50}

A atividade antioxidante do extrato foi determinada, através do radical livre estável 2,2-di(4-*t*-octilfenil)-1-picrilhidrazila (DPPH) seguindo o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e modificado por Yildirim, Mavi e Kara (2001). O pó dos cafés foi submetido à extração com água destilada (cerca de 1,000 g em 10,00 mL por 15 minutos a 100 °C). A solução obtida foi filtrada e teve seu volume ajustado para

o volume final de 50,00 mL. Para quantificação dos extrativos solúveis, 1,00 mL deste extrato foi recolhido e secado num frasco tarado de 5,00 mL a 105 °C, durante 6 horas, resfriado à temperatura ambiente e pesado. O filtrado foi submetido a 5 diluições sucessivas. Para cada solução, foi tomada uma amostra de 0,10 mL e adicionados 3,90 mL de solução de DPPH de concentração aproximada de 80 µg.mL⁻¹ em metanol. Também, foi feito um branco nas mesmas condições, mas sem o DPPH. Após a adição do radical DPPH, as soluções foram deixadas em repouso e suas absorvâncias registradas no comprimento de onda de 531 nm durante uma hora, em intervalos de cinco minutos entre cada leitura. A porcentagem de DPPH-H que reagiu (atividade antioxidante) foi calculado pela Equação 3:

$$\text{DPPH-H (\%)} = \frac{\text{AbvC} - (\text{AbvA} - \text{AbvB}) \times 100}{\text{AbvC}} \quad (3)$$

onde: AbvC, AbvB e AbvA correspondem às absorvâncias do controle, branco e amostra, respectivamente.

A concentração efetiva média (CE₅₀), que representa a concentração de amostra necessária para seqüestrar 50% dos radicais de DPPH, foi calculada plotando a porcentagem de DPPH-H versus as concentrações dos extratos de cada amostra (ARGOLO et al., 2004).

2.11 Análises estatísticas

Todas as determinações foram feitas em triplicatas e os resultados correspondem à média ± o desvio padrão. As médias foram analisadas estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3 Resultados e discussão

3.1 Cafeína

A Figura 3 apresenta os teores de cafeína determinados pelo método gravimétrico nas amostras de café e de PVA.

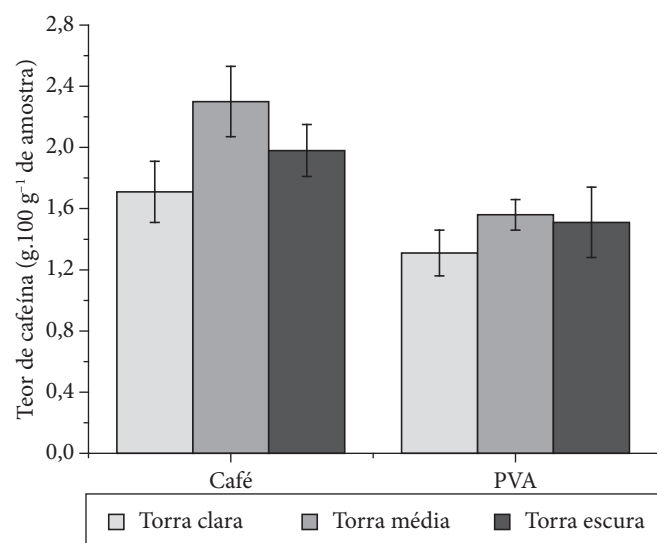


Figura 3. Teores de cafeína nas amostras de café e de PVA.

O conteúdo de cafeína obtido pelo método gravimétrico, embora seja semiquantitativo, serve para comparar os teores deste alcalóide nas amostras de café e de PVA (DE MARIA; MOREIRA, 2007). Os resultados indicam que o café apresenta uma quantidade maior desse alcalóide independentemente da torra. Comparando-se a média das concentrações das três torras do café com a do PVA, a diferença foi significativa ($p < 0,05$). Comparando-se apenas as três torras do PVA, não houve diferença significativa. Já nas amostras do café, a diferença entre as torras, embora pequena, foi significativa, principalmente entre as torras média e clara. A pequena diferença nos teores de cafeína nas três torras se deve a sua alta estabilidade térmica (MONTEIRO; TRUGO, 2005). Nas torras claras, o conteúdo menor da cafeína é justificado pelo fato deste alcalóide ainda não estar totalmente liberado das matrizes do café e do PVA e, na torras escuras, já houve ligeira degradação térmica.

3.2 Fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu

A Figura 4 apresenta o gráfico comparativo do teor de fenóis totais para as diferentes amostras analisadas.

A porcentagem de fenóis totais reduziu-se com o aumento do grau de torração, este fato foi observado tanto para o café como para o PVA. De acordo com Menezes (1994), na torração, os compostos fenólicos são gradualmente decompostos resultando na formação de voláteis do aroma, materiais poliméricos e liberação de CO₂. Para Clifford (1999), a presença de compostos fenólicos no café em quantidades maiores é associada à desvalorização de sua qualidade, pois eles são responsáveis pela adstringência e interferem no seu sabor e aroma após a torração, justificando assim a menor qualidade da bebida feita a partir de grãos PVA. Entretanto, comparando-se as médias do teor de fenóis das torras do café e do PVA, não se observa diferença significativa, principalmente nas torras escuras que são usadas comercialmente.

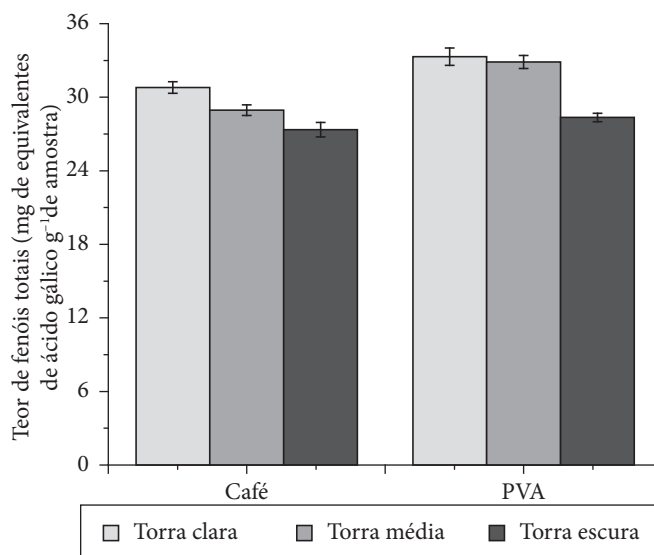


Figura 4. Teores de fenóis totais nas amostras de café e de PVA.

3.3 Proantocianidinas pelo método da vanilina

A Figura 5 apresenta o gráfico comparativo do teor de proantocianidinas totais para as diferentes amostras analisadas.

O teor de proantocianidinas, um dos constituintes responsáveis pela adstringência (HASLAM, 1989; RICARDO-DA-SILVA, 1991), aumentou com a elevação do grau de torração. Isto foi observado tanto para o café quanto para o PVA e foi mais acentuado no PVA. Embora não tenha havido diferenças significativas entre as médias das torras de café e de PVA, houve um aumento significativo do teor de proantocianidinas ao aumentar-se a temperatura tanto para o café como para o PVA, o que sugere que o conteúdo deste constituinte foi gradualmente liberado da matriz do café e/ou formado com o rigor da torra.

3.4 OH fenólicos e carboxílicos

A Figura 6 apresenta o gráfico comparativo do teor de hidroxilas totais (carboxílicas + fenólicas) para as diferentes amostras analisadas.

Observa-se que o teor de grupos hidroxila ácidos é maior no PVA do que no café, para cada tipo de torra, e que esse teor diminuiu ligeiramente com a severidade da torra para as duas bebidas. Isto era esperado porque os grãos de PVA são mais fermentados (conseqüentemente mais oxidados) do que os de café sadio. Por outro lado, a torração provoca a degradação dos compostos que contêm grupos OH, resultando na formação de voláteis do aroma, dióxido de carbono e outros compostos pouco voláteis. Comparando-se a média dos teores desses grupos ácidos das três torras do café com a das três torras do PVA, houve diferença significativa, o que não ocorreu internamente tanto no café como no PVA.

3.5 Compostos bioativos

A Figura 7 apresenta os teores de compostos bioativos das duas amostras.

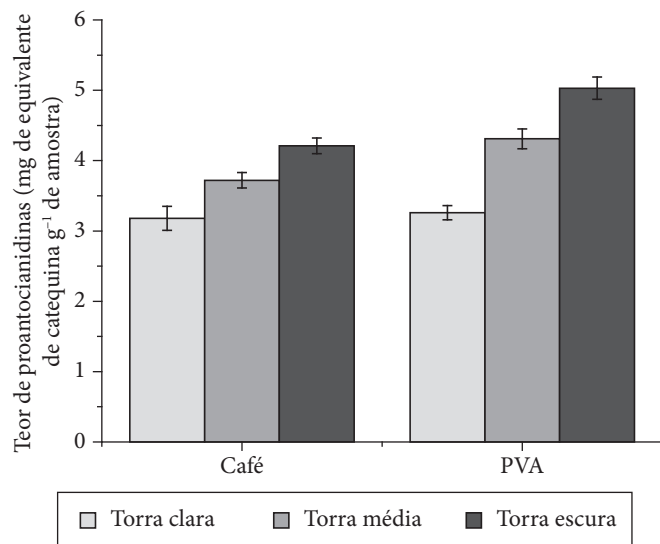


Figura 5. Teores de proantocianidinas nas amostras de café e de PVA.

As amostras do café e do PVA de torra clara apresentaram teores superiores de compostos bioativos com exceção da cafeína. Os ácidos caféico e nicotínico não foram identificados nas condições de análise empregadas, provavelmente, por apresentarem concentrações abaixo do limite de detecção do método que correspondeu a 0,002 e 0,007 mg.mL⁻¹, respectivamente.

Os teores de trigonelina e ácidos clorogênicos (ACG) foram ligeiramente superiores no PVA e foram altamente sensíveis com o grau de torra, diminuindo drasticamente com o rigor da

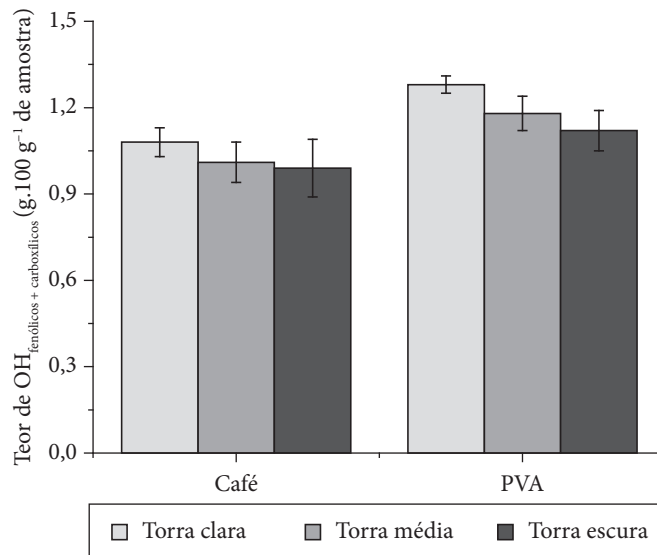


Figura 6. Teores de grupos hidroxila ácidos nas amostras de café e de PVA.

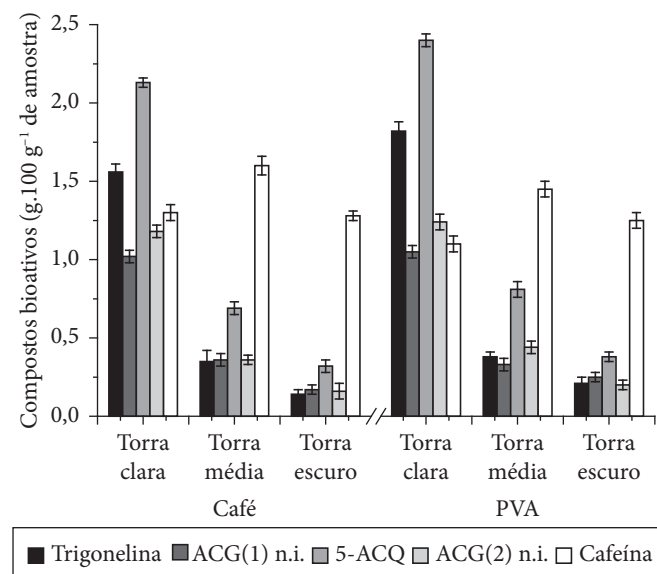


Figura 7. Teores de compostos bioativos nas amostras de café e de PVA. ACG (1) n.i. = ácido clorogênico (1) não identificado; 5-ACQ = ácido 5-cafeoilquiníico; e ACG (2) n.i. = ácido clorogênico (2) não identificado.

torra. Segundo De Maria, Moreira e Trugo (1999), a trigonelina durante o processo de torração é rapidamente degradada, formando diversos produtos, que incluem produtos voláteis como piridinas, *N*-metilpirrol e niacina. Comparando-se a média dos teores de trigonelina das três torras do café com a do PVA, não houve diferenças significativas. Por outro lado, as torras do café apresentaram diferenças significativas entre si, o mesmo ocorrendo entre as torras do PVA.

Os ácidos clorogênicos são bastante degradados durante a torração, contribuindo amplamente para o aroma e sabor finais da bebida. Com a degradação destes ácidos muitos outros produtos podem ser formados com perda de até 90% em torras mais severas (TRUGO; MACRAE, 1984). Comparando-se a média dos teores de ácidos clorogênicos das três torras do café com a do PVA, não se observam diferenças significativas, enquanto que, entre as torras do café, as diferenças foram significativas, o mesmo ocorrendo entre as torras do PVA.

A variação nos teores de cafeína com o grau de torra não foi significativa, porém observou-se um aumento na torra média em relação à torra clara e um ligeiro decréscimo nas torras escuras, sendo seu conteúdo ligeiramente superior no café. Não se observou diferença significativa ao se comparar a média das torras do café com a das torras do PVA. Este dado contraria a análise gravimétrica (item 3.1) e é justamente por ser menos exato que aquele método é considerado semiquantitativo. Tampouco foi observada variação significativa no teor de cafeína entre as torras clara e escura nas amostras de café; já nas torras do PVA as diferenças foram significativas.

3.6 Atividade antioxidante e CE_{50}

No café, o número de moléculas de DPPH que são reduzidas está correlacionado com o teor de fenóis, cujo ácido clorogênico é um dos constituintes. Produtos da reação de Maillard, cafeína, trigonelina e constituintes voláteis, tais como furanos e pirróis, também contribuem para a redução do DPPH (NEBESNY; BUDRYN, 2003).

Não houve um consumo significativo de DPPH acima de 5 minutos de reação e todas as amostras apresentaram consumo muito rápido de DPPH. Já nos primeiros minutos da reação, praticamente toda amostra foi consumida, sugerindo que se trata de uma reação de cinética muito rápida (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). A Figura 8 mostra o comportamento cinético das amostras de café e de PVA (cerca de 100 ppm) frente ao DPPH para as três torras.

A Figura 9 apresenta a porcentagem de atividade antioxidante das amostras de aproximadamente 100 ppm de café e de PVA em 40 minutos de reação e a Figura 10 mostra a quantidade necessária de amostra para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE_{50} - expresso em mg de amostra mg^{-1} de DPPH).

Os resultados acima mostraram que o café e o PVA apresentam atividade sequestradora do radical DPPH nas três torras. A quantidade necessária do extrato de amostras do café e do PVA, necessárias para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% (CE_{50}), variou de $1,50 \pm 0,35$ a $2,78 \pm 0,40$ nas

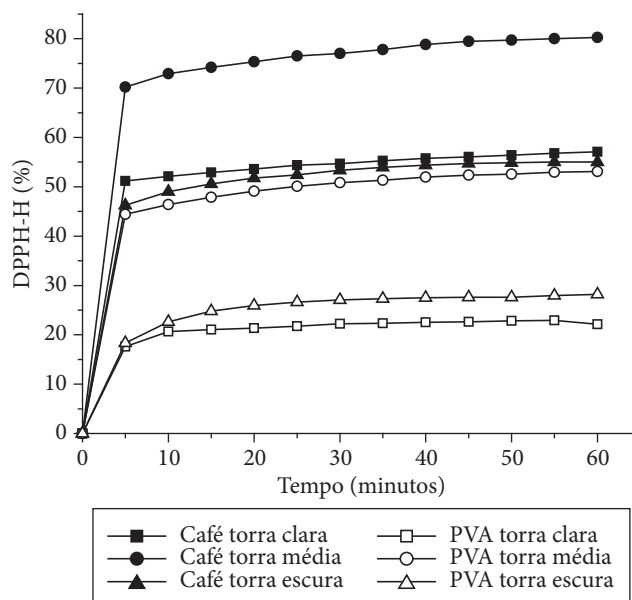


Figura 8. DPPH consumido na reação com as amostras de café e de PVA (~100 ppm).

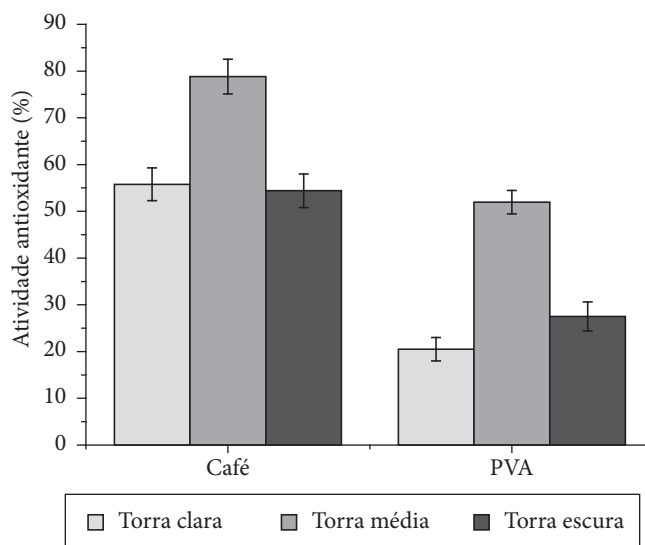


Figura 9. Porcentagem de atividade antioxidante das amostras de café e de PVA (~100 ppm) reagido com DPPH, tempo de reação de 40 minutos.

torras do café e de $3,45 \pm 0,40$ a $6,60 \pm 0,73$ nas torras do PVA, sendo que as amostras de torra média, tanto do café como do PVA, foram as que apresentaram maior poder antioxidante. Comparando-se as médias dos três tipos de torra, o valor do CE_{50} foi de $2,19 \pm 0,38$ para o café e $5,09 \pm 0,54$ para o PVA. Estas diferenças são significativas e contrariam a literatura (NEBESNY; BUDRYN, 2003) porque o PVA apresentou maior quantidade de fenóis totais que o café.

Examinando-se somente a variação dos teores dos constituintes analisados, cafeína, fenóis totais, proantocianidinas, grupos hidroxila ácidos, trigonelina e ácidos clorogênicos, não foi possível explicar a superioridade da atividade antioxidante

observada na torra média do café. DEL Castillo, Ames e Gordon (2002) encontraram, também para o café arábica, um aumento do grau de atividade antioxidante na reação com ABTS (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico), a qual aumentou nos grãos verdes até a torra média e caiu acentuadamente na torra escura. Segundo Nicoli et al. (1998), a formação de melanoidinas, que possuem elevado potencial antioxidante, ocorre somente em determinadas fases da torra o que explicaria a superioridade da torra média. Outro autor (MENEZES, 1994) relata que os ácidos clorogênicos ainda continuam contribuindo para a atividade sequestradora do radical DPPH, uma vez que, durante o rigor da torra, estes constituintes são degradados a outros compostos ácidos (Figura 11) ou polimerizados com outros constituintes do café formando melanoidinas.

Os resultados encontrados no presente trabalho estão em desacordo com as afirmações tanto de Nicoli et al. (1998) como de Menezes (1994), pois o PVA apresentou maior quantidade de ácidos clorogênicos do que o café na torra média, sendo a atividade antioxidante do café muito superior à do PVA.

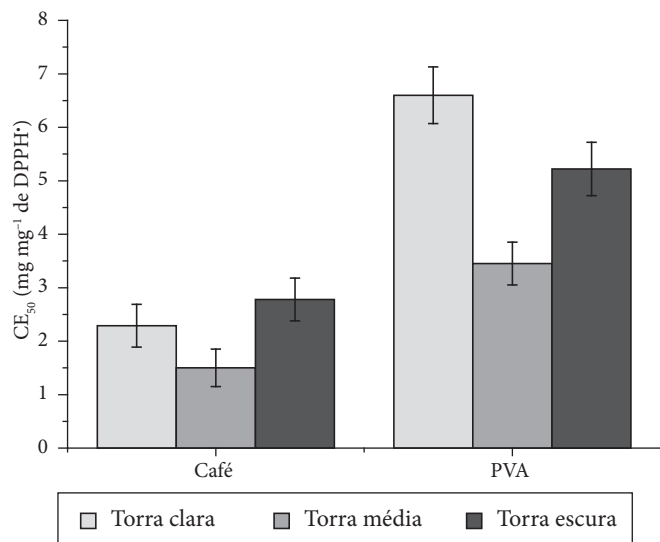


Figura 10. Concentração efetiva média (CE₅₀ em mg.mg⁻¹ de DPPH) calculada para as amostras de café e de PVA.

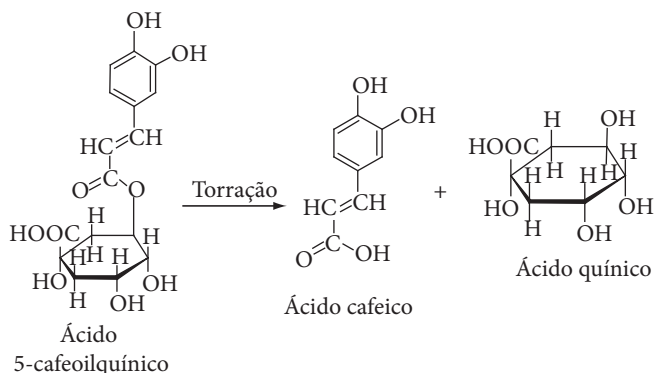


Figura 11. Reação do ácido 5-cafeoilquínico durante o processo de torração.

Comparando-se ainda as médias obtidas das três torras para os dois tipos de bebida, a média das torras do café apresentou um teor superior de cafeína (Figura 3), e a do PVA, uma quantidade superior de hidroxilas ácidas (Figura 6), ambas com diferenças significativas. Já nas médias das torras para os teores de fenóis totais e de proantocianidinas (Figuras 4 e 5, respectivamente) não houve diferenças significativas. Portanto, isto também não explica os resultados dos ensaios de atividade antioxidativa.

Em realidade, os resultados do presente trabalho não permitem explicar a grande diferença observada na atividade antioxidante do café frente ao PVA na torra média, principalmente.

4 Conclusões

Considerando-se a média das três torras do café e a do PVA, foi observado que as diferenças nos teores de cafeína (CLAE), trigonelina, proantocianidinas, fenóis totais e ácidos clorogênicos não foram estatisticamente significativas, exceto o teor de grupos hidroxila ácidos que foi ligeiramente superior no PVA e cafeína, calculada pelo método semiquantitativo, que foi superior no café. Portanto, dentre esses constituintes, os compostos com grupos ácidos seriam os únicos que poderiam contribuir para explicar a grande diferença de sabor existente entre o café de grãos sadios e o de PVA.

Tanto o café como o PVA apresentaram atividade sequestradora do radical DPPH nas três torras, sendo a atividade do café sempre superior. Analisando-se as variações dos teores de cafeína, fenóis totais, proantocianidinas, grupos hidroxila ácidos, trigonelina e ácidos clorogênicos, não foi possível explicar a atividade antioxidante superior apresentada pelo café de torra média (CE₅₀ de 2,3 mg.mg⁻¹ de DPPH).

Agradecimentos

Ao Instituto de Química pelo suporte de infra-estrutura; e à FAPEMIG pelo apoio financeiro referente ao financiamento do projeto (REF. CEX-656/05).

Referências bibliográficas

- ABIC. **Sabor do café: história do café.** Disponível em: <http://www.abic.com.br/safe_historia.html>. Acesso em: 29 nov. 2005.
- ALVES, B. H. P. **Análise comparativa da composição química de cafés do Cerrado mineiro e do Sul de Minas Gerais.** Uberlândia, 2004. 91f. Dissertação - (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia.
- ALVES, B. H. P. et al. Quantificação de compostos não-voláteis da bebida do café das regiões do Cerrado e do Sul de Minas Gerais. In: REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 27, 2004, Poços de Caldas. **Livro de Resumos...** Poços de Caldas: SBQ, PN 192, 2004.
- AKIYAMA, M. et al. Characterization of flavor compounds released during grinding of roasted robusta coffee beans. **Food Science and Technology Research**, v. 11, n. 3, p. 298-307, 2005.
- ANDERSEN, L. F. et al. Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardiovascular diseases in the Iowa Women's Health Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 5, p. 1039-1046, 2006.

- ANESE, M.; NICOLI, M. C. Antioxidant properties of ready-to-drink coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 942-946, 2003.
- AOAC. **Official and tentative methods of analysis**. 6 ed. Washington, D. C.: Association of Official Agricultural Chemists, 1945.
- ARGOLO, A. C. et al. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 2, p. 229-233, 2004.
- ATOUI, A. K. et al. Tea and herbal infusions: their antioxidant. Activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-39, 2005.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa no 8**, de 11 de junho de 2003. Dispõe sobre a classificação dos grãos de cafés. Disponível em: <http://www.abic.com.br/arquivos/abic_nm_a1d_inst_normativa08.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2005.
- CASAL, S.; OLIVEIRA, M. V.; FERREIRA, M. A. Development of an HPLC/diode-array detector method for simultaneous determination of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in coffee. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 21, n. 20, p. 3187-3195, 1998.
- CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1033-1043, 2000.
- 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**, v. 50, n. 13, p. 3698-3703, 2002.
- DE LAU, L. M. L.; BRETILER, M. M. B. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurology**, v. 5, n. 6, p. 525-535, 2006.
- DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.
- DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Analytical methods for caffeine. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.
- GLAUCO, R. C. **O mercado de café em perspectiva**. Conjuntura Agropecuária: Café - Jan/2006. Disponível em: <www.cnpm.embrapa.br/conjuntura/0601_Cafe.pdf>. Acesso em: 20 out. 2006.
- HAGERMAN, A. E. **Tannin chemistry**. Disponível em: <<http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2006.
- HASLAM, E. **Plant polyphenols: vegetable tannins revisited**. Cambridge: University Press, 1989. 240 p.
- HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: A review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 2 p. 101-123, 2006.
- JOHNSON-KOZLOW, M. et al. Coffee consumption and cognitive function among older adults. **American Journal of Epidemiology**, v. 156, n. 9, p. 842-850, 2002.
- KAWACHI, I. et al. A prospective study of coffee drinking and suicide in women. **Archives of Internal Medicine**, v. 156, n. 5, p. 521-525, 1996.
- LUNA-FILHO, E. P. **Cafés do Brasil e indicações geográficas**. Disponível em: <<http://www.coffeefreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=99>>. Acesso em: 11 jan. 2007.
- MASCHIO, J. Agrofolha: Nova regra do governo sobre café divide o setor. **Folha de São Paulo**, 8 jul. 2003. Caderno de dinheiro, p.B10.
- MENDONÇA, J. C. F. et al. Estudo preliminar de caracterização física e química de grãos defeituosos de café (PVA) antes e após a torra. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 7, n. 8, p. 44-49, 2003.
- MENEZES, H. C. **Varição dos monômeros e diisômeros do ácido cafeoilquínico com maturação de café**. Campinas, 1994. 171 p. Tese - (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Instituto de Química, Universidade de Campinas.
- MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determination of bioactive compounds in Brazilian roasted coffees. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 637-641, 2005.
- MORAIS, S. A. L. et al. Constituintes voláteis e volatilizáveis do café torrado do Cerrado e efeito da colheita e irrigação em sua composição. **Revista Ceres**, v. 49, n. 283, p. 295-297, 2002.
- NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L.; ROCHA, R. S. Constituintes voláteis de cafés gourmet e mole do cerrado do Triângulo Mineiro em função da torra. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 282-284, 2003.
- NASCIMENTO, E. A. et al. Análise dos odorantes potentes presentes nos cafés arábicas da Colômbia e do sul de Minas Gerais. **Cafeicultura**, ano IV, n. 11, p. 24-26, 2006.
- NEBESNY, E.; BUDRYN, G. Antioxidative activity of green and roasted coffee beans as influenced by convection and microwave roasting methods and content of certain compounds. **European Food Research and Technology**, v. 217, n. 2, p. 157-163, 2003.
- NICOLI, M. C. et al. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 425-430, 1998.
- OLIVEIRA, G. S. **Comparação química dos grãos de café (Coffea arabica) sadio e seus grãos PVA (pretos, verdes, ardidos) oriundos do Sul de Minas e do Cerrado Mineiro, submetidos a diferentes graus de torração**. Uberlândia, 2006. 113f. Dissertação - (Mestrado em Química), Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia.
- PEREIRA, M. A.; PARKER, E. D.; FOLSOM, A. R. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus - an 11-year prospective study of 28 812 postmenopausal women. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, n. 12, p. 1311-1316, 2006.
- PIMENTA, C. J. **Qualidade de Café**. Lavras: Editora UFLA, 2003. 304 p.
- RICARDO-DA-SILVA, J. M. et al. Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 57, n. 1, p. 111-125, 1991.
- SAES, M. S. M.; FARINA, E. M. M. Q. **O Agribusiness do Café no Brasil**. São Paulo: Editora Milkbizz, 1999. 230 p.
- SAES, M. S. M.; NAKAZONE, D. O agronegócio café do Brasil no mercado internacional. **Revista Fae Business**, v. 9, set, p. 40-42, 2004.
- SARKANEN, K.; SCHUERCH, C. Conductometric determination of phenolic groups in mixtures such as isolated lignins. **Analytical Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 1245-1250, 1955.
- SCHALLER, E.; BOSSET, J. O.; ESCHER, F. Electronic noses and their application to food. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v. 31, n. 4, p. 305-16, 1998.
- SIGMA-ALDRICH. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/SearchResultsPage>>. Acesso em: 20 mar. 2007.
- SVILAAS, A. et al. Intakes of antioxidants in coffee, wine, and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 562-567, 2004.

- TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L. C. Effect of decaffeination using dichloromethane on the chemical composition of arabica and robusta raw and roasted coffees. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 965-971, 2006.
- TOLEDO, J. L. B.; BARBOSA, A. T. **Classificação e degustação de café**. Brasília: Sebrae; Associação Brasileira da Indústria do Café, 1998. 95 p.
- TRUGO, L. C.; MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffee. **Analyst**, v. 109, n. 3, p. 263-270, 1984.
- WINSTON, A. P.; HARDWICK, E.; JABERI, N. Neuropsychiatric effects of caffeine. **Advances in Psychiatric Treatment**, v. 11, n. 6, p. 432-439, 2005
- YANAGIMOTO, K. et al. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 592-596, 2004.
- YEN, W. J. et al. Antioxidant properties of roasted coffee residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2658-2663, 2005.
- YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001.
- ZAKIS, G. F. **Functional analysis of lignins and their derivatives**. Atlanta: Tappi Press, 1994. 91 p.