

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA CAFEIEIRA¹

Ingridy Simone Ribeiro²; Mário Lúcio Vilela de Resende³; Ana Cristina Andrade Monteiro⁴; Deila Magna dos Santos Botelho⁵; Marcelo Reis Casagrande⁶

¹Trabalho financiado pelo Instituto de Ciência e Tecnologia do Café (INCT-Café), CNPq, FAPEMIG, COOXUPÉ.

²Bolsista do CNPq, DSc, Pós-Doutoranda do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, ingridyribeiro@gmail.com

³Professor Titular, PhD, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, mlucio@dfp.ufla.br

⁴Bolsista da CAPES, DSc, Pós-Doutoranda do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, monteiroaca@yahoo.com.br

⁵Bolsista da CAPES, DSc, Pós-Doutoranda do Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, deilamagna@hotmail.com

⁶Colaborador, Engenheiro de Produção, Cooperativa Regional de Cafeicultores em Guaxupé, Guaxupé-MG, casagrande@cooxupé.com.br

RESUMO: O processamento dos frutos e o beneficiamento dos grãos de café geram grandes quantidades de resíduos que podem ser aproveitados como matéria-prima para novos produtos, extração de compostos para a indústria de alimentos e fármacos e geração de energia. O objetivo deste trabalho foi analisar a composição química e a atividade antioxidante de extratos aquosos do resíduo proveniente da extração de óleo dos grãos de café PVA e RA44. Foram analisados a composição centesimal, o teor de compostos fenólicos, ácido clorogênico, cafeína e vitamina C, e atividade antioxidante pelo método do DPPH. Foi possível observar que os extratos apresentaram, respectivamente, valores semelhantes para o teor de umidade (53,67 e 51,84%), proteína bruta (8,67 e 8,71%) e lipídeos (4,03 e 8,18%). O extrato RA44 apresentou o dobro do teor de açúcares totais (8,18%) do PVA (4,03). Os teores de compostos fenólicos (6,05 e 6,62%) e ácido clorogênico (1,64 e 1,49%) foram semelhantes, já para cafeína, o maior teor foi no RA44 (1,54%) e para a vitamina C, no PVA (62,75 mg/Kg). O extrato PVA apresentou melhor atividade antioxidante, com IC50 de 76,70 µg/mL contra 129,02 mg/mL para o RA44. Os resultados são promissores pois mostraram que os extratos apresentam quantidades significativas de compostos bioativos e atividade antioxidante *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: subprodutos de café, atividade antioxidante e compostos fenólicos

CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COFFEE BY PRODUCTS

ABSTRACT: The processing of fruit and coffee beans generate large amounts of waste that can be used as raw material for new products, extraction of compounds for the food industry and pharmaceuticals and power generation. The main objective of this study was to analyze the chemical compositions and antioxidant activities of two hot water extracts from pressed green coffee beans, here named PVA and RA44. These beans were processed for oil extraction beforehand. Chemical composition, phenolic compounds content, chlorogenic acid, caffeine and vitamin C, besides antioxidant activity by DPPH method were analyzed. It was observed that PVA and RA44 extracts presented, respectively, humidity (53.67 and 51.84%), protein (8.67 and 8.71 %) and lipids (4.03 and 8.18 %). The RA44 extract showed twice the total sugar content (8.18%) of PVA (4.03%). The phenolic content (6.05 and 6.62 %) and chlorogenic acid (1.64 and 1.49%) were similar for both extracts. Caffeine content was higher in RA44 (1.54 %) and the vitamin C in PVA (62.75 mg/kg). PVA extract showed higher antioxidant activity, with IC50 of 76.70 µg/mL against 129.02 µg/mL for RA44. Therefore, it was demonstrated that PVA and RA44 extracts contain significant amounts of bioactive compounds and exhibited *in vitro* antioxidant activities.

KEYWORDS: coffee by products, antioxidant activity, phenolic compounds.

INTRODUÇÃO

A grande produção e o consumo crescente de café no Brasil levam a geração de uma enorme quantidade de resíduos que representam perda de matéria-prima e energia e se dispostos inadequadamente podem gerar um problema ambiental devido ao grande acúmulo de matéria orgânica no meio ambiente. Apesar da grande quantidade de resíduos gerados no meio agrícola e agroindustrial, apenas uma pequena porcentagem é aproveitada em razão do desconhecimento da potencial reutilização.

Na região sul de Minas Gerais, Brasil, a cafeicultura dá origem a um volume elevado de subprodutos e resíduos, cuja utilidade tem sido objeto de diversos estudos. No entanto, a quantidade e a constituição química destes materiais podem variar amplamente de acordo com o tipo de resíduo, propiciando-lhes características diferentes. Uma alternativa para a minimização destes é a reciclagem, por meio do reuso ou recuperação dos mesmos ou de seus constituintes que apresentem algum valor econômico.

O grão de café possui uma grande variedade de minerais, aminoácidos, lipídios, açúcares, vitaminas, cafeína e em maior quantidade que todos os demais componentes, os ácidos clorogênicos, que são os principais compostos bioativos presentes no café. Portanto, os resíduos gerados pela indústria de café são potenciais fontes de muitos desses compostos e estudos apontam que extratos naturais contendo compostos bioativos têm ganhado importância nas indústrias de alimentos e de fármacos, pois podem ser incorporados em formulações de alimentos funcionais, de produtos nutracêuticos, de cosméticos e de produtos para uso medicinal (LAUFENGERG et al., 2003; MELO et al., 2011). Esses compostos podem ainda ser utilizados como aditivos naturais em alimentos, pois os antioxidantes sintéticos usados pela indústria de alimentos despertam preocupação quanto as suas doses de segurança e toxicidade (BALASUNDRAM et al., 2006).

Os compostos fenólicos têm sido sugeridos como potencialmente quimioprotetores em diferentes sistemas químicos e biológicos, devido a sua atividade antioxidante e capacidade de modular a atividade de uma variedade de enzimas e receptores celulares (SHUI; LEONG, 2006; DAI; MUNPER, 2010).

Outra forma de aproveitamento dos resíduos gerados pela indústria cafeeira é seu uso na agricultura, como fonte de defensivos agrícolas naturais que são uma alternativa segura e saudável de produção agrícola. Estudos apontam que extratos de plantas, quando adicionados à insumos agrícolas, aumentam a sua eficácia (sinergismo), permitindo a redução das doses aplicadas com expressivo ganho ambiental e econômico. Diante do exposto, uma alternativa para o aproveitamento dos resíduos e subprodutos gerados pela indústria de café seria a caracterização química dos mesmos para posterior reuso ou recuperação de compostos bioativos.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição centesimal, o teor de compostos bioativos e a atividade antioxidante de extratos aquosos de resíduos da indústria cafeeira.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados resíduos produzidos em grande escala na Cooperativa Regional de Cafeicultores em Guaxupé, Coaxupé (Guaxupé-MG), sendo estes codificados como PVA e RA44. Tais resíduos foram provenientes da extração do óleo de grãos não utilizados no processamento do café.

Foram pesados 20 kg de resíduos e adicionados 100 L de água. A extração foi feita padronizando-se o tempo até atingir o ponto de fervura e pressão de 100 KPa. Em seguida, o extrato foi centrifugado e concentrado até 50° Brix.

O teor de umidade, proteínas, lipídeos e açúcares totais foram determinados em triplicata seguindo os métodos preconizados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000) e as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

Para determinar o teor de compostos fenólicos, uma alíquota de cada um dos extratos (0,5 mL) a 1 mg/mL foi misturada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada 1:10) e 2,0 mL de Na₂CO₃ 4% (m/v) em água destilada. Após 2 h de incubação ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 740 nm. Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g), calculados por meio de uma curva construída com concentrações que variaram de 5 a 100 µg/mL (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

As análises por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência foram feitas injetando-se dois microlitros de cada extrato em um cromatógrafo líquido, marca Waters, acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos a 240 nm e uma coluna Waters Acquity UPLC BHE C18 (2,1 x 100 mm), com tamanho da partícula 1,7µm. A fase móvel utilizada foi água/ácido acético (99,5:0,5 v/v) (solvente A) e água/ácido acético/n-butanol (92,5:0,5:7 v/v) (solvente B). O fluxo foi de 0,45mL/min. O gradiente utilizado foi o seguinte: 10% solvente A (24 s); 5% de A (até 2 min e 24 s); 5% de A (3 min e 24 s); 1% de A (até 3 min e 30 s); 1% de A (4 min e 30 s); 5% de A (até 4 min e 48 s); 5% de A (4 min e 54 s); 10% de A (até 8 min). A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 40 °C e os cromatogramas foram processados utilizando o *software Empower PRO*. Os compostos foram identificados pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos, pela comparação do tempo de retenção e co-cromatografia de padrões. Foram utilizados os padrões autênticos de ácido clorogênico, cafeína e ácido ascórbico.

Para a análise da atividade antioxidante, diferentes concentrações das amostras (entre 400 e 1,56 µg/mL, em diluição seriada de razão 2) em uma solução etanólica (2 mL) foram misturados com 0,5 mL de DPPH (0,5 mM, diluído em etanol). Depois da incubação por 30 min, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, a absorbância foi medida em 517 nm. O branco foi composto por todos os reagentes, exceto os extratos. Ácido ascórbico e BHT foram utilizados como controle positivo. A propriedade de sequestro foi calculada em porcentagem de radicais DPPH sequestrados, usando a seguinte equação: Sequestro de radical DPPH (%) = [(absorbância do branco – absorbância da amostra) / (absorbância branco)] x 100. Os valores foram apresentados como média das análises em triplicata. O valor EC₅₀ é a concentração efetiva que pode sequestrar 50% dos radicais DPPH da solução (YEN et al., 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises dos teores de umidade, proteína bruta, extrato etéreo e açúcares totais encontram-se na Tabela 1. Foi possível observar para a composição centesimal que para umidade, proteína e lipídeos, os teores apresentaram-se semelhantes entre as amostras (Tabela 1). O teor de proteína bruta ficou entre 8,0% e o extrato etéreo foi em torno de 2,0%. Já para os açúcares totais, observou-se que o teor do extrato aquoso RA44 foi aproximadamente o dobro (8,18%) com relação ao extrato aquoso PVA (4,03%).

Tabela 1. Composição centesimal dos extratos aquosos PVA e RA44

Análises (Compostos)	PVA	RA44
Umidade e voláteis (%)	53,67 ± 0,4	51,84 ± 0,2
Proteína bruta (%)	8,67 ± 0,3	8,71 ± 0,1
Extrato etéreo (%)	2,08 ± 0,0	2,10 ± 0,0
Açúcares totais (%)	4,03 ± 0,6	8,18 ± 0,1

Valores expressos como média (n=3) ± desvio padrão

De acordo com Vasconcellos et al. (2005), o grão identificado como PVA apresentou 14,72% de proteína e 8,30% de lipídeos. Os teores de proteína e lipídios encontrados na composição centesimal dos extratos aquosos dos subprodutos PVA e RA44 são inferiores aos encontrados para o grão de café *in natura*. Esse fato era esperado, já que o material foi submetido à outros processamentos, como a extração de óleo.

O grão de café verde possui alto teor de carboidratos (em torno de 60% do peso seco) incluindo polissacarídeos solúveis e insolúveis. O teor de lipídeos é entre 8-18% (peso seco), com Arábicas sendo significativamente maior que Robustas. Proteínas, peptídeos e aminoácidos livres somam entre 9-16% (peso seco), sendo os principais aminoácidos a asparagina, ácido glutâmico, alanina, ácido aspártico e lisina (LUDWIG et al., 2014). De acordo com os resultados obtidos (Tabela 2), pode-se verificar que o extrato aquoso RA44 apresentou teor de compostos fenólicos totais maior (6,62 g AG/100g) que o extrato aquoso PVA (6,05 g AG/100g). Estudos mostram que a concentração de polifenóis é baixa quando seus teores se encontram abaixo de 1g EAG/100 g; média, quando estão entre 1 e 5g EAG/100 g e alta, quando estão acima de 5g EAG/100 g (VASCO, RUALES, & KAMAL-ELDIN, 2008). Diante disso, os resultados indicam que ambos extratos apresentam alto teor de polifenóis, sendo portanto interessantes fontes de compostos fenólicos.

Para o ácido clorogênico, o maior teor foi para o extrato PVA, já para a cafeína, o maior teor para o extrato RA44. Verificou-se que o teor de vitamina C para o PVA foi o dobro do que o teor encontrado para o RA44. A vitamina C é um potente antioxidante, o que também possibilita o seu uso como conservante em alimentos em substituição a antioxidantes sintéticos, os quais têm sido apontados como possíveis promotores de carcinogênese.

Tabela 2: Teor de compostos bioativos dos extratos aquosos PVA e RA44

Compostos bioativos	PVA	RA44
Fenólicos Totais (g AG/100 g)	6,05	6,62
Ácido clorogênico (%)	1,64	1,49
Cafeína (%)	0,90	1,54
Vitamina C (mg/Kg)	62,75	30,51

De acordo com Ludwig et al. (2014), o café verde contém uma variedade de polifenóis em torno de 6-10% do peso seco, mais alto em Robustas do que em Arábicas. Os principais componentes são os ácidos cafeoilquínicos, especialmente o ácido clorogênico, seguido por teores mais baixos de ácidos feruloilquínicos e dicafeoilquínicos.

A capacidade antioxidante é definida pela habilidade que alguns compostos redutores, presentes em alimentos e/ou sistemas biológicos, possuem para sequestrar os radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo e o desenvolvimento de algumas doenças (FLOEGEL et al., 2011). Atualmente, não existe um método oficial para determinar essa capacidade antioxidante em alimentos de origem vegetal e seus subprodutos, tendo em vista os vários mecanismos antioxidantes que podem ocorrer, bem como a diversidade de compostos bioativos. Entre os ensaios espectrofotométricos mais utilizados, se destaca os que utilizam os radicais livres sintéticos DPPH• pela facilidade de execução e pela boa correlação com as demais metodologias para avaliar a atividade antioxidante (SOUSA; VIEIRA e LIMA, 2011)

Com relação à atividade antioxidante, observou-se pela tabela 3 que, para reduzir em 50% os radicais livres DPPH da solução, a amostra PVA necessitou de um menor teor quando comparada a RA44. O IC50 para o PVA foi de 76,70 µg/mL, semelhante ao padrão BHT, que foi de 70,11 µg/mL.

Tabela 3: Atividade antioxidante (IC₅₀ µg/mL) pelo método do sequestro de radical livre DPPH dos extratos aquosos PVA e RA44 e dos padrões hidroxibutiltolueno (BHT) e ácido ascórbico.

Tratamentos	IC ₅₀ µg/mL
PVA	76,70 ± 0,3
RA44	129,02 ± 0,5
BHT	70,11 ± 0,2
Ác. Ascórbico	6,49 ± 0,1

Valores expressos como média (n=3) ± desvio padrão

O radical DPPH reage rapidamente com alguns fenóis, mas existem reações secundárias que atuam concomitantemente, ocorrendo de forma lenta causando um progressivo decréscimo na absorvância, podendo demorar algumas horas para que a reação seja estabilizada. Sendo assim, uma melhor interpretação dos resultados do método do DPPH é por meio do EC₅₀?, o qual é definido como a concentração de substrato que reduz em 50% o radical DPPH (cor) inicial da reação. Esse parâmetro foi aparentemente introduzido por Brand-Williams e colaboradores (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) e indica que quanto maior a atividade antioxidante, mais baixo e o valor de EC₅₀ (METODOLOGIA). Ambos extratos apresentaram em sua composição química alto teor de compostos fenólicos. Muitos fatores influenciam na atividade antioxidante dos compostos de natureza fenólica, em especial a posição de substituição e o número de grupos hidroxila (OH), as propriedades de outros grupos substituintes e a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio. Compostos com dois (mais comum) ou três substituintes grupos hidroxilas no anel benzênico possuem maior atividade antioxidante do que os monohidroxilados (CHENG et al., 2003). Conforme detectado por CLAE, os extratos contém em sua composição química o ácido clorogênico, que possui duas hidroxilas no anel benzênico. Isso pode explicar a expressiva atividade antioxidante apresentada no método DPPH. Tanto o ácido clorogênico como a cafeína vêm sendo indicados como compostos com potencial atividade antioxidante (IWAI et al., 2004; DUARTE et al., 2005).

CONCLUSÕES

Os resultados preliminares mostraram que os resíduos apresentam quantidades significativas de compostos bioativos, bem como atividade antioxidante *in vitro*, com destaque para o PVA. Esses achados abrem perspectivas para o uso do PVA e RA44 como ingrediente de novos produtos, fontes naturais de compostos bioativos com atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of the Association of the Agricultural Chemists. 15th ed. Washington, 2000. 1094 p.
- ATHUKORALA, Y.; KIM, K. N.; JEON, Y. J. (2006). Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown alga, *Ecklonia cava*. *Food and Chemical Toxicology* 44: 1065-1074.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agrindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry* 99: 191–203.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28: 25-30.
- CHENG, Z.; REN, J.; YAN, G.; LI, Y.; CHANG, W.; CHEN, Z. (2003). Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds. *Bioorganic Chemistry* 31: p.149-162.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. (2010). PLANT PHENOLICS: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313-7352.
- DUARTE, S. M. S.; ABREU, C. M. P.; MENEZES, H. C.; SANTOS, M. H.; GOUVÊA, C. M. C. P. (2005). Effect of processing and roasting of the antioxidant activity of coffee brews. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25: 387-393.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. (1985). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Ed. Instituto Adolfo Lutz, 3a ed., São Paulo.
- IWAI, K.; KISHIMOTO, N.; KAKINO, Y.; MOCHIDA, K.; FUJITA, T. (2004). In vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4893-4898.
- FLOEGEL, A.; KIM, D.; CHUNG, S.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 1043–1048.
- LAUFENBERG, G. KUNZ, B.; NYSTROEM, M. (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology* 87:167–198.
- LUDWIG, I. A.; CLIFFORD, M. N.; LEAN, M. E. J.; ASHIHARA, H.; CROZIER, A. (2014). Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food Function* 5: 1695-1717.

- MELO, P. S.; BERGAMASHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S.M. (2011). Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. *Ciência Rural* 41: 1088-1093.
- SHUI, G., & LEONG, L. P. (2006). Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry* 97: 277-284.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* 299:152-178.
- SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. (2011). Fenólicos totais e capacidade antioxidante de resíduos de polpas de frutas tropicais. *Brazilian Journal of Food Technology* 14: 202-210.
- VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry* 111: 816-823.
- VASCONCELOS, A. L.; FRANÇA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; GLÓRIA, M. B. Avaliação comparativa da composição química centesimal de grãos defeituosos e sadios de café. Disponível em <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/1343>. Acesso em 16/02/2015.
- YEN, W. J.; CHANG L. W.; DUH, P. D. (2005). Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. *Food Science and Technology* 38:193-200.