

TRIAGEM FITOQUÍMICA DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES PRESENTES EM FRUTOS E FOLHAS FRESCOS DE CAFÉ ARÁBICA (*COFFEA ARABICA L.*)

Autores: VINÍCIUS SOARES TEIXEIRA, ANE PATRÍCIA CACIQUE, ÉRICA SOARES BARBOSA, JOÃO PAULO FERNANDES TIAGO, MARTA BATISTA RAMALHO, GEVANY PAULINO DE PINHO, FLAVIANO OLIVEIRA SILVÉRIO

Introdução

Ao mesmo tempo em que a demanda de produção de café se torna importante, tem-se observado ao longo dos últimos anos um interesse crescente por parte da comunidade científica pela descoberta de novos compostos antioxidantes. Estes devem ser provenientes de fontes naturais, de modo a se prevenir principalmente os danos oxidativos provocados às células vivas. Essa procura por novas fontes de antioxidantes se manifesta em um momento em que a utilização de antioxidantes sintéticos tem diminuído, em virtude da sua possível atuação enquanto promotores de carcinogênese (BALLESTEROS *et al.*, 2017). Uma das alternativas face a esse paradigma é o café, cujo consumo mundial é inferior somente ao de água e de chá. Embora outros alimentos possuam teores de antioxidantes superiores aos do café, a frequência, assim como a quantidade consumida, definem esta bebida como uma das principais fontes dietéticas atuais de antioxidantes (PULIDO, HERNANDEZ-GARCÍA e CALISTO, 2003).

Compostos como ácido hidroxixinâmico, flavonoides, ácido cafeico e ácidos clorogênicos são os principais representantes de antioxidantes presentes no café. Além desses compostos, o café possui uma concentração importante em melanoidinas, que se formam durante a torrefação através da reação de Maillard. Tais compostos contribuem para o aumento da atividade antioxidante verificada em extratos de café torrado (PASSOS *et al.*, 2017). Numerosos estudos sobre a triagem fitoquímica de grãos de café torrados e/ou prontos para consumo foram realizados nos últimos 10 anos (NÈVE, 2002). Todavia, poucos trabalhos se interessaram em avaliar quantitativamente a presença de antioxidantes em frutos frescos, assim como a possível interferência do meio extrator nos rendimentos obtidos via extração sólido-líquido. Nesse sentido, o presente estudo se propõe a comparar as quantidades de antioxidantes presentes nos frutos e folhas frescos de café utilizando-se duas soluções extratoras diferentes através da espectroscopia de absorção na região do UV-Visível.

Material e métodos

A. Preparo das amostras

Foram utilizadas amostras de café (*Coffea arabica L.*) provenientes de um cafeeiro localizado no *campus* do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. Os frutos e folhas foram colhidos manualmente durante o outono (março de 2017) das partes da árvore menos expostas ao sol. As amostras foram inicialmente secas em uma estufa a 70 °C durante 24 h, maceradas com o auxílio de almofariz e pistilo e submetidas à análise granulométrica com o uso de três peneiras com diferentes malhas: 2,00 mm (9 Ty), 1,00 mm (16 Ty) e 500 μ m (32 Ty), respectivamente. 2,5 g da amostra, constituída pelas partículas com diâmetro igual ou inferior a 500 μ m, foi acondicionada em tubo de fundo cônico juntamente com 20 mL de uma das duas soluções extratoras utilizadas neste estudo: mistura etanol:acetona (EtOH:Ac) na proporção 7:3 (v/v) e metanol (MeOH) 80% (v/v).

A extração sólido-líquido foi realizada em mesa agitadora a 37 °C durante 1 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos e os resíduos sólidos re-extraídos, seguindo a metodologia descrita anteriormente. Os extratos das duas extrações foram combinados e armazenados sob refrigeração à -20 °C ao abrigo da luz até o momento da realização dos ensaios espectroscópicos. Todas as curvas analíticas obtidas neste estudo apresentaram coeficiente de correlação superior a 0,98. Todos os reagentes utilizados neste trabalho apresentavam pureza analítica (? 99% de pureza). -se duas soluções extratoras diferentes através da espectroscopia de absorção na região do UV-Visível.

B. Determinação do teor de flavonoides

A concentração de flavonoides foi determinada pela adição de 0,5 mL do extrato a 2 mL de água destilada e 0,15 mL de NaNO₂ 5% (m/v). A amostra foi mantida em repouso por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,15 mL de AlCl₃ 10% (m/v) e a amostra foi deixada em repouso novamente por 6 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ ao sistema, seguido de agitação manual e análise espectrofotométrica. A curva de calibração foi obtida a partir da solução padrão de rutina nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 mg L⁻¹, com leitura realizada em $\lambda = 510$ nm. As amostras foram mantidas ao abrigo da luz durante a realização de todo o procedimento experimental. Os resultados obtidos foram expressos em termos de equivalente-grama de rutina por mg L⁻¹ de amostra.

C. Determinação do teor de fenóis totais

Para a determinação do teor de fenóis totais, 0,1 mL do extrato foi diluído em 0,9 mL de água ultrapura. Em seguida, 0,1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu foi adicionado ao recipiente. A amostra foi mantida em repouso por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de Na₂CO₃ 7% (m/v) e 0,4 mL de água ultrapura ao tubo contendo a amostra. Esta foi deixada em repouso por 90 minutos à temperatura ambiente antes da realização das leituras. Foi utilizado o padrão de ácido gálico nas concentrações de 1,0, 2,0, 4,0, 6,0 e 8,0 mg L⁻¹ para obtenção da curva analítica em $\lambda = 750$ nm. Assim como durante a determinação de flavonoides, os recipientes contendo as soluções foram protegidos da luz, e os resultados foram expressos em termos de equivalente-grama de ácido gálico por mg L⁻¹ de amostra.

D. Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS

A atividade antioxidante dos extratos de folha e de fruto de café neste estudo foi avaliada pelo método ABTS. O preparo do ABTS+ foi realizado pela mistura de 15 mL de ABTS 7 mmol L⁻¹ e (NH₄)₂S₂O₈ 2,45 mmol L⁻¹, seguido de homogeneização. A solução foi mantida no escuro em repouso por 16 h e, em seguida, diluída com MeOH 80% (v/v). Para o preparo da amostra, 30 μ L do extrato foi misturado a 3 mL de ABTS+ diluído. A mistura foi homogeneizada e mantida em repouso por 6 minutos. A curva padrão de Trolox foi obtida trabalhando-se com as concentrações de 2, 3, 4, 5 e 6 mg L⁻¹ de solução-padrão, com $\lambda = 734$ nm. Os resultados foram expressos em termos de equivalente-grama de Trolox por mg L⁻¹ de amostra.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos a partir da realização dos ensaios de determinação de flavonoides, fenóis totais e de atividade antioxidante pelo método ABTS estão apresentados na Figura 1. O interesse no uso da técnica UV-Visível é associado a vários fatores, como custo relativamente baixo para a realização dos ensaios, baixa quantidade de amostra a ser utilizada, baixa quantidade de reagentes químicos durante a execução dos testes, além de não ser um ensaio destrutivo da amostra.

Inicialmente, foi observado que o teor de flavonoides nos frutos de café é cerca de cinco vezes maior que o de fenóis totais utilizando-se como solução extratora metanol 80 % (v/v) e aproximadamente 16 vezes maior quando a solução de etanol:acetona 7:3 (v/v) é empregada. Na literatura, poucos são os trabalhos que investigaram a composição química de frutos verdes e frescos de café, de modo a compará-los com a composição dos frutos selecionados para as etapas de torrefação. De acordo com estudos anteriores sobre a composição química do grão verde (imaturado), há um alto teor de ácido clorogênico presente em frutos de café, o que confere alta adstringência à bebida (PIMENTA, COSTA e CHAGAS, 2000). Estas observações foram corroboradas por estudos posteriores a respeito dos frutos imaturos de café arábica processados por via seca e úmida (NOBRE *et al.*, 2011). Os ácidos clorogênicos – os componentes da fração fenólica mais importantes nos grãos de café verde – são os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos que apresentam maior distribuição nos alimentos. Deve-se considerar que o café é uma importante fonte de compostos fenólicos que não se enquadram dentro do grupo dos flavonoides – polifenóis que possuem esqueleto básico 15 átomos de carbono, dispostos em C6-C3-C6 na maioria das vezes em três anéis (LEITE, 2009) –, além de possuírem concentrações significativas de compostos voláteis (DI CARLO *et al.*, 1999, BEDOYA-RAMÍREZ *et al.*, 2017). Neste sentido, estudos complementares devem ser realizados de modo a se investigar as razões pelas quais o teor de flavonoides nos frutos verdes foi superior ao de compostos fenólicos totais. As divergências em relação aos resultados obtidos neste estudo com os dados da literatura podem estar associadas a diferentes fatores limitantes, associados principalmente ao procedimento experimental, tais como tempo de incubação e quantidade da amostra quantificada.

Com relação aos resultados de atividade antioxidante frente ao íon ABTS^{•+}, foi observado que folha e fruto possuem quantidades similares de compostos antioxidantes quando seus resultados são comparados em um mesmo solvente. Todavia, os valores obtidos para o extrato de folha em MeOH 80 % são superiores aos do fruto de café. Para ambos os substratos, os valores expressos na Figura 1 caracterizam a capacidade das diferentes amostras em reagir com ABTS^{•+} de modo a inibir processos oxidativos. Foi observado que a solução extratora interfere diretamente na extração desses compostos no caso dos dois substratos. Em solução metanólica, foi verificado um aumento de três vezes do consumo de Trolox. Todavia, é preciso destacar que, apesar da simplicidade que este ensaio apresenta, ele é pouco seletivo para a reação com átomos doadores de hidrogênio – em relação aos outros métodos já conhecidos de determinação de atividade antioxidante de matrizes vegetais. Neste caso, é necessário ressaltar que a capacidade antioxidante de uma mistura é dada pela soma das capacidades antioxidantes de cada uma das substâncias que a compõem, do microambiente em que os compostos se encontram e das condições físico-químicas às quais eles serão expostos. Do mesmo modo, é preciso ter em vista a interação dos compostos entre si, o que pode induzir a diferentes efeitos sinérgicos ou inibitórios durante os testes.

Considerações finais

Conclui-se que a concentração de flavonoides e de fenóis totais, assim como a atividade antioxidante do extrato de folhas de café, são superiores às obtidas para o extrato de fruto fresco numa mesma solução extratora. De modo geral, foi observado que misturas hidroalcoólicas favorecem maiores rendimentos de extração do que as misturas de solventes orgânicos. Ainda que estes resultados devam ser respaldados pela realização de estudos complementares (em relação às concentrações de flavonoides e de fenóis totais nas amostras e ensaios toxicológicos), eles apontam para a potencialidade que o uso da folha de café pode apresentar enquanto fonte de compostos antioxidantes para a dieta humana.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pelo apoio financeiro e pela infraestrutura disponibilizada.

Referências bibliográficas

- BALLESTEROS, L. F. *et al.* Optimization of autohydrolysis conditions to extract antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. **Journal of Food Engineering**, v. 199, p. 1-8, 2017.
- BEDOYA-RAMÍREZ *et al.* Evaluation of the antioxidant capacity, furan compounds and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of commercial Colombian coffee. **Food Chemistry**, v. 219, p. 364-372, 2017.
- CLIFFORD, M. N.; KAZI, T. The Influence of Coffee Bean Maturity on the Content of Chlorogenic Acids, Caffeine and Trigonelline. **Food Chemistry**, v. 26 p. 59-69, 1987.
- DI CARLO *et al.* Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n° 4, p. 337-353, 1999.
- LEITE, J. P. V. **Fitoterapia – Bases Científicas e Tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 2009. 328 p.
- NÈVE, J. Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants. **Nutrition clinique et métabolisme**, v. 16, p. 292-300, 2002.
- NOBRE, G. W. *et al.* Composição química de frutos imaturos de café arábica (*Coffea arabica* L.) processados por via seca e via úmida. **Coffee Science**, v. 6, n. 2, p. 107-113, 2011.
- PASSOS *et al.* Instant coffee as a source of antioxidant-rich and sugar-free coloured compounds for use in bakery: Application in biscuits. **Food Chemistry**, v. 231, p. 114-121, 2017.
- PIMENTA, C. J.; COSTA, L.; CHAGAS, S. J. de R. Peso, acidez, sólidos solúveis, açúcares e polifenóis em café (*Coffea arabica* L.), colhidos em diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 25, p. 23-30, 2000.
- PULIDO, R.; HERNANDEZ-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**, v. 57, p. 1275-1282, 2003.

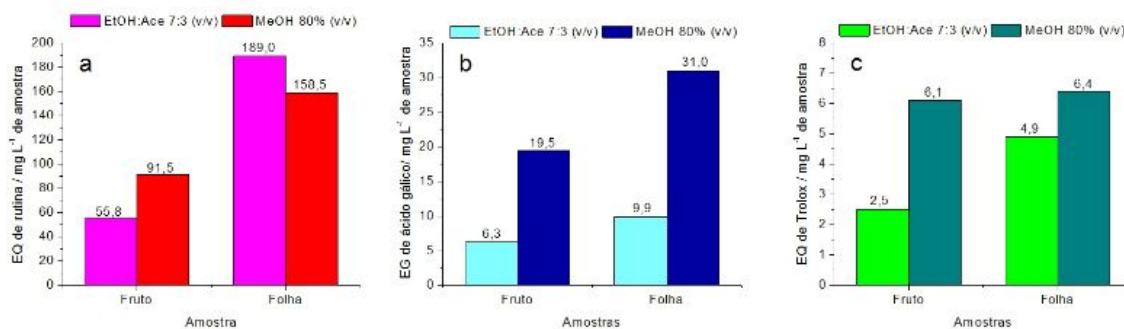


Figura 1. Concentração de flavonoides (a), fenóis totais (b) e atividade antioxidante (c) de folhas e frutos frescos de café *Coffea arabica* L.) submetidos à extração sólido-líquido com duas soluções extratoras diferentes.