



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAFAEL CARLOS ELOY DIAS

**DITERPENOS EM CAFÉ:
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE,
AVALIAÇÃO EM CAFÉS TORRADOS E EM DIFERENTES TECIDOS
DO FRUTO, E ESTUDO DA ESTABILIDADE COM O PROCESSO DE
TORRA**

Londrina
2009

RAFAEL CARLOS ELOY DIAS

**DITERPENOS EM CAFÉ:
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE,
AVALIAÇÃO EM CAFÉS TORRADOS E EM DIFERENTES TECIDOS
DO FRUTO, E ESTUDO DA ESTABILIDADE COM O PROCESSO DE
TORRA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Marta de Toledo Benassi.

Londrina
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D541d Dias, Rafael Carlos Eloy.
Diterpenos em café : desenvolvimento de metodologia para análise, avaliação em cafés torrados e em diferentes tecidos do fruto, e estudo da estabilidade com o processo de torra / Rafael Carlos Eloy Dias. – Londrina, 2009.
157 f. : il.

Orientador: Marta de Toledo Benassi.
Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2009.
Inclui bibliografia.

1. Café – Torrefação – Teses. 2. Alimentos – Avaliação sensorial – Teses.
3. Café – Diterpenos – Teses. I. Benassi, Marta de Toledo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641.002.61

RAFAEL CARLOS ELOY DIAS

**DITERPENOS EM CAFÉ:
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE,
AVALIAÇÃO EM CAFÉS TORRADOS E EM DIFERENTES TECIDOS
DO FRUTO, E ESTUDO DA ESTABILIDADE COM O PROCESSO DE
TORRA**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Adriana Farah de Miranda Pereira
(Bioquímica/IQ/UFRJ)

Dr. Marcelo Caldeira Viegas
(Companhia Iguaçu de Café Solúvel)

Profa. Dra. Neura Bragagnolo
(DCA/FEA/UNICAMP)

Prof. Dra. Suzana Lucy Nixdorf
(DQ/CCE/UEL)

Londrina, 07 de agosto de 2009.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

À Profa. Dra. Marta de Toledo Benassi, por ter me passado tantos conhecimentos durante minha formação acadêmica e por ter me dado o exemplo de como ser um profissional competente e um ser humano sensato e agradável.

À minha família, que sempre auxiliou em tudo que precisava para que ocorresse com tranqüilidade o meu trabalho, especialmente a minha mãe Rô, que me deu a educação moral e ética para alcançar meus objetivos.

Às colegas Romilaine Mansano Nicolau de Souza, Fernanda Gonçalves Campanha e Gisele André Baptista Canuto, que foram fundamentais para a elaboração deste trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e de toda a Universidade, que estiveram envolvidos direta e indiretamente na minha passagem por esta instituição, com apoios importantes.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), em especial à Dra. Maria Brígida dos Santos Scholz e à Cia. Iguaçu de Café Solúvel, particularmente à Dra. Josiane Alessandra Vignoli, pelo fornecimento de matéria prima e apoio técnico, mas principalmente pela amizade.

À Profa. Dra. Adriana Zerloti Mercadante e à Profa. Dra. Neura Bragagnolo por terem auxiliado parte deste trabalho, disponibilizando o laboratório de Química de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA-UNICAMP). Agradeço também pela hospitalidade na cidade de Campinas-SP e pela gentil e competente orientação.

Ao professor Dr. Rui Sérgio dos Santos Ferreira da Silva, pelo apoio ao trabalho e vasto conhecimento, sempre disponível. Agradeço também, o empréstimo do programa Statistica 6.0.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, pelos apoios financeiros.

DIAS, Rafael Carlos Eloy. **Diterpenos em café**: desenvolvimento de metodologia para análise, avaliação em cafés torrados e em diferentes tecidos do fruto, e estudo da estabilidade com o processo de torra. 2009. 160f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009.

RESUMO

O café é um dos mais valiosos produtos primários comercializados, superado apenas pelo petróleo. O Brasil é o maior produtor e exportador de café. As espécies mais importantes comercialmente são *Coffea arabica* (arábica) e *C. canephora* (conilon). Atualmente, o maior interesse da cafeicultura nacional é tornar o produto atraente também pela qualidade e não apenas economicamente. A definição da qualidade do café envolve aspectos sensoriais da bebida e informações do produto, incluindo espécies utilizadas (*blends*), processamento e composição, com destaque para substâncias bioativas. Os diterpenos caveol e cafestol apresentam interesse para a saúde pela ação hipercolesterolêmica, mas também atividade anticarcinogênica e antioxidante. Existe interesse na avaliação dos diterpenos em diferentes tecidos do cafeeiro e em frutos, o que auxiliaria na elucidação das vias biossintéticas de produção destes compostos na planta. Destaca-se também a possibilidade de emprego dos teores dos diterpenos para identificação de espécies em café torrado, permitindo avaliar a adição intencional ou fraudulenta de café conilon ao arábica, de maior valor comercial. Apesar do interesse, há limitação de informações e divergências na literatura relativas aos teores de diterpenos nas diferentes matrizes de café e quanto à estabilidade à torra. Neste trabalho foi desenvolvida e validada uma metodologia por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para análise de caveol e cafestol em *C. arabica* e *C. canephora*, incluindo tecidos da planta e frutos, além de grãos torrados. Utilizou-se fase reversa, eluição isocrática (acetoneitrila/H₂O 55:45) e detecção no UV. O procedimento de extração foi padronizado (saponificação direta a quente, extração com tercbutil metil éter e limpeza com água) e sua eficiência comprovada por comparação de diferentes métodos. Obtiveram-se boa recuperação, repetibilidade e linearidade, com limites de detecção de 2,3 (caveol) e 3,0 (cafestol) mg/100 g. Outra metodologia, por Espectrofotometria, foi também validada para quantificação de caveol. Utilizou-se mesma extração, mas a quantificação foi feita após reação colorimétrica com KI e leitura a 620 nm. O método pode ser utilizado como uma alternativa, pelo menor custo, e aplicado como triagem na identificação da adição de conilon ao arábica. Em *C. arabica*, caveol esteve presente em raiz e ramo, porém ausente em botão floral e pericarpo. Cafestol foi detectado nessas 4 amostras, mas ausente em folhas de *C. canephora* (cv. Apotã). Endosperma e perisperma de *Coffea arabica* (cv. Iapar-59) mostraram elevada quantidade de caveol (>500 mg/100 g) comparado ao pericarpo e folhas. Ocorreu concentração de diterpenos no endosperma com queda no perisperma a partir do 100º dia após a florada, provavelmente pela interconversão dos tecidos que ocorre na maturação. Acompanhando-se o grau de torra, verificou-se a formação de dehidrocaveol e dehidrocafestol em processos mais intensos. A confirmação das estruturas dos compostos foi feita com CLAE/DAD/EM-EM, observando-se íons típicos para os diterpenos e dehidroderivados. No geral, amostras de *C. arabica* apresentaram altos teores de caveol e maiores valores de cafestol que *C. canephora*. Em razão da diferença na composição das espécies e a manutenção do teor dos diterpenos com o processo de torra, caveol e cafestol foram considerados identificadores de espécies em amostras torradas.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *Coffea canephora*. CLAE. Caveol. Cafestol.

DIAS, Rafael Carlos Eloy. **Diterpenes in coffee**: development of methodology for analysis, evaluation in roasted coffee and different fruit tissues, and a study of stability during the roasting process. 2009. 160p. Thesis (Doctor's Degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009.

ABSTRACT

Coffee is one of the most valuable primary products in world trade, surpassed only by oil. Brazil is the largest coffee producer and exporter. The most important commercial species are *Coffea arabica* (arabica) and *C. canephora* (conilon). Currently, the greater interest of the national coffee producer is to make the product attractive also for quality and not just economically. The definition of coffee quality involves sensory aspects of beverage and product information. It includes species applied in blends, processing and composition, focusing on bioactive substances. The diterpenes kahweol and cafestol have health interest by their hypercholesterolemic effect, but also due to their anticarcinogenic and antioxidant actions. The evaluation of diterpenes in different plant and fruit tissues of coffee would assist also the elucidation of metabolic pathways of those compounds production in the plant. It is also highlighted the possibility of using the contents of diterpenes to identify coffee species in the roasted product, allowing to evaluate the intentional or fraudulent addition of coffee conilon to arabica, highly commercially valued. Despite the wide interest, a lack of information was found as well as disagreement regarding the levels of diterpenes in the different coffee matrices, and the roasting stability. In this work, a methodology by HPLC method to determine kahweol and cafestol in *C. arabica* and *C. canephora*, including roasted coffee and coffee plant and fruit tissues, was developed and validated. Reverse-phase, isocratic elution (acetonitrile/H₂O 55:45) and UV detection were applied. The extraction procedure was standardized (direct hot saponification, extraction with methyl *tert*-butyl ether and clean up with water) and its efficiency was proven by comparison of different methods. Good recovery, repeatability and linearity were obtained. Detection limits of 2.3 (kahweol) and 3.0 (cafestol) mg/100 g were observed. Another methodology, by Spectrophotometry, was also validated to kahweol evaluation. The same extraction procedure was used, but the quantification was carried out after the colorimetric reaction with KI and reading at 620 nm. The method can be used as a lower cost-alternative and as screening method in identifying the addition of conilon to arabica. In *C. arabica*, kahweol was present in root and branch, but absent in floral button and pericarp. Cafestol was not present just in *C. canephora* (cv. Apoatã) leaves. Endosperm and perisperm of *C. arabica* (cv. Iapar-59) showed high amounts of kahweol (>500 mg/100 g) in comparison to pericarp and leaves. The increase contents of diterpenes in endosperm with decrease in perisperm from 100 days after flowering occurred probably due to their interconversion during maturation. Monitoring the roasting process for both species, it was verified formation of dehydrocafestol and dehydrokahweol in the more intense treatments. The compounds structures were confirmed by HPLC/MS, observing typical ions of diterpenes and dehydro- derivatives. In general, samples of *C. arabica* showed elevated levels of kahweol and higher values of cafestol than *C. canephora*. Because of the composition differences among the species and the maintenance of the diterpenes concentration with roasting process, cafestol and kahweol were considered as efficient tools to identify species in roasted coffee.

Keywords: *Coffea arabica*. *Coffea canephora*. HPLC. Kahweol. Cafestol.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.1** – Produção brasileira de café (em mil sacas de 60 kg beneficiadas) dividido por Estados 19

CAPÍTULO 2

- Figura 2.1** – Espectro (190 a 800 nm) de caveol (A) e cafestol (B) obtidos com padrão comercial..... 36
- Figura 2.2** – Estruturas de 16-O-metilcaveol (A) e 16-O-metilcafestol (B) sugeridas por Roos et al. (1997) e Pettitt Jr. (1987), respectivamente..... 37
- Figura 2.3** – Estruturas de compostos sugeridas por Speer e Kölling-Speer (2006) para possíveis degradados de caveol e cafestol em café torrado..... 38
- Figura 2.4** – Corte longitudinal do fruto de *C. arabica* var. Acaíá Cerrado maduro..... 40

CAPÍTULO 3

- Figura 3.1** – Fluxograma para extração de matéria insaponificável..... 74
- Figura 3.2** – Espectro (190 a 800 nm) de caveol (A) e cafestol (B) obtidos com padrão comercial..... 78
- Figura 3.3** – Cromatogramas típicos: endosperma (a), pericarpo (b), perisperma (c) e folha (d) de *C. arabica*, e café torrado (mistura 70:30 *C. arabica*:*C. canephora*) (e -230 nm; f - 290 nm). Detecção a 230 (----) e 290 nm (—)..... 80

CAPÍTULO 4

- Figura 4.1** – Fluxograma de extração e análise de caveol por espectrofotometria93
- Figura 4.2** – Espectrogramas correspondentes a amostra de café torrado (*blend* de 30 % de arábica e 70 % de conilon) e diferentes concentrações de caveol, correspondentes aos valores da curva de calibração.....95
- Figura 4.3** – Espectrogramas típicos das amostras de tecidos de café verde (*C. arabica*) e folhas (*C. arabica* e *C. canephora*).....99

CAPÍTULO 5

- Figura 5.1** – Evolução dos teores de caveol e cafestol durante o desenvolvimento dos frutos (dias após a florada, DAF, no eixo x) em endosperma e perisperma de *C. arabica* (–) e *C. canephora* (---)..... 110
- Figura 5.2** – Relação dos teores dos diterpenos para café torrado: C – *C. canephora*, A – *C. arabica*, T – Comercial Tradicional, G – Comercial *Gourmet*..... 115

CAPÍTULO 6

- Figura 6.1** – Fluxograma para extração da matéria insaponificável dos extratos lipídicos de café obtidos pelos métodos de Bligh Dyer e Soxhlet ou diretamente da amostra de café torrado por Saponificação Direta a Quente (início na etapa 1) e extração da matéria insaponificável pelo método de Saponificação Direta a Frio (início na etapa 4)..... 125
- Figura 6.2** – Cromatogramas típicos (230 nm) de amostras preparadas por saponificação a quente de extratos obtidos por Soxhlet (SO), Bligh Dyer (BD), e amostras preparadas por Saponificação Direta a Quente (SDQ) e Saponificação Direta a Frio (SDF)..... 129

CAPÍTULO 7

- Figura 7.1** – Variação dos teores de lipídios de café arábica e conilon ao longo processo de torra (em base seca)..... 144
- Figura 7.2** – Comportamento dos parâmetros de cor, luminosidade (L^*) e tonalidade cromática (H^*), com a intensidade do processo de torra em diferentes espécies de café 145
- Figura 7.3** – (A) Cromatogramas típicos de amostras de café arábica de diferentes graus de torra (2, 6 e 10 min) a 230 nm. (B) Detalhe dos compostos eluídos após 20 min. Identificação..... 147
- Figura 7.4** – Espectros de massas para os compostos de 1, 2, 5 e 6 da Figura 7.3..... 148
- Figura 7.5** – Espectros UV-Vis típicos dos compostos enumerados na Figura 7.3..... 149
- Figura 7.6** – (Q1) Fragmentos gerados pelo espectrômetro de massas para o pico 1 (caveol) da Figura 7.3 (café arábica): (A) pico da molécula protonada, (B) pico base, (C) fragmento típico da EM/EM para o pico de m/z 297 e (D) fragmento presente na EM e EM/EM citadas. (Q2) Estruturas para os compostos dos picos identificados..... 149
- Figura 7.7** – Variação do teor dos compostos diterpênicos (mg/g de lipídios) com a intensidade do processo de torra (tempo em min), expresso *em base lipídica* 151
- Figura 7.8** – Variação do teor dos compostos diterpênicos (mg/100 g de amostra em bs) com o grau de torra (tempo em min)..... 152
- Material Suplementar** – Espectros de massas para a primeira fragmentação (EM) do pico cromatográfico de interesse (Figura 7.3) e segunda fragmentação (EM/EM) para os principais picos encontrados na primeira 157

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 – Principais componentes lipídicos em frutos de café	35
Tabela 2.2 – Teores de diterpenos do café	41
Tabela 2.3 – Teores de cafestol, caveol e 16-O-metilcafestol de amostras de bebida café coletados em diferentes estabelecimentos comerciais de diversos países	43

CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 – Resumo das condições cromatográficas propostas.....	79
Tabela 3.2 – Parâmetros da regressão linear das curvas de calibração dos diterpenos	81
Tabela 3.3 – Teores dos diterpenos nos tecidos separados de frutos, em folhas e grãos torrados	82

CAPÍTULO 4

Tabela 4.1 – Resultado dos ensaios de repetibilidade	96
Tabela 4.2 – Recuperação (%) do caveol em amostra de café torrado e moído (mistura 70:30 de conilon:arábica).....	97
Tabela 4.3 – Comparação dos resultados obtidos para caveol por diferentes metodologias em amostras de cafés comerciais	98

CAPÍTULO 5

Tabela 5.1 – Comportamento dos teores de caveol e cafestol em tecidos dos frutos frescos durante a maturação do fruto do café.....	111
---	-----

Tabela 5.2 – Caracterização, por parâmetros de cor, e teores de cafeol e cafestol das amostras de grãos de café torrados 113

CAPÍTULO 6

Tabela 6.1 – Resultados obtidos por CLAE-DAD-EM/EM para amostra de grãos de café torrados 131

Tabela 6.2 – Teores dos compostos diterpênicos em amostra de grãos de café torrados para diferentes extrações e preparo de amostra..... 132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a*	Componente vermelho-verde
ABIC	Associação Brasileira da Indústria de Café
ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b*	Componente amarelo-azul
BD	Extração por Bligh Dyer
CG (GC)	Cromatografia Gasosa
CLAE (HPLC)	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV (%)	Coefficiente de variação em porcentagem
cv.	Cultivar
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DAF	Dias após a florada
EM (MS)	Espectrometria de Massas
EM/EM	2ª fragmentação para EM
H*	Tonalidade cromática
IAPAR	Instituto Agrônomo do Paraná
KOH	Hidróxido de potássio
L*	Luminosidade
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MI	Matéria Insaponificável
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
n	Número de amostras analisadas
OIC	Organização Internacional do Café
p	Nível de significância
PVA	Grãos de café defeituosos: preto, verde, ardido
R ²	Coefficiente de determinação
SDF	Saponificação Direta a Frio
SDQ	Saponificação Direta a Quente
SO	Extração por Soxhlet
<i>t_R</i>	Tempo de retenção
UV-Vis	Regiões do espectro Ultravioleta e Visível
var.	Variedade
% PP	Porcentagem de perda de peso das amostras
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E OBJETIVOS

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
2.1.1 Caracterização das Espécies de Café pela Composição Química.....	33
2.1.2 Diterpenos do Café	36
2.1.3 Diterpenos nos Tecidos do Café, Grãos Torrados e Bebidas de Café: teores e distribuição	38
2.1.4 Importância dos Diterpenos para a Saúde do Consumidor e qualidade do produto	43
2.1.5 Metodologias para Avaliação de Diterpenos	48
2.1.5.1 Métodos de Extração e Preparo de Amostra.....	49
2.1.5.2 Separação, Identificação e Quantificação dos Diterpenos	51
2.2 OBJETIVOS GERAIS	56
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE CAVEOL E CAFESTOL EM FOLHAS E TECIDOS DE FRUTOS DE CAFEIRO E EM GRÃO DE CAFÉ TORRADOS

3.1 RESUMO	70
3.2 INTRODUÇÃO	70
3.3 MATERIAL.....	73
3.3.1 Café Torrado e Moído	73
3.3.2 Frutos Frescos e Folha.....	73
3.4 MÉTODOS.....	74
3.4.1 Extração de Caveol e Cafestol e Preparo das Amostras.....	74

3.4.2 Avaliação Cromatográfica	75
3.4.3 Validação do Método Cromatográfico	76
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.5.1 Extração dos Diterpenos e Preparo de Amostra	77
3.5.2 Definição das Condições Cromatográficas.....	77
3.5.3 Validação da Metodologia Analítica	80
3.6 CONCLUSÕES	83
3.7 COLABORADORES	84
3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

CAPÍTULO 4 – VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR ESPECTROFOTOMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DE CAVEOL EM GRÃOS DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO

4.1 RESUMO	89
4.2 INTRODUÇÃO	89
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	91
4.3.1 Amostras	91
4.3.2 Reagentes e Equipamentos	92
4.3.3 Extração e Análise por Espectrofotometria	92
4.3.4 Validação do Método Espectrofotométrico.....	93
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
4.6 CONCLUSÕES	100
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

CAPÍTULO 5 – CAVEOL E CAFESTOL EM TECIDOS DO CAFEIEIRO, TECIDOS DE FRUTOS E EM CAFÉ TORRADO

5.1 RESUMO	104
5.2 INTRODUÇÃO	105
5.3 MATERIAL E MÉTODOS	107
5.3.1 Amostras	107
5.3.2 Extração e Quantificação de Caveol e Cafestol	108
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	108

5.4.1	Maturação e o Teor dos Diterpenos nos Tecidos de Frutos Frescos e Folhas.....	109
5.4.2	Teores de Diterpenos em Grãos de Cafés Torrados e Moídos e seu Potencial como Discriminadores de Espécies.....	112
5.5	CONCLUSÕES	115
5.6	COLABORADORES	116
5.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116

CAPÍTULO 6 – INFLUÊNCIA DO MÉTODO DA EXTRAÇÃO NA ANÁLISE DE CAVEOL E CAFESTOL EM GRÃOS DE CAFÉ TORRADO

6.1	RESUMO	122
6.2	INTRODUÇÃO	122
6.3	MATERIAL E MÉTODOS	124
6.3.1	Preparo de Amostra	124
6.3.1.1	Saponificação Direta a Quente (SDQ).....	125
6.3.1.2	Saponificação Direta a Frio (SDF).....	125
6.3.1.3	Extração de Lipídios a Quente por Soxhlet (SO).....	126
6.3.1.4	Extração de Lipídios por Bligh Dyer (BD).....	126
6.3.2	Condições Cromatográficas	127
6.3.3	Análise Estatística.....	128
6.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	129
6.5	CONCLUSÕES	134
6.6	COLABORADORES	134
6.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

CAPÍTULO 7 – INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE DO PROCESSO DE TORRA SOBRE O PERFIL DE DITERPENOS GRÃOS DE CAFÉ TORRADOS

7.1	RESUMO	139
7.2	INTRODUÇÃO	140
7.3	MATERIAL E MÉTODOS	141
7.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	143

7.4.1 Caracterização das Amostras	143
7.4.2 Identificação dos Compostos e Análise Qualitativa	146
7.4.3 Variação, com o Grau de Torra, dos Teores de Cafeol, Cafestol e Dehidroderivados	150
7.5 CONCLUSÕES	154
7.6 COLABORADORES	154
7.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
7.8 MATERIAL SUPLEMENTAR	157
CONCLUSÃO GERAL	159

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

No Reino Vegetal, a família Rubiaceae contém 500 gêneros e mais de 6000 espécies. O grão do café é obtido da fruta da planta do gênero *Coffea*, que faz parte da família Rubiaceae. Apenas cinco espécies deste gênero são cultivadas comercialmente (ABIC, 2009; CARVALHO et al., 2001). As mais importantes são *Coffea arabica*, chamado comumente apenas de arábica e *Coffea canephora*. A cultivar denominada conilon é a mais plantada no Brasil e a cv. robusta, em demais países, e ambas são da espécie *C. canephora*.

A planta do café arábica é originária da Etiópia (África), onde ainda hoje faz parte da vegetação natural. É um arbusto com um tronco reto e macio, ramificações longas, esguias e flexíveis, e folhas lanceoladas. As suas flores são pequenas e produzem as típicas bagas que contêm os grãos de café. O café arábica é particularmente sensível ao calor e à umidade, e prefere as zonas de elevada altitude para seu desenvolvimento (ABIC, 2009; EMBRAPA, 2009).

A espécie *Coffea canephora* originou-se na região do rio Kouillou, no Gabão (África) e foi introduzida no Brasil nas primeiras décadas do século XX, onde ficou conhecida como conilon. Esta planta apresenta porte alto, caules ramificados, folhas maduras com comprimento e largura menores que os demais cultivares da espécie, folhas novas de coloração bronze, frutos vermelhos ou amarelos quando maduros e sementes relativamente pequenas (ABIC, 2009; EMBRAPA, 2009; AGUIAR, 2005).

Depois do petróleo, o café é o produto mais importante no comércio mundial. Está estimado que, globalmente, entre 20 e 25 milhões de pessoas dependem do café para a subsistência. Desta forma, a bebida produzida a partir do café é uma das mais consumidas em todo o mundo. Em pesquisa divulgada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, o café foi citado como a segunda bebida mais consumida pelos brasileiros acima de 15 anos entre 2003 e 2006, atrás apenas da água natural ou mineral, assumindo a liderança em 2008 (MAPA, 2009). O Brasil é um dos países onde o consumo interno da bebida café mais cresce (4,5 % ao ano no mercado interno contra 2,0 % no mundo). De 2003 a 2007, o mercado evoluiu 25 %. Hoje representa 14 % da demanda mundial, o que coloca o Brasil como o segundo maior consumidor da bebida (o primeiro são os

EUA), mas o primeiro em produção e exportação dos frutos de todo o mundo. Somente o Estado de Minas Gerais produz mais café arábica que o segundo maior produtor mundial, a Colômbia (ABIC, 2009; CONAB, 2009; OIC, 2009).

A área total brasileira cultivada com café está estimada em 2,4 mil hectares. A produção de *C. arabica* representa aproximadamente 75 % (26,8 a 28,3 milhões de sacas de café beneficiado) da produção do País, e tem como maior produtor o Estado de Minas Gerais, com 66 % da produção. O café conilon participa da produção nacional com quase 25 % (10,0 a 10,5 milhões de sacas de café beneficiado). O Estado do Espírito Santo destaca-se como o maior produtor dessa espécie, com 69 %. Paraná e São Paulo não são produtores de café conilon, mas representam quantidades importantes na produção brasileira de café arábica (Figura 1.1) (CONAB, 2009).

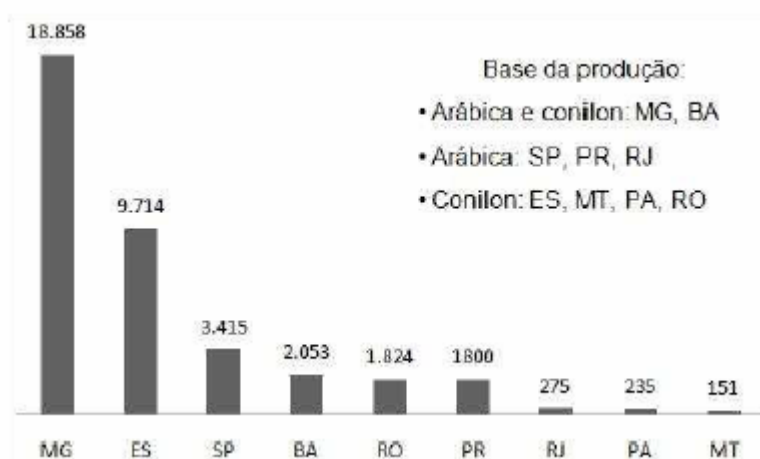


Figura 1.1 – Produção brasileira de café (em mil sacas de 60 kg beneficiadas) dividido por Estados. Fonte dos dados: *Acompanhamento da safra brasileira de café: safra 2009, primeira estimativa* – CONAB (CONAB, 2009).

Os cafés arábica e conilon apresentam distinções quanto ao preço, qualidade e aceitabilidade, produzindo bebidas com características diferentes. Os grãos verdes das duas espécies podem ser distinguidos pela cor, formato e tamanho. O grão de café arábica apresenta cor esverdeada e forma ovalar, levemente azedo, de superfície lisa e intenso aroma, enquanto que o grão de conilon tende a ser mais arredondado e castanho, de menor intensidade no aroma e com gosto mais picante e adstringente (AGUIAR, 2005; CARVALHO et al., 2001; GONZÁLEZ et al., 2001).

A literatura descreve que com a espécie arábica são feitas bebidas de melhor qualidade, mais finas e requintadas, de sabores diversificados, com inúmeras variações de corpo e acidez e com aroma intenso (MENDES, 1999).

O conilon, por possuir características sensoriais próprias, produz bebida classificada como de “sabor único”, considerada tecnicamente de má qualidade por provadores treinados. Tem acidez baixa e é utilizado muitas vezes para a fabricação de cafés solúveis por possuir elevado teor de sólidos solúveis (AGUIAR, 2005; SOUZA et al., 2004; CARVALHO et al., 2001).

O sabor característico do café como bebida está relacionado com a variedade e a espécie e é influenciado por tratos agrícolas, processos de secagem, fermentação, torra, moagem e acondicionamento (MONTEIRO; TRUGO, 2005; MELLO, 2001). Juntamente com a etapa de secagem, a torra, também denominada torrefação, torragem ou torração, quando referente ao café, se destaca dentre esses processos pela importância para a qualidade final da bebida, podendo ainda evidenciar e/ou ocultar características do grão. O grau de torra está relacionado com a cultura da região ou país consumidor. Os cafés brasileiros caracterizam-se por apresentar, em geral, torra intensa, onde o café atinge uma coloração marrom escuro, com baixa qualidade de bebida, e que permite mascarar procedimentos ilícitos, como adulterações (MONTEIRO, 2002; REDGWELL et al., 2002; FERNANDES et al., 2001). Nicolau-Souza et al. (2009), ao estudar 38 marcas de café torrado e moído comerciais, verificaram que existe um padrão, provavelmente associado à preferência do consumidor brasileiro, dos produtos apresentarem torra de intensidade média a escura. As amostras eram homogêneas quanto à umidade e aos parâmetros de cor, o que indicou similaridade no grau de torra, mesmo comparando-se produtos com denominações diferentes, como Forte, Extra-Forte, *Premium*, entre outras.

O consumidor brasileiro aponta como símbolo da qualidade de café o aroma forte e agradável, e em segundo lugar a pureza do produto (MAPA, 2009). Desta forma, destaca-se a importância da informação ao consumidor sobre qualidade e o que ela engloba no produto café. Sem a informação na embalagem de pelo menos a proporção de espécies, grau de torra e tipo de bebida, com termos padronizados, não há referências para se distinguir esta bebida de tão complexo e variável aroma e sabor (MORI, 2002). As características de identidade, a descrição dos atributos sensoriais das bebidas e do grau de torra vêm sendo abordados na

legislação nacional (BRASIL, 2008 e 2005). No entanto, a definição da espécie empregada só tem sido solicitada em legislações específicas de algumas unidades da federação (STF, 2009; SÃO PAULO, 2007; PARANÁ, 2002).

Compostos presentes em diferentes concentrações em *C. canephora* e *C. arabica* poderiam ser utilizados como ferramentas de discriminação em café onde ocorreu mistura das espécies. Para isto, no entanto, existe a necessidade de avaliar o comportamento desses compostos com a intensidade de torra, considerando a estabilidade térmica e a facilidade para quantificação. Foram estudados compostos hidrossolúveis (cafeína, ácido nicotínico, ácido clorogênico, trigonelina e ácidos cinâmicos) para este propósito (PERRONE; DONANGELO; FARAH, 2008; ALVES et al., 2006; DIAS, 2005; CAMPA et al., 2004; CASAL et al., 2000; MARTÍN; PABLOS; GONZÁLEZ, 1998; DAGLIA; CUZZONI; DECANO, 1994). O destaque maior foi para a cafeína por ter se mostrado estável às condições de torra testadas. Outros compostos de interesse para discriminação são provenientes da fração insaponificável do óleo do café: os diterpenos caveol e cafestol (CAMPANHA, 2008, RUBAYIZA; MEURENS, 2005; KURZROCK; SPEER, 2001a, 2001b; LAGO, 2001; URGERT et al., 1995; FREGA; BOCCI; LERCKER, 1994). A estabilidade destes compostos à temperatura não é consensual. Para diterpenos na forma livre (teor abaixo de 3,5 % no grão antes do processo de torra), foram relatadas perdas de até 80 % da quantidade inicial após o processo de torra (KÖLLING-SPEER; STROHSCHNEIDER; SPEER, 1999). Para a fração esterificada, há relatos de que caveol e cafestol foram degradados durante a torra (RUBAYIZA; MEURENS, 2005; KURZROCK; SPEER, 2001a, 2001b) e ainda, podem formar dehidroderivados em pequenas quantidades no final do processo (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006; CLARKE; VITZTHUM, 2001; LAGO, 2001). Speer e Kölling-Speer (2006) citaram a presença de outros produtos de decomposição como caveal, cafestal, isocaveol e dehidroisocaveol. Entretanto, outros estudos descreveram que os diterpenos são estáveis ao processo (DIAS, 2005; URGERT et al., 1995).

Existe ainda interesse em se estudar os diterpenos para elucidação dos mecanismos de produção de caveol e cafestol na planta do café. Essa avaliação auxiliaria na identificação de genes e elucidação das vias biossintéticas envolvidas, interessante aos estudos do genoma do cafeeiro, e permitiria analisar a relação desses compostos com a qualidade da bebida (VIEIRA et al., 2006). Diterpeno são

produtos de metabolismos secundário, que têm sido implicados na participação de importantes funções em plantas, como proteção contra herbívoros e patógenos microbianos (MCGARVEY; CROTEAU, 1995). Porém, nenhuma função biológica foi atribuída a esses componentes em café.

Os diterpenos têm sido também estudados quanto à contribuição para a saúde. Foi atribuída ao caveol e ao cafestol a ação protetora contra toxinas, propriedades anticarcinogênicas, antioxidantes e antiinflamatórias, além do efeito hepatoprotetor aos consumidores da bebida café (KIM; HWANG; JEONG, 2009; NKONDJOCK, 2009; LEE; CHOI; JEONG, 2007; LEE; JEONG, 2007; KIM et al., 2006; CAVIN et al., 1998 e 2002). Em contrapartida, a ação hipercolesterolêmica do cafestol também foi verificada (BOEKSCHOTEM et al., 2003; POSTE et al., 2000; URGERT et al., 1995; WEUSTEN-VAN DER WOUW et al., 1994). Comprovou-se ainda o efeito cosmético de diterpenos e um filtro solar composto por óleo de café foi patenteado (GROLLIER; PLESSIS, 1998; BERTHOLET, 1988), com estudo recente direcionado à extração do óleo que mantenha o *flavor* do café (ARRUDA et al., 2009).

Dessa forma, observa-se a necessidade de uma metodologia rápida e prática para avaliar os compostos em diferentes tecidos da planta de café e frutos em desenvolvimento e no produto final torrado. Diferentes metodologias têm sido exploradas para identificação e quantificação de caveol e cafestol. Já foram relatados o uso de Espectroscopia Raman (RUBAYIZA; MEURENS, 2005) e Cromatografia Gasosa (CG) (GUERRERO; SUÁREZ; MORENO, 2005; CASTILLO; HERRAIZ; BLANCH, 1999; ROOS et al., 1997; URGERT et al., 1995; LERCKER et al., 1995; PETTITT JR., 1987) para análise em bebida e frutos frescos inteiros. Contudo, destaca-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (ARAÚJO; SANDI, 2006; KURZOCK; SPEER, 2001b; CASTILLO; HERRAIZ; BLANCH, 1999; GROSS; JACCAUD; HUGGETT, 1997; PETTITT JR., 1987). Em trabalhos anteriores, um método semi-quantitativo por Espectrofotometria foi estudado para avaliação de caveol em amostras de café torrado e moído, com saponificação direta a quente, seguida de extração do diterpeno com solvente orgânico e limpeza com água (DIAS, 2005; ALVES, 2004). Porém, a metodologia não foi validada e testada em outros tecidos de café verde ou do cafeeiro.

Considerando o exposto, o capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica com as informações mais recentes e relevantes, abordando desde a

caracterização das espécies de café pela composição, destacando-se os compostos de interesse caveol e cafestol, até as metodologias utilizadas para análise, finalizado com a descrição dos objetivos do trabalho.

No capítulo 3, descreve-se o desenvolvimento e validação de uma metodologia por CLAE-DAD de fase reversa para quantificação simultânea de caveol e cafestol em tecidos de frutos frescos, folhas e cafés torrados e moídos, empregando-se amostras das espécies arábica e conilon.

No capítulo 4, está relatada a validação de uma metodologia espectrofotométrica aplicada a amostras de café torrado para quantificação de caveol, proposta como opção para avaliações de rotina, tendo em vista o menor preço e a maior disponibilidade do espectrofotômetro em comparação com o cromatógrafo a líquido. Testes foram também realizados com tecidos do fruto fresco e folhas de café arábica e conilon.

No capítulo 5, tem-se a aplicação da metodologia por CLAE a diferentes matrizes de café. Foram analisados os teores de diterpenos em tecidos de *C. arabica* e *C. canephora* e nos grãos ao longo da maturação. Determinaram-se as concentrações dos diterpenos em cafés torrados e moídos de espécies conhecidas (arábica e conilon) e em amostras comerciais, avaliando-se a eficiência dos diterpenos para a discriminação das espécies. Os resultados deste capítulo, em conjunto com outros dados, foram encaminhados para publicação ou estão em redação na forma dos artigos: “Discriminação de espécies de café por caveol e cafestol: influência da torra e defeitos” (Revista Coffee Science); “Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais” (Revista Química Nova); “Avaliação da variabilidade fenotípica entre genótipos de *C. arabica*, *C. canephora* e *Coffea* spp.”; “Avaliação das acumulações / degradações dos diterpenos durante o desenvolvimento do fruto de *C. canephora* e *C. arabica*”.

No capítulo 6, relata-se a comparação do método de extração proposto, por saponificação direta a quente, com outros descritos na literatura, para verificar a eficiência de cada método na quantificação de caveol e cafestol. O uso de CLAE-EM permitiu complementar o estudo pela identificação de possíveis produtos de degradação.

O capítulo 7 compreende o estudo da cinética da degradação e/ou formação de diterpenos e derivados durante o processo de torra em café arábica e conilon. A metodologia cromatográfica, adaptada para CLAE-DAD-EM/EM, foi

utilizada para identificação e quantificação dos compostos. A avaliação da estabilidade dos diterpenos é importante para definir o potencial de cafeol e cafestol como discriminadores de espécies em cafés torrados e moídos comerciais, onde o grau de torra pode ser diferenciado e não é conhecido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 07 jul. 2009.

AGUIAR, A. T. E. **Atributos químicos de espécies de café**. 2005. 87 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ALVES, S. T. **Desenvolvimento de metodologia analítica para diferenciação de café torrado arábica (*Coffea arabica*) e conilon (*Coffea canephora*) e misturas**. 2004. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ALVES, S. T.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T.; SCHOLZ, M. B. S. 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.

ARAÚJO, J. M. A.; SANDI, D. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, Oxford, v. 101, n. 3, p. 1087-1094, 2007.

ARRUDA, N. P.; REZENDE, C. C.; COURI, S.; PEREIRA, S. F.; SILVA, C. G. Perfil de voláteis, compostos fenólicos, atividade antioxidante e fator de proteção solar em óleo de café extraído por etanol. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 32. 2009, Fortaleza, **Proceedings...** São Paulo.

BERTHOLET, R. (1988) Preparation of a mixture of cafestol and kahweol. US Patent 4,748,258.

BOEKSCHOTEM, M. V.; ENGBERINK, M. F.; KATAN, M. B.; SCHOUTEN, E. G. Reproducibility of the serum lipid response to coffee oil in healthy volunteers. **Nutrition Journal**, Londres, v. 2, n.8, p.1-8, 2003.

BRASIL. Portaria nº 49, de 19 de março de 2008. Submete à consulta pública o Projeto de Instrução Normativa, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que aprovará o “Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade do Café Torrado em Grão e do Café Torrado e Moído”. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 6, 25 mar. 2008. Seção 1. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis->

consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18524>. Acesso em: 02 jul. 2009.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "Regulamento Técnico para Café, Cevada, Chá, Erva-mate e Produtos Solúveis". **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 set. 2005. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18837>>. Acesso em: 02 jul. 2009.

CAMPA, C.; BALLESTER, J. F.; DOULBEAU, S.; DUSSERT, S.; HAMON, S.; NAIROT, M. Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. **Food Chemistry**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 39-43, 2004.

CAMPANHA, F. G. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) pela composição de diterpenos**. 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CARVALHO, L. M.; SILVA, E. A. M.; AZEVEDO, A., A.; MOSQUIM, P. R.; CECON, P. R. Aspectos morfofisiológicos das cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.3, p.411-416, 2001.

CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; ALVES, M. R.; FERREIRA, M. A. Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3420-3424, 2000.

CASTILLO, M. L. R.; HERRAIZ, M.; BLANCH, G. P. Rapid analysis of cholesterol-elevating compounds in coffee brews by off-line high performance liquid chromatography / high resolution gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.47, n. 4, p. 1525-1529. 1999.

CAVIN, C.; HOLZÄUSER, D.; CONSTABLE, A.; HUGGETT, A. C.; SCHILTER, B. The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against aflatoxin B1-induced genotoxicity through a dual mechanism. **Carcinogenesis**, v.19, n.8, p. 1369-1375, 1998.

CAVIN, C.; HOLZHÄUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W. W.; SCHILTER, B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 8, p.1155-1163, 2002.

CLARKE, R. J.; VITZTHUM, O. G. **Coffee: Recent Developments**, 1a ed. EUA, 256p., 2001.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café: safra 2009, primeira estimativa**. Brasília: CONAB, 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1_levantamento_2009.pdf>. Acesso em: 02 jul. 2009.

DAGLIA, M.; CUZZONI, M. T.; DECANO, C. Antibacterial activity of coffee: relationship between biological activity and chemical markers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 10, p. 2273-2277, 1994.

DIAS, R. C. E. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) em diferentes graus de torra**. 2005. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Embrapa café**. Disponível em: <<http://www22.sede.embrapa.br/cafe/outros/links.htm>>. Acesso em: 02 jul. 2009.

FERNANDES, S. M.; PEREIRA, R. G. F. A.; THÉ, P. M. P.; PINTO, N. A. V. D.; CARVALHO, V. D. Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 3, p.197-199, 2001.

FREGA, N.; BOCCI, F.; LERCKER, G. High resolution gas chromatographic method for determination of robusta coffee in commercial blends. **Journal of High Resolution Chromatography**, Weinheim, v. 17, n. 5, p. 303-307, 1994.

GONZÁLEZ, A. G.; PABLOS, F.; MARTÍN, M. J.; LEÓN-CAMACHO, M.; VALDENEBRO, M. S. HPLC analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. **Food Chemistry**, Oxford, v.73, n.1, p.93-101, 2001.

GROLLIER, J.F.; PLESSIS, S. (1998) Use of coffee bean oil as a sun filter. US Patent 4,793,990.

GROSS, G.; JACCAUD, E.; HUGGETT, A. C. Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 6, 1997.

GUERRERO, G.; SUÁREZ, M.; MORENO, G. Chemosystematic study of diterpenoids in green coffee beans. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE (ASIC), 20. 2005, Paris, **Proceedings...** Paris. p. 292-296.

KIM, H. G.; HWANG, Y. P.; JEONG, H. G. Kahweol blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. **Toxicology Letters**, San Louis, v. 187, n. 1, p. 28-34, 2009.

KIM, H. G.; KIM, J. Y.; HWANG, Y. P.; LEE, K. J.; LEE, K. Y.; KIM, D. H.; KIM, D. H.; JEONG, H. G. The coffee diterpenes kahweol inhibits tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in human endothelial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 217, n. 3, p. 332-341, 2006.

KÖLLING-SPEER, I.; STROHSCHNEIDER, S.; SPEER, K. Determination of free diterpenes in green and roasted coffees. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, n. 1, p. 43-46, 1999.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Diterpenes and diterpene esters in coffee. **Food Reviews International**, v.17, n.4, p.433-450, 2001a.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Identification of kahweol fatty acid esters in Arabica coffee by means of LC / MS. **Journal of Separation Science**, v. 24, p. 843-848, 2001b.

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

LEE, K. J.; CHOI, J. H.; JEONG, H. G. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 11, p. 2118-2125, 2007.

LEE, K. J.; JEONG, H. G. Protective effects of kahweol and cafestol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 173, n. 2, p. 80-87, 2007.

LERCKER, G.; FREGA, N.; BOCCI, F.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. High resolution gas chromatographic determination of diterpenic alcohols and sterols in coffee lipids. **Chromatographia**, Wiesbaden, v.41, n.1/2, p.29-33, 1995.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Tendências de Consumo de Café – VI. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 02 jul. 2009.

MARTÍN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. **Talanta**, Amsterdam, v. 46, n. 6, p. 1259-1264, 1998.

MCGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 7, n. 7, p.1015-1026, 1995.

MELLO, E. V. A cafeicultura no Brasil. In: ENCONTRO SOBRE TECNOLOGIAS DE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE, 2001, Viçosa, **Anais...** Viçosa, 2001, p. 648.

MENDES, L. C. **Otimização do processo de torração do café robusta (*Coffea canephora conillon*) para formulação de blends com café arábica (*Coffea arabica*)**. 1999. 101 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MONTEIRO, M. A. A. **Caracterização sensorial da bebida de café (*Coffea arabica* L.): análise descritiva quantitativa, análise tempo-intensidade de testes afetivos**. 2002. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

MONTEIRO, M. COSTA; TRUGO, L. C. Perfil sensorial da bebida café (*Coffea arabica* L.) determinado por análise tempo-intensidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 772-780, 2005.

MORI, E. E. M. Qualidade dos cafés do Brasil. In: RENA, A. B. et al. (Org.). **Palestras do I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Brasília: Embrapa Café, 2002. p. 99-107.

NICOLAU-SOUZA, R. M.; CANUTO, G. A. B.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. **Química Nova**, São Paulo, 2009 (em análise).

NKONDJOCK , A. Coffee consumption and the risk of cancer: an overview. **Câncer Letters**, St. Louis, v. 227, n. 2, p. 121-125, 2009.

OIC – ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. Disponível em: <<http://www.ico.org>>. Acesso em: 02 jul. 2009.

PARANÁ. Lei nº 13.519, de 8 de abril de 2002. Estabelece obrigatoriedade de informação, nos rótulos de embalagens de café comercializado no Paraná, da porcentagem de cada espécie vegetal de que se compõe o produto. **Diário Oficial do Estado nº 6205**, Curitiba, 09 abr. 2002. Disponível em: <<http://www.legislacao.pr.gov.br/legislacao/listarAtosAno.do?action=exibir&codAto=3503&indice=10&anoSpan=2009&anoSelecionado=2002&isPaginado=true>>. Acesso em: 02 jul. 2009.

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

PETTITT JUNIOR, B. C. Identification of the diterpene esters in arabica and canephora coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 35, n. 4, p. 549-551, 1987.

POSTE, S. M.; ROOS, B.; VERMEULEN, M.; AFMAN, L.; JONG, M. C.; DAHLMANS, V. E. Cafestol increases serum cholesterol levels in apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice by suppression of bile acid synthesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. Dallas, v.20, n.6, p.155-156, 2000.

REDGWELL, R. J.; VÉRONIQUE, T.; CURTI, D.; FISHER, M. Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arábica coffee beans. **Carbohydrate Research**, Londres, v. 337, n. 5, p.421-431, 2002.

ROOS, B.; VAN DER WEG, G.; URGERT, R.; VAN DE BOVENKAMP, P.; CHARRIER, A.; KATAN, M. B. Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.45, n. 8, p. 3065-3069. 1997.

RUBAYIZA, A. B.; MEURENS, M. Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by Fourier Transform Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.12, p. 4654-4659, 2005.

SÃO PAULO. Resolução SAA (Secretaria de Agricultura e Abastecimento) nº 28, de 1 de junho de 2007. Define norma técnica para fixação de identidade e qualidade de café torrado em grão e café torrado moído. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, v. 117, n. 105, p. 27, 5 jun. 2007. Seção 1. Disponível em: <http://www.abic.com.br/serv_legislacao.html>. Acesso em: 02 jul. 2009.

SOUZA, V. F.; MODESTA, R. C. D.; GONÇALVES, E. B.; FERREIRA, J. C. S.; MATOS, P. B. Influência dos fatores demográfico e geográfico na preferência da bebida de café no estado do Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2004.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 201-216, 2006.

STF - SUPREMO TRIBUNAL FEDERAL. **Notícias STF**. Disponível em: <<http://www.stf.jus.br/portal/cms/verNoticiaDetalhe.asp?idConteudo=88456>>. Acesso em: 02 jul. 2009.

URGERT, R.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUIL, T. G.; VAN DE BOVENKAMP, P.; HOVENIER, R.; KATAN, M.B. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n.8, p. 2167-2172, 1995.

VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 95-108, 2006.

WEUSTEN-VAN DER WOUW, M. P. M. E.; KATAN, M. B.; VIANI, R.; HUGGETT, A. C.; LIARDON, R.; LUND-LARSEN, P. G.; THELLE, D. S.; AHOLA, I.; ARO, A; MEYBOOM, S.; BEYNEN, A. C. Identity of the cholesterol-raising factor from boiled coffee and its effects on liver function enzymes. **Journal of Lipid Research**, Stanford, v. 35, n.4, p.721-733, 1994.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E OBJETIVOS

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Caracterização das espécies de café pela composição química

O grão de café apresenta centenas de constituintes voláteis e não-voláteis de diversos compostos químicos, como ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos, cafeína e enzimas que têm ação sobre estes constituintes (SCHOLZ, 2008; AGUIAR, 2005; FRANK; ZEHENTBAUER; HOFMANN, 2006; FERNANDES et al., 2001; TRUGO; MOREIRA; DE MARIA, 1999 e 2000). Sessenta e dois compostos voláteis foram identificados apenas no *headspace* de frutos frescos, destacando-se aldeídos, ésteres, álcoois, cetonas e ácidos como grupos mais comuns (GONZALEZ-RIOS et al., 2007). Foi relatado que o aquecimento de café arábica, como no início de processo de torra, a 40 °C por 5 min, já se observa o desprendimento de um grande volume de compostos, chegando a uma expressiva quantidade de aproximadamente 1000 voláteis. Desta forma, o café processado contém mais componentes voláteis do que qualquer outro alimento ou bebida (ARAÚJO, 2001; NOLLET, 1996). A contribuição de cada uma destas substâncias para as propriedades sensoriais do café é bem variada, podendo ainda ocorrer interações sinérgicas e antagônicas (BASSOLI, 2006; TRUGO; MOREIRA; DE MARIA, 2000). Como exemplo, o gosto amargo característico da bebida é determinado principalmente por derivados quínicos (ex. ácido cafeoil quínico), ferúlicos (ex. ácido ferúlico), cafeína, trigonelina e outros complexos ésteres de substâncias cinâmicas e quínicas (FRANK; ZEHENTBAUER; HOFMANN, 2006), dependendo tanto da ocorrência de substâncias já presentes no café verde como de compostos formados no processo de torra.

Espécie, condições ambientais e prática de cultivo são fatores determinantes para as características físico-químicas do fruto fresco e conseqüentemente para os atributos sensoriais e composição da bebida a ser produzida a partir do grão torrado (SCHOLZ, 2008; AGUIAR, 2005).

O fruto de café arábica apresenta maiores concentrações de carboidratos, proteínas e de lipídios comparado ao conilon, que exhibe valores mais elevados de compostos fenólicos e de cafeína (LOPES, 2000; TRUGO; MOREIRA;

DE MARIA, 1999 e 2000). No arábica, a soma das quantidades de cafeína, trigonelina, ácidos clorogênicos totais (ACGs) e sacarose representa 16 % em média de matéria seca.

No conilon, o teor destes componentes chega a 20 % no café verde (KY et al., 2001). Fernandes et al. (2001) estudaram a composição química dos cafés conilon e arábica de diferentes safras cultivadas no Brasil. Constatou-se no arábica maior teor de proteína bruta, fibra bruta, extrato etéreo e maior pH. Não houve diferença significativa para os teores do resíduo mineral fixo e acidez titulável total entre as espécies estudadas.

Estão presentes no café torrado arábica e conilon os minerais P, Mg e Ca, em concentrações (em base seca) em décimos por cento e Mn, Fe, Cu, Na, e K, em unidades de mg % de produto (MARTÍN; PABLOS; GONZÁLEZ, 1998; CARVALHO; CHAGAS; SOUZA, 1997).

O teor de lipídios é proporcionalmente aumentado, com o processo de torra, devido à degradação de carboidratos e perda de compostos voláteis (OOSTERVELD; VORAGEN; SCHOLS, 2003; REDGWELL et al., 2002). A concentração de lipídios é em torno de 15 % para café arábica e 10 % para conilon após o processo de torra, segundo Kurzrock e Speer (2001a). Além dos triacilgliceróis (75 % dos lipídios) e dos ésteres de ácidos graxos diterpênicos (pode chegar próximo de 20 % dos lipídios), observou-se quantidade considerável de outros componentes lipídicos específicos, como mostra a Tabela 2.1 (LAGO, 2001; KURZROCK; SPEER, 2001a). O teor de matéria insaponificável (MI) no óleo de café é relativamente alto (9,0 a 13,4 %) comparado com os óleos vegetais (em geral abaixo de 1 %). As MIs são constituídas principalmente por dois compostos, cafestol e caveol (LAGO, 2001), presentes em maior quantidade no café arábica.

Tabela 2.1 – Principais componentes lipídicos em frutos de café.

Classes	Café arábica		Café conilon	
	Fresco	Torrado	Frescos	Torrado
AGL	0,95	0,72	0,98	0,09
Não-Identificados	0,53	0,86	tr	tr
Esteróis	0,06	0,06	tr	tr
DG + AD	15,46	14,15	7,04	10,95
TG + E	83	84,21	91,98	88,95

AGL=ácidos graxos livres, DG=diacilgliceróis; AD=álcoois diterpênicos; TG=triacilgliceróis; E=outros ésteres. tr=quantidades traço, nas condições utilizadas. Resultados em g/100 g de lipídios em base seca. Fonte: Lago (2001).

É possível verificar que tanto a composição relacionada com macronutrientes quanto a com microelementos mostram variações de qualidade e quantidade quando são comparadas diferentes espécies de café. Dessa forma, muitos compostos poderiam ser utilizados na caracterização ou como potenciais indicadores para as espécies arábica e conilon. No entanto, outro fator importante são os processos em que os grãos são submetidos até a obtenção do café torrado. Desde os tratamentos agrícolas, passando pelos processos industriais, com destaque para a torra, mostram influência para a composição do produto. Assim, as concentrações de vários desses componentes (como cafeína, trigonelina, ácido nicotínico, ácidos clorogênicos) variam não apenas em função da espécie, mas também da presença de defeitos e grau de torra (PERRONE et al., 2008; RAMALAKSHMI; KUBRA; RAO, 2007; VASCONCELOS et al., 2007; FARAH; DONANGELO, 2006; DIAS, 2005; FRANCA et al., 2005; ALVES, 2004; CAMPA et al., 2004; KY et al., 2001; CASAL et al., 2000; TRUGO; MOREIRA; DE MARIA, 2000; CASAL; OLIVEIRA; FERREIRA, 2000; TRUGO; MOREIRA; DE MARIA, 1999; MARTÍN; PABLOS; GONZÁLEZ, 1998; BICCHI et al., 1995; DAGLIA; CUZZONI; DECANO, 1994). Caveol e cafestol se destacam por não terem seus teores muito afetados pela intensidade de torra e pela pouca influência da presença de grãos PVA, denominação para os grãos classificados como defeituosos para a qualidade do produto torrado (preto, verde e ardido) na concentração (CAMPANHA, 2008; DIAS, 2005; URGERT et al., 1995).

2.1.2 Diterpenos do café

O caveol e cafestol são classificados como álcoois de diterpeno pentacíclico baseados na fusão de unidades de isopreno (C5) para formar o esqueleto de caurano de 20 carbonos (Figura 2.1). A diferença estrutural é pequena entre os dois diterpenos. O caveol mostra uma dupla ligação entre os carbonos 1 e 2, e esta variação resulta em um espectro com pico de absorção em diferente comprimento de onda (Figura 2.1).

Pettitt Jr. (1987) e Speer, Tewis e Montag (1991) estudaram outro diterpeno de interesse, o 16-O-metilcafestol (Figura 2.2), composto presente apenas no café conilon em quantidades relativamente baixas e em outra espécie utilizada apenas para experimentos de melhoramento genético, de irrelevante expressão comercial, o excelsa (*Coffea dewevrei* De Wild e Durand). Foi sugerido que este componente também poderia ser usado como indicador das espécies arábica e conilon em misturas no produto torrado, já que é termicamente estável (KEMSLEY; RUAULT; WILSON, 1995; SPEER; TEWIS; MONTAG, 1991). Porém, não existe um padrão comercial de 16-O-metilcafestol disponível, o que dificulta o desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação deste composto.

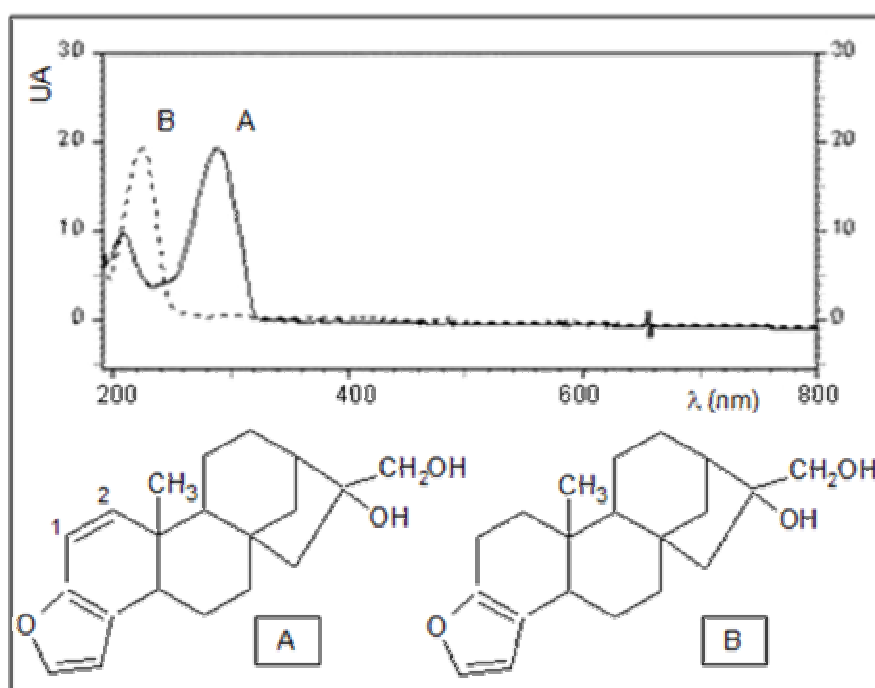


Figura 2.1 – Espectro (190 a 800 nm) de caveol (A) e cafestol (B) obtidos com padrão comercial.

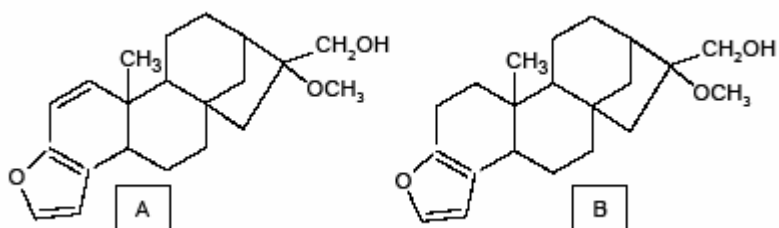


Figura 2.2 – Estruturas de 16-O-metilcaveol (A) e 16-O-metilcafestol (B) sugeridas por Roos et al. (1997) e Pettitt Jr. (1987), respectivamente.

Os diterpenos estão presentes na forma livre ou como monoésteres de ácidos graxos. Urgert e Katan (1997) mostraram que a maior ocorrência de diterpenos em café é na forma esterificada. Kurzrock e Speer (2001a) relataram que podem existir no grão de café até 14 diferentes ésteres de ácidos graxos derivados do cafestol, 12 derivados do caveol e 12 do 16-O-metilcafestol.

Alguns trabalhos citaram que o cafestol e o caveol podem sofrer desidratação durante o processo de torra, formando pequenas quantidades de dehidrocafestol e dehidrocaveol (SCHARNHOP; WINTERHALTER, 2009; SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006 LAGO, 2001) (Figura 2.3), porém, sem o monitoramento das quantidades formadas.

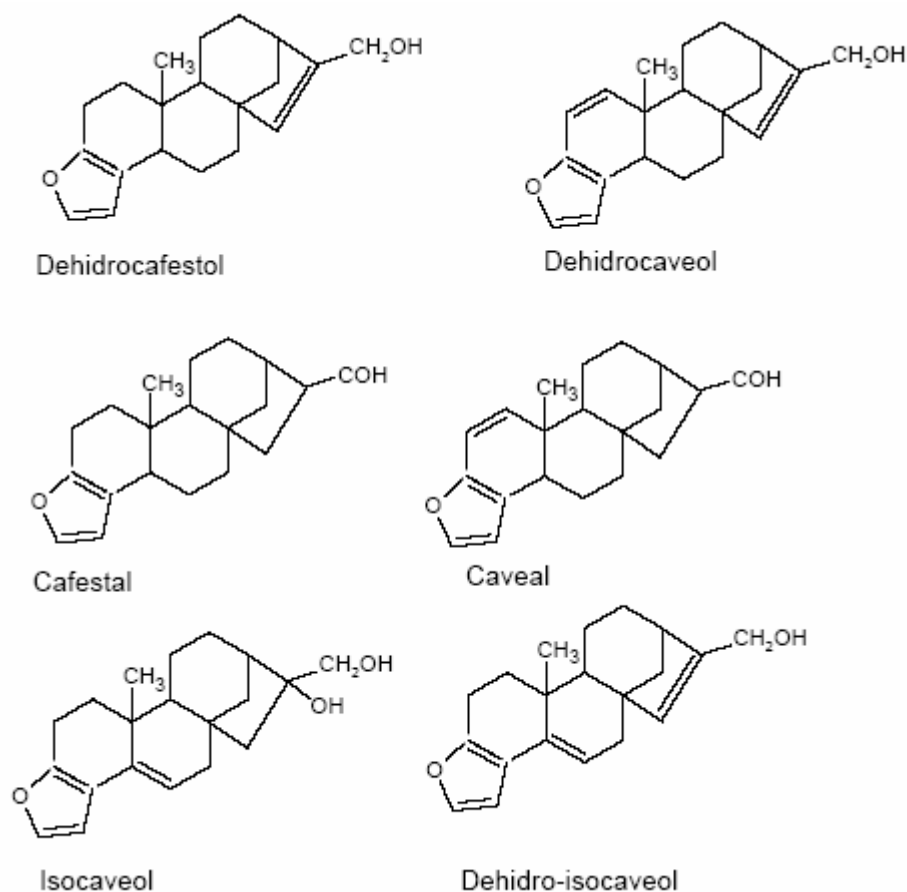


Figura 2.3 – Estruturas de compostos sugeridas por Speer e Kölling-Speer (2006) para possíveis degradados de caveol e cafestol em café torrado.

Isômeros de função foram também detectados, e estruturas foram sugeridas por Speer e Kölling-Speer (2006) para os produtos de degradação denominados cafestal, caveal, isocaveol e dehidroisocaveol (Figura 2.3). Porém, esses compostos estariam presentes em quantidades muito baixas em café torrado, mas também a quantificação não foi efetuada.

2.1.3 Diterpenos nos tecidos do café, grãos torrados e bebidas de café: teores e distribuição

Estudos sobre o desenvolvimento de diferentes tecidos do café, como raízes, frutos, folhas e flores são raros, se comparados com outras culturas, e estão mais focados em *C. arabica*. Por razões técnicas, esses estudos ainda são

realizados em casa de vegetação ou sob condições controladas, uma vez que o crescimento de partes vegetativas como ramo, folhas e raízes está sujeito a alterações drásticas causadas por fatores edafo-climáticos (SONDAHL; BAUMANN, 2001). Portanto, a composição dos tecidos varia com o estágio de desenvolvimento da planta, especialmente os tecidos da fase reprodutiva (da floração até a completa maturação). Além disso, é difícil padronizar a maturação dos grãos por não haver sincronia neste processo e pelas variabilidade que existe entre cafeeiros, dificultando o estudo das características dos diferentes tecidos dos frutos de café (DE CASTRO et al., 2005).

O tempo de desenvolvimento dos frutos é medido em unidades de dias (DAF), semanas (SAF) ou meses (MAF) após a florada. Cada espécie necessita de um tempo determinado para ser considerada madura, o que é baseado na composição do fruto, na proporção entre os diferentes tecidos, cor e tamanho do grão. *Coffea arabica* e suas cultivares são consideradas maduras entre 24 e 32 SAF, enquanto que, para *Coffea canephora* e cultivares, este tempo é de 36 a 44 SAF (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006).

Com o avanço do processo de maturação, a proporção e composição dos diferentes tecidos do fruto do café também variam. Em estudo com *C. arabica* var. Bourbon e Acaiá Cerrado foi relatado que ocorre um aumento acelerado do tamanho do fruto entre 0 e 7 SAF, com um máximo em 17 SAF (WORMER, 1966, apud DE CASTRO; MARRACCINI, 2006). O início do crescimento do fruto coincide com o rápido desenvolvimento do perisperma, até 12 SAF, tempo em que se verifica o início da formação do endosperma. Este tecido continua a se formar até aproximadamente a 19^a SAF a partir do perisperma. No estágio de maturação, entre a 30^a e a 35^a SAF, apenas uma fina camada de perisperma está presente no interstício do endosperma. Este compõe a maior parte do chamado grão verde, que será posteriormente processado ou comercializado (Figura 2.4).

O amadurecimento do fruto de café é visível pela mudança de coloração do pericarpo, denominado comumente de polpa (Figura 2.4). O fruto considerado maduro adquire uma coloração avermelhada ou amarelada e indica o melhor período para a colheita, onde a composição é a mais apropriada para se obter uma bebida de melhor qualidade.

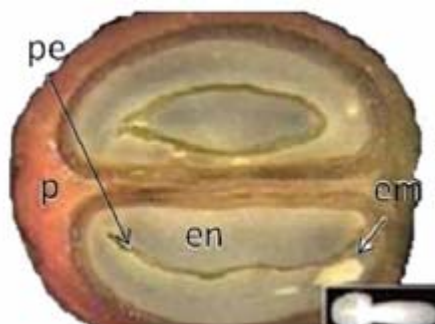


Figura 2.4 – Corte longitudinal do fruto de *C. arabica* cv. Acaiá Cerrado maduro (34 semanas após a florada) (DE CASTRO et al., 2002). É destacado o pericarpo (p), a grande proporção de endosperma (en) que envolve a fina camada de perisperma (pe) e o embrião (em) presente no endosperma e isolado (no detalhe).

O fruto colhido em estágio precoce de maturação, considerado “defeituoso” para a qualidade da bebida, contribui com um efeito adstringente indesejável (FRANCA et al., 2005; MAZZAFERA, 1999). Foi verificado que o *headspace* de frutos pouco maduros apresenta diferente composição de voláteis comparada ao de frutos maduros tanto em quantidade, considerando compostos presentes em comum, quanto em qualidade. Foram relacionados compostos especificamente de grãos verdes, avaliados como potenciais marcadores de defeitos em misturas de grãos sadios e defeituosos (FARAH; TOCI, 2008).

A elucidação da distribuição dos diterpenos nos diferentes tecidos que compõe o fruto, considerando a maturação, além da avaliação desses compostos em tecidos de folhas, ramos, botão floral e raiz auxiliaria na identificação de genes e na elucidação das vias biossintéticas envolvidas na produção destes compostos, interessante aos estudos do genoma do cafeeiro (VIEIRA et al., 2006).

Não existe na literatura relato relacionado à análise de diterpenos em raiz, botão floral ou ramo do cafeeiro. Apenas um trabalho relatou o perfil de caveol e cafestol em folha. Para *Coffea arabica*, o teor máximo descrito foi de próximo a 100 mg de cafestol/100 g de folha e menor que 1 mg de caveol/100 g. Para *C. canephora*, as quantidades foram inferiores, 4,9 mg de cafestol/100 g de folha e 0,4 mg de caveol/100 g (KÖLLING-SPEER; SPEER, 1997).

A literatura mostra ampla faixa de concentração de diterpenos para frutos frescos inteiros. Os teores estiveram entre 250 e 670 mg de cafestol/100 g de *C. arabica* e 90 a 350 mg de caveol/100 g, sem cultivar ou origem especificada

(KURZOCK; SPEER, 2001a; KÖLLING-SPEER et al., 1997). Kölling-Speer e Speer (1997) relataram para o *C. arabica* cv. San Ramon, originário do Quênia e Jamaica, médias de 120 e 250 mg/100 g para cafestol e caveol, respectivamente.

A origem geográfica das amostras de *C. canephora* mostrou influência significativa na composição dos diterpenos em diversos trabalhos. Foi reportada grande variação no teor de cafestol, de 40 a 700 mg/100 g de amostras de frutos frescos obtidos em países americanos, africanos e asiáticos (DURAND, 2006; SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006; KÖLLING-SPEER; KURZOCK; SPEER, 2001; KURZOCK; SPEER, 2001a; SPEER; KÖLLING-SPEER, apud CLARKE; VITZTHUM, 2001; SEHAT; MONTAG; SPEER, 1999; ROOS et al., 1997).

Na revisão sobre lipídios em café, Speer e Kölling-Speer (2006) relataram que a soma de caveol e cafestol para café arábica verde variou de aproximadamente 700 a 1300 mg/100 g de amostra (em base seca), dependendo da origem geográfica (amostras da África, América Central, América do Sul e Ásia). Em café conilon, a quantidade de caveol foi relativamente baixa, de não detectável a 30 mg/100 g. O 16-O-metilcaveol, composto menos estudado que caveol e cafestol por se apresentar em concentrações baixas e não existir padrão comercial, esteve presente apenas no café conilon em teores inferiores a 10 % do teor de caveol. Teores entre 225 e 700 mg de cafestol/100 g de amostra foram observados para o café conilon. A quantidade de 16-O-metilcafestol (Figura 2.2) esteve entre 10 e 50 % do teor de cafestol para as amostras dos diferentes continentes.

Frega, Bocci e Lercker (1994), trabalhando com amostras de diferentes origens geográficas, relataram também grande variabilidade nos teores de caveol, cafestol e 16-O-metilcafestol tanto para arábica quanto para conilon (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Teores^a de diterpenos do café

	Caveol	Cafestol	16-O-metilcafestol
Arábica ^b	414,8-672,7	299,4-583,6	1,8-14,5
Conilon ^c	3,6-12,5	76,4-190,1	45,3-138,9

^aEm mg/100 g de amostra (min-máx). ^bDez amostras; ^cSete amostras.

Fonte: Frega; Bocci; Lercker (1994)

No trabalho de Roos et al. (1997), estudando *C. canephora*, cafestol esteve presente em todas as espécies e variedades de frutos de café frescos, e o caveol, ausente em algumas delas. As variedades apresentaram teores entre 236 e 251 mg/100 g (em base seca) de cafestol, 5 a 8 para caveol e de 102 a 154 mg/100 g para 16-O-metilcafestol.

Urgert et al. (1995) relataram que o grão verde de café conilon apresenta em torno de 200 mg/100 g para cafestol e caveol somados, em contraposição ao arábica, com 1300 mg dos diterpenos/100 g. Ao considerar a torra, os mesmos autores citaram que torra intensa (até 26,5 % de perda de peso do grão) não reduziu o teor de diterpenos no café arábica torrado. A concentração se manteve em 560 mg de cafestol/100 g e 730 mg de caveol/100 g. Essa afirmação discorda do relatado por outros trabalhos, que descreveram que o processo de torra promove desidratação de cafestol e caveol, formando dehidroderivados (SCHARNHOP; WINTERHALTER, 2009; SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006). No estudo conduzido por Speer e Kölling-Speer (apud CLARKE; VITZTHUM, 2001) observou-se que, para café arábica e conilon, a relação cafestol/dehidrocafestol diminuiu desde a torra à temperatura de 230°C (relação de 40) até 260°C (relação de 7), indicando que o processo de torra induz a degradação de cafestol e formação de dehidrocafestol. Os autores sugeriram que esta relação poderia ser utilizada como medida do grau de torra de amostras de café.

Considerando-se a bebida do café, Speer e Kölling-Speer (2006) descreveram que o teor de diterpenos depende do método de preparação e está diretamente relacionado com o teor total de lipídios extraídos, que variou de 0,2 % para café filtrado chegando a 22 % no estilo Escandinavo. Urgert et al. (1995) avaliaram bebidas coletadas em estabelecimentos da Europa, preparadas por diferentes métodos. Verificou-se que os diterpenos são retidos no filtro de café e o teor destes compostos é negligenciável em cafés instantâneos. Os cafés “French press”, “Escandinavo evaporado” e os cafés agrupados como “turco/grego” apresentaram maiores quantidades de diterpenos (Tabela 2.3), ao contrário de bebidas obtidas por filtração em papel, que mostraram teores muito baixos de lipídios.

Tabela 2.3 – Teores^a de cafestol, caveol e 16-O-metilcafestol de amostras de bebida café coletados em diferentes estabelecimentos comerciais de diversos países

Tipo	Cafestol	Caveol	16-O-metilcafestol
Escandinavo (evaporado) (n=14)	3,0 ± 2,8	3,9 ± 3,4	Não detectado
Café turco/grego (n=11)	3,9 ± 3,2	3,9 ± 3,9	0,5 ± 0,6
French Press (n=5)	3,5 ± 1,2	4,4 ± 2,1	0,1 ± 0,1
<i>Espresso</i>			
Itália (n=10)	3,0 ± 2,8	1,8 ± 1,3	0,1 ± 0,1
Outros países (n=21)	3,0 ± 2,8	1,4 ± 1,1	0,1 ± 0,1

^a Média ± desvio-padrão, em mg de diterpenos por xícara (aproximadamente 150 mL).

Fonte: Urgert et al. (1995).

Observa-se assim que a disponibilidade de dados sobre a composição de diterpenos, desde a planta do café até o produto final, ainda é limitada. Apesar de haver dados para frutos frescos inteiros, nenhum estudo apresentou informações sobre a distribuição dos diterpenos nos diferentes tecidos do fruto fresco em separado (pericarpo, perisperma e endosperma). Quanto ao café torrado, existem divergências tanto relativas aos teores de caveol e cafestol, quanto também à estabilidade desses compostos com o grau de torra. A grande diversidade de variedade e cultivares, origem geográfica e processamento, somada à diferença na confiabilidade das técnicas analíticas empregadas em cada caso, dificulta a avaliação do quanto da variabilidade das concentrações dos diterpenos está associada apenas à espécie de café.

2.1.4 Importância dos diterpenos para a saúde do consumidor e qualidade do produto

Uma das maiores preocupações atuais da cafeicultura nacional é tornar o produto brasileiro competitivo internacionalmente em nível de qualidade, aliando-se assim ao aspecto econômico (ASSAD et al., 2002; LOPES, 2000). Muitas campanhas e linhas de pesquisa têm sido conduzidas para manter a ascensão da produção de café baseando-se na melhora de qualidade do produto e na importância do consumo para benefícios à saúde. Dessa forma o estudo de

compostos importantes tanto do ponto de vista de saúde quanto da garantia de qualidade da bebida torna-se relevante.

Os diterpenos têm recebido destaque pelos efeitos tanto benéficos, como ação antioxidante e anticarcinogênica, quanto prejudiciais à saúde dos consumidores, como a ação hipercolesterolêmica (HIGDON, FREI, 2006).

As primeiras pesquisas que agregaram informações publicadas sobre a relação entre o consumo de café e a elevação do nível de colesterol no sangue foram reportadas por Thelle, Heyden e Fodor (1987). Foram reunidos 22 estudos, que envolveram aproximadamente 130.000 pessoas de 8 países. A análise geral dos estudos epidemiológicos mostrou que havia pouca elucidação sobre a relação entre a taxa de colesterol e ingestão da bebida café, e muito ainda deveria ser explorado: 8 estudos demonstraram associação positiva para ambos os sexos (o nível de colesterol elevava-se significativamente devido a ingestão de café); 5 estudos concluíram que a relação suposta não existia. Em 3 estudos com homens e mulheres, foi evidenciada a relação positiva apenas para o sexo feminino. Dos 6 estudos restantes, que investigaram apenas homens, 4 reportaram uma significativa correlação entre café e colesterol. Alguns experimentos mostraram que o método de obtenção da bebida influenciaria os níveis de colesterol dos consumidores, em concordância com trabalhos mais recentes (TERPSTRA et al., 2000; CASTILLO; HERRAIZ; BLANCH, 1999; URGERT et al., 1995; DUSSELDORP et al., 1991). Deve-se destacar que não existem dados clínicos de estudo, por exemplo, de biodisponibilidade de cafeol e cafestol.

Os resultados do estudo de Weusten-Van Der Wouw et al. (1994), têm sido utilizados para estimar a elevação do nível de colesterol com a quantidade de diterpenos consumida em humanos. A ação do cafeol sobre o colesterol foi desprezível, comparada a do cafestol. A conversão estimada foi de que a cada 10 mg de cafestol consumido, ocorre um aumento de 5 mg de colesterol/dL sanguíneo. Assim, em trabalhos posteriores, apenas o cafestol foi testado para o estudo do efeito da ingestão no nível de colesterol (BOEKSCHOTEM et al., 2003; POSTE et al., 2000). O efeito hipercolesterolêmico está relacionado provavelmente com a inibição da síntese de ácido biliar por parte do cafestol, implicando na diminuição da intensidade de degradação de colesterol no fígado humano (BOEKSCHOTEN et al., 2003; POSTE et al., 2000).

Kurzrock e Speer (2001a e b) destacaram em seus trabalhos a

importância da caracterização dos diterpenos em café por estes compostos mostrarem-se possíveis causadores do aumento do nível de colesterol humano após ingestão da bebida, e, por outro lado, induzir a degradação de substâncias tóxicas e proporcionar ação protetora contra aflatoxina B1. Os estudos foram conduzidos para ratos. Atualmente, o foco dos trabalhos com diterpenos na área de saúde tem sido avaliar os benefícios do consumo, estudando propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, efeitos hepatoprotetor e anticarcinogênico (NKONDJOCK, 2009; KIM HWANG; JEONG, 2009; HIGGINS et al., 2008; TAO et al., 2008; LEE; CHOI; JEONG, 2007; LEE; JEONG, 2007; KIM et al., 2006; CAVIN et al., 2002; CAVIN et al., 1998).

As funções de quimioproteção desempenhadas pelo cafestol e caveol em frutos frescos e grãos torrados de café fizeram com que companhias multinacionais obtivessem patentes para aplicações destes diterpenos. De acordo com Cavin et al. (1998 e 2002), a exposição a doses aceitáveis de diterpenos em relação à atividade hipercolesterolêmica pode ser benéfica em relação às propriedades nutracêuticas, dadas, principalmente, pelo potencial anticarcinogênico destas substâncias. Esta observação coloca os diterpenos em uma classe de compostos a qual pode ser considerada futuramente para a inclusão em alimentos como aditivo (HUBER et al., 2002), além de poderem ser utilizados na indústria farmacêutica e de cosméticos. O uso do óleo de grão de café como um filtro solar foi patenteado devido à sua capacidade para funcionar como cosmético (GROLLIER, PLENSSIS, 1998) e possuir propriedades antiinflamatórias (BERTHOLET, 1988). A extração do óleo que mantenha ao máximo o *flavor* do café tem sido desenvolvida em função da valorização do produto final para destinação às indústrias alimentícia e cosmética (ARRUDA et al., 2009).

Diante deste panorama, cresce cada vez mais o interesse de se desenvolver cultivares de café com maior ou menor teor de diterpenos, dependendo do destino a que será dedicado.

Recentemente, foi finalizado o projeto Genoma Café, que consiste no seqüenciamento em larga escala de genes expressos de café e visa buscar novos conhecimentos sobre as bases genéticas e moleculares de características agrônômicas relevantes no cafeeiro. Através deste trabalho, muitos genes poderão ser identificados e corretamente caracterizados funcionalmente. A informação das seqüências de genes expressos de café, agora disponíveis, abre novos caminhos

para a identificação dos principais genes que controlam as vias biológicas importantes, como as implicadas na biossíntese dos diterpenos. A identificação e caracterização de genes envolvidos no metabolismo de cafestol e caveol durante a formação dos frutos de café podem proporcionar melhor compreensão das relações entre estes compostos e a qualidade da bebida, uso para a indústria cosmética e para a saúde humana (VIEIRA et al., 2006).

Alguns estudos vêm sendo desenvolvidos em relação às vias de produção de diterpenos na planta e frutos de café. Estas pesquisas sugerem uma importante variabilidade da expressão, estabilidade, atividade e localização das enzimas envolvidas na síntese de cafestol. O conhecimento das enzimas e dos seus genes correspondentes, envolvidos na via metabólica de diterpenos em outras espécies, sugere que a presença exclusiva de cafestol e caveol no gênero *Coffea* é ligada à ação de enzimas específicas capazes de reconhecer e modificar o grupo caurano, produzindo cafestol e compostos relacionados, como 16-O-metilcafestol e caveol (TRAPP; CROTEAU, 2001; BOHLMANN; MEYER-GAUEN; CROTEAU, 1998; ROOS et al., 1997). Entretanto, estas enzimas são desconhecidas até o momento, assim como o mecanismo de sua ação. Para a identificação e caracterização dos genes envolvidos no metabolismo de diterpenos, é necessário o emprego de metodologia que permita a quantificação de caveol e cafestol em diferentes tecidos (folha, endosperma, perisperma, pericarpo) durante a formação dos frutos.

Com relação à qualidade do produto café torrado, a quantificação de diterpenos poderia permitir a identificação das espécies presentes no produto comercial para informação ao consumidor. Embora de qualidade sensorial inferior, o café conilon é um produto atraente para a adição ao arábica, podendo ser utilizado em *blends* comerciais para padronização de sabor e diminuição dos custos do café torrado (SOUZA et al., 2004; BRAGANÇA et al., 2001; CARVALHO et al., 2001; MENDES, 1999). Em frutos maduros, as espécies podem ser distinguidas visualmente, já que a coloração e forma são diferenciadas. Depois de torrados e moídos, essa distinção não é mais possível, sendo necessárias outras formas de discriminação (LAGO, 2001; KEMSLEY; RUAULT; WILSON, 1995).

WURZIGER (1977 e 1985) foi o primeiro pesquisador que se tem relato a tentar utilizar os diterpenos com o objetivo de discriminar espécies de café, propondo uma metodologia para diferenciação aplicável a cafés crus e torrados. A extração da fração lipídica foi feita em Soxhlet, seguida de saponificação a frio.

Utilizou-se reações da matéria insaponificável com ácido clorídrico e iodeto de potássio em meio ácido. A diferença de cor, avaliada por medidas de absorvância a 290 nm (λ de máxima absorção do caveol) e 630 nm (λ máximo do produto de reação), podia ser atribuída aos baixos teores de caveol no café conilon. O método, no entanto, era empírico e pouco quantitativo, não sendo mais encontrada na literatura a sua aplicação.

Alves, Scholz e Benassi, 2003 desenvolveram uma metodologia espectrofotométrica para diferenciação de cafés torrados arábica e conilon, a partir do proposto por Wurziger (1985), padronizando a extração do caveol e condições das reações colorimétricas. Como somente a matéria insaponificável, que continha o caveol, era de interesse, foi utilizada na extração uma adaptação do método proposto por Urgert et al. (1995) para quantificação de diterpenos em café. Foram realizadas extrações a quente, utilizando terc-butil metil éter e limpeza com água. Após reações colorimétricas com iodeto de potássio e ácido clorídrico, mediram-se as absorvâncias a 290 e 630 nm. A técnica foi empregada para café conilon e diferentes variedades de arábica (Iapar-59, Acaia, Mundo Novo e Catuaí), mostrando-se eficiente na identificação das espécies. A metodologia, no entanto, não permitia uma avaliação quantitativa de caveol devido à não utilização de um padrão comercial e à leitura dos extratos ser feita numa faixa muito alta de absorvância, além do fato de não ter sido validada (ALVES, 2004).

Em trabalho subsequente, DIAS (2005), com o objetivo de verificar o potencial de discriminação dos diterpenos de amostras de café torrado em diferentes graus em misturas de variadas proporções, fez um estudo da padronização das diluições das soluções de leitura de cor e definição dos comprimentos de onda mais adequados para avaliação das reações colorimétricas. Sugeriu-se que a técnica espectrofotométrica com KI e leitura a 620 nm poderia ser utilizada como método de triagem na identificação da adição de conilon ao arábica em cafés com diferentes graus de torra, desde que fosse validada. Mostraram-se ainda que outros parâmetros, como medidas de cor e teores de compostos do extrato hidrossolúvel, eram úteis quando analisados em conjunto, para a separação das espécies em misturas.

Outras técnicas têm sido avaliadas para análise de diterpenos com a finalidade de caracterização de espécies de café. Rubayiza e Meurens (2005) utilizaram Espectroscopia Raman com Transformada de Fourier, técnica baseada no

espalhamento de radiação laser monocromático por interação com vibrações moleculares, acompanhadas por uma variação da polarizabilidade nas ligações químicas. A intensidade do espalhamento é diretamente proporcional a concentração da molécula em estudo, produzindo o efeito Raman (RUBAYIZA; MEURENS, 2005; SKOOG; HOLLER; TIMOTHY, 2002). Para avaliação de cafeol e cafeol, foi coletada grande variedade de amostra, de 25 origens dentro do território belga, incluindo café arábica (124 coletas) e conilon (42), torradas e não torradas. Os espectros indicaram a diferença estrutural entre cafeol e cafeol (dupla ligação entre os carbonos 1 e 2, Figura 2.1) e identificaram todas as frequências vibracionais relacionadas às ligações químicas entre os átomos destes diterpenos. Utilizando Análise de Componentes Principais (ACP) como ferramenta discriminativa, verificou-se que maiores teores de cafeol foram obtidos para cafés arábica, e plantas de regiões mais altas, provavelmente relacionado com a temperatura do local. Os autores afirmaram que o método possibilitaria a distinção da origem botânica de cafés torrados e não torrados. Porém, o equipamento e a técnica são considerados relativamente caros e menos usuais na área de alimentos.

Pode-se observar que diferentes metodologias que têm sido desenvolvidas para avaliação de cafeol e cafeol em café, com objetivos diversos, como o estudo da produção desses compostos na planta, diferenciação de espécies em produto torrado e efeitos do consumo da bebida. Contudo, o destaque é para o emprego de técnicas cromatográficas como Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), cujo emprego será descrito no item 2.1.5.2.

2.1.5 Metodologias para avaliação de diterpenos

A necessidade de se desenvolver técnicas analíticas eficientes e viáveis para avaliação qualitativa e quantitativa dos diterpenos em cafés é evidenciada pelo interesse na qualidade de produto e o impacto dessa classe de substâncias na saúde humana. Nos itens a seguir estão detalhados os principais procedimentos relatados na literatura para a extração e posterior identificação e quantificação, por técnicas cromatográficas, de cafeol e cafeol em café.

2.1.5.1 Métodos de extração e preparo de amostra

A determinação de lipídios em alimentos é feita usualmente pela extração com solventes orgânicos. Na extração, é esperado que ocorra apenas um processo físico, ou seja, a transferência de constituintes solúveis de um material inerte para o solvente com o qual a matriz está em contato. O lipídio deve ser recuperado sem que ocorra reação química relevante, principalmente quando o objetivo é a análise subsequente de componentes, como é o caso dos diterpenos.

O método clássico e oficial para determinação de lipídios da Association of Analytical Communities (AOAC, 1990) é por aparelho tipo Soxhlet, onde ocorre passagem de um solvente pela amostra (extração contínua), por refluxo aquecido, seguida da remoção por evaporação ou destilação do solvente (SOXHLET, 1879). O resíduo obtido é constituído por todos os compostos que, nas condições da determinação, possam ser extraídos pelo solvente: ácidos graxos livres, ésteres de ácidos graxos, lecitinas, ceras, carotenóides, clorofila e outros pigmentos, além dos esteróis, fosfatídios, vitaminas A e D, óleos essenciais e também os diterpenos (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

Brum (2004), em revisão sobre extração de lipídios em alimentos, sugere o uso de outros procedimentos de extração que não Soxhlet, pois o refluxo do solvente aquecido por muitas horas favorece as reações de peroxidação e hidrólise, o que poderia comprometer resultados analíticos posteriores. Um dos mais versáteis e efetivos é o método Bligh Dyer (BLIGH; DYER, 1959), uma versão simplificada do procedimento usando clorofórmio-metanol proposto por Folch, Lees e Stanley (1957), este definido para amostras com elevado teor protéico e que exige digestão ácida antes da extração dos lipídios. A extração por Bligh Dyer não exige equipamento ou instrumento laboratorial especial e não envolve o aquecimento dos solventes, o que é interessante para compostos onde a oxidação deve ser evitada, além de despender entre 5 e 8 vezes menos tempo que a análise por Soxhlet.

Para determinação de componentes específicos da fração lipídica, existem na literatura diferentes abordagens quanto aos procedimentos de extração adotados. A primeira consiste na extração prévia dos lipídios, realizada por algum dos métodos descritos acima, seguida da análise do extrato, com preparo da amostra conforme a classe de compostos a ser estudada. A vantagem é que existe

um refinamento preliminar (separação dos lipídios) para posterior avaliação com menor interferência de outros grupos. A segunda alternativa não inclui a extração prévia dos lipídios. Faz-se a análise direta na matriz da amostra e a vantagem é de simplificação do método e conseqüente diminuição da probabilidade de erros experimentais, além de permitir a avaliação do composto de interesse na sua matriz original.

Para a análise dos diterpenos do café, são relatados tanto trabalhos com saponificação direta (DIAS, 2005; ALVES, 2004; ROOS et al., 1997; URGERT et al., 1995), quanto aqueles que fizeram extração dos lipídios para posterior saponificação (ARAÚJO; SANDI; 2006; RUBAYIZA; MEURENS, 2005; KÖLLING-SPEER; STROHSCHNEIDER; SPEER, 1999; LERCKER et al., 1995; FREGA; BOCCI; LERCKER, 1994; PETTITT JR., 1987), sendo descritos procedimentos a frio (Saponificação Direta a Frio, SDF) e a quente (Saponificação Direta a Quente, SDQ).

Entre os autores que preconizaram a extração preliminar dos lipídios, Araújo e Sandi (2006) relataram que o método por Soxhlet tem maior eficiência na extração de caveol e cafestol quando comparado à extração por fluido supercrítico (SC-CO₂), observando-se teores até 70 % superiores, pela quantificação por CLAE.

Para avaliação de compostos do óleo de café por Espectroscopia Raman, Rubayiza e Meurens (2005) também realizaram extração por Soxhlet, utilizando dietil éter por 6 h. Em revisão sobre lipídios no café, Speer e Kölling-Speer (2006) sugerem, no entanto, que preferencialmente se utilize terc-butil metil éter ao invés de dietil éter, pela menor periculosidade.

A saponificação direta tem sido descrita como uma alternativa rápida e eficiente para a avaliação de compostos insaponificáveis, evitando a formação de artefatos (SALDANHA et al., 2006). Ao estudar as condições de extração da matéria insaponificável para determinação de colesterol, Bandeira et al. (2008), trabalhando com ração para ruminantes, e Mariutti, Nogueira e Bragagnolo (2008), com carne de frango, observaram melhores resultados para saponificação direta da amostra sem aquecimento, pois a elevação da temperatura diminuía a concentração dos analitos.

Os autores relataram que o método a frio apresentou ainda um cromatograma com menor número de interferentes e maior área do pico de colesterol, além de ser de fácil execução e utilizar menor quantidade de solvente,

segundo os autores.

Urgert et al. (1995) e Roos et al. (1997) utilizaram solução etanólica de hidróxido de sódio por uma hora a 80 °C para saponificação direta dos lipídios de grãos verdes de café. Em seguida, fez-se a extração da matéria insaponificável com diisopropil éter e limpeza com água.

ALVES (2004) e DIAS (2005) desenvolveram metodologia semi-quantitativa para avaliação de caveol em amostras de café torrado por Espectrofotometria. Para extração, baseando-se no descrito por Urgert et al. (1995), foi proposta saponificação direta das amostras com KOH 2,5 mol.L⁻¹ (80 °C, 1 h), extração com terc-butil metil éter e limpeza com água.

Recentemente, Scharnhop e Winterhalter (2009) propuseram um procedimento diferenciado de extração, por Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC), que consiste numa partição líquido-líquido sem o uso de adsorvente. A técnica utiliza duas fases líquidas imiscíveis, onde uma é a fase móvel e a outra, a fase estacionária, e a distribuição do soluto em cada fase é determinada pelos coeficientes de partição. Os autores relataram o isolamento de caveol, cafestol, 16- O-metilcaveol, 16-O-metilcafestol, dehidrocafestol e dehidrocaveol de *C. arabica* e *C. canephora* torrados, que foram posteriormente identificados e verificadas suas purezas por CLAE.

Considerando-se a grande diversidade de procedimentos descritos na literatura, uma comparação dos métodos de extração e preparo de amostra para avaliação de diterpenos, envolvendo a separação da fração lipídica para posterior análise ou métodos por saponificação direta, avaliando ainda a temperatura de processo, torna-se necessária.

2.1.5.2 Separação, identificação e quantificação dos diterpenos

As técnicas de Cromatografia Gasosa (CG) (GUERRERO; SUÁREZ; MORENO, 2005; CASTILLO; HERRAIZ; BLANCH, 1999; ROOS et al., 1997; URGERT et al., 1995; LERCKER et al., 1995; PETTITT JR., 1987) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (SCHARNHOP; WINTERHALTER, 2009; ARAÚJO; SANDI, 2006; KURZOCK; SPEER, 2001b; CASTILLO; HERRAIZ;

BLANCH, 1999; GROSS; JACCAUD; HUGGETT, 1997; PETTITT JR., 1987) têm sido as mais freqüentemente citadas na quantificação de cafeol e cafestol em grãos verdes, torrados e bebidas de café.

A CLAE e CG são técnicas de separação de compostos e baseiam-se nas diferentes interações de substâncias com uma fase estacionária sólida (coluna). A amostra é conduzida pela coluna por um eluente próprio (fase móvel), que na CLAE está em estado líquido e na CG, gasoso. Após eluição e separação das espécies de interesse, ocorre a detecção, registro dos picos, identificação e quantificação. As condições cromatográficas, como tipo de fase móvel e recheio (composição) da coluna, temperatura de análise, vazão do solvente, e ainda especificidades do equipamento, como características do sistema de injeção e tipo do detector, é que determinam a qualidade do processo cromatográfico (LANÇAS, 2003; IBAÑEZ; CIFUENTES, 2001). A CLAE destaca-se pela versatilidade (permite a detecção e quantificação simultânea de diferentes compostos) e pelo emprego na análise de compostos com algum grau de instabilidade à temperatura.

Quando é necessária a verificação da identidade de componentes da amostra em estudo, é usual se utilizar a Espectrometria de Massas (EM), técnica microanalítica utilizada para obter o peso molecular e informações sobre as características estruturais de compostos. É possível estudar a composição elementar de uma amostra, a estrutura molecular dos componentes, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, além de proporções isotópicas de átomos em amostras (MORRISON; BOYD, 2008). A EM baseia-se na separação de íons moleculares em estado gasoso de acordo com a relação massa/carga (m/z). A molécula pode ser ionizada e fragmentada em grupos menores por quebra de ligações susceptíveis ao tipo de mecanismo de fragmentação. Dentre as fontes de ionização, uma das mais empregadas é a APCI (ou IQPA - Ionização Química à Pressão Atmosférica) em modo positivo (os íons analisados são cátions) ou modo negativo (os íons analisados são ânions) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; ROBINSON; FRAME; FRAME II, 2005; IBAÑEZ; CIFUENTES, 2001).

Em geral é realizada a separação dos componentes que se deseja estudar antes da análise por EM, principalmente na análise de alimentos, onde a matriz muitas vezes é uma mistura de diversos componentes. Para isto, utiliza-se o acoplamento da EM à técnicas cromatográficas, sendo as mais utilizadas a CG-EM e a CLAE-EM. A combinação da EM com outras técnicas de separação, como a

Eletroforese Capilar, a Cromatografia em Camada Delgada e a Cromatografia de Permeação em Gel, é possível, mas usada com menor frequência (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Na CLAE-EM com ionização por APCI, o eluente da coluna cromatográfica passa por um nebulizador pneumático no qual gotas são geradas e dessolvatadas.

O *spray* formado passa por uma região aquecida na qual o vapor é seco, formando espécies neutras que são conduzidas para uma corona de descarga. Um campo suficiente para gerar ionização é aplicado na corona. Como o solvente, proveniente da fase móvel, encontra-se em maior concentração no *spray* que o analito, é ionizado preferencialmente e passam a ocorrer reações entre estes íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analito, o que dá origem aos íons do analito (fragmentos). Os fragmentos são então separados por aplicação de um campo magnético (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Para a elucidação de estruturas e confirmação dos compostos diterpênicos do café, alguns trabalhos relataram o uso de espectrômetro de massas (SCHARNHOP; WINTERHALTER, 2009; SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006; KURZROCK; SPEER, 2001a, ROOS et al., 1997; LERCKER et al., 1995; PETTITT JR., 1987).

Pettitt Jr. (1987) identificou 6 ésteres de ácidos graxos diterpênicos e foi o primeiro pesquisador a sugerir a existência e estrutura do 16-O-metilcafestol, em estudo empregando diferentes metodologias. Na análise por CLAE, utilizou-se coluna C8 de fase ligada, com coluna preparativa; gradiente linear de 80 % acetonitrila – ACN/H₂O até 100 % ACN; detector espectrofotômetro a 280 nm. Para CG, empregou-se coluna capilar de fase ligada (15 m); temperatura constante a 250°C para análise dos derivados silil dos diterpenos e programada de 140 a 250 °C a 4°C/min para os compostos metil ésteres e detecção com espectrômetro de massas.

O autor utilizou, ainda, Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H NMR), como auxílio para elucidação da estrutura química dos compostos. Os extratos das amostras de café arábica, conilon e excelsa de diferentes países foram preparados com acetonitrila e éter de petróleo. Para separação da matéria insaponificável, foi utilizada solução KOH 10 % em metanol, que promoveu a saponificação da amostra.

A quantidade dos ésteres foi de 50 vezes menor para café conilon, comparado com o arábica. Dos 6 ésteres diterpênicos, apenas um era derivado do cafestol.

A elucidação de estruturas de compostos do extrato insaponificável dos lipídios de frutos de café arábica e conilon, crus e torrado/moído foi estabelecida por Lercker et al. (1995), com o auxílio de equipamento CG, detector de ionização de chama (330 °C) acoplado a um espectrômetro de massas. Após extração com n-hexano por Soxhlet, a fração lipídica foi submetida à saponificação e separou-se a fração insaponificável. Fez-se a derivatização dos analitos com diazometano (CH_2N_2) para transformar grupos ácidos em metil-ésteres e também a silanização das substâncias, transformando-as em derivados trimetilsilil (TMS). A CG foi realizada com coluna capilar de sílica fundida (25 m) e fase estacionária fenil/metilpolisiloxano (50/50); temperatura programada de 200 a 300 °C a uma taxa de 3 °C/min. Os resultados comprovaram as estruturas de cafestol e caveol descritas anteriormente (Figura 2.1).

O trabalho de Urgert et al. (1995) comparou bebidas coletadas em estabelecimentos comerciais europeus e bebidas obtidas em laboratório, preparadas por diversos métodos, para estudo da variação do nível de colesterol humano. A extração da fração lipídica foi realizada com éter diisopropil e ressuspensão em etanol. A etapa de saponificação com KOH permitiu a separação da fração insaponificável, que contém os diterpenos. Para identificação e quantificação destes compostos, os pesquisadores utilizaram CG com detecção por ionização de chama (a 305 °C), acoplado a um espectrômetro de massas. Empregou-se coluna de sílica fundida (25 m) e temperatura programada (máx de 285 °C). A razão entre teores de cafestol e caveol foi a mesma para o produto torrado e moído (obtido no laboratório) e as bebidas, indicando mesma extensão da extração. Os autores reportaram dados de validação num dos raros trabalhos encontrados com este tipo de informação: coeficientes de variação abaixo de 6,3 % para repetibilidade, bons índices de recuperação, entre 99 e 103 % e linearidade entre 0,01 – 40 mg de diterpeno/100 mL da bebida, considerando todos os compostos analisados.

Destacando o potencial hipercolesterolêmico do cafestol e uma possível ação anticarcinogênica dos diterpenos em animais, Roos et al. (1997) estudaram o perfil de 4 espécies e 9 variedades de frutos frescos de café do continente africano quanto ao teor de diterpenos, e ainda sugeriram mais um

parâmetro taxonômico para as plantas de café. Cromatografia Gasosa e detecção com ionizador de chama (305 °C) e espectrômetro de massas foram aplicados, utilizando as condições estabelecidas no trabalho de Urgert et al. (1995).

Apesar de bastante utilizada, existem divergências sobre o emprego de CG para análise de diterpenos. Speer e Kölling-Speer (2006), em revisão sobre a fração lipídica, questionaram resultados da literatura de detecção de dehidroderivados de diterpenos em grãos verdes, considerando-os artefatos formados na análise por CG- EM, ressaltando o risco de degradação térmica.

Um número menor de trabalhos relata o emprego de CLAE. A técnica foi aplicada na quantificação de diterpenos em amostras de grãos verdes e torrados de café arábica no trabalho de Araújo e Sandi (2006) para comparação de métodos de extração do óleo de café. As condições cromatográficas empregadas foram: coluna de fase reversa a temperatura ambiente; fase móvel etanol/água (85/15 v/v); detecção no UV (220 nm).

Frega, Bocci e Lercker (1994) também realizaram a quantificação de diversos componentes diterpênicos por CLAE, trabalhando com amostras de diferentes origens geográficas.

Para a identificação de ésteres de cafestol e caveol em café arábica, Kurzrock e Speer (2001b) utilizaram CLAE com coluna C18 de fase reversa; gradiente linear de ACN/isopropanol (70/30 v/v); detecção no UV (200-350 nm) e com espectrômetro de massas. Foi feita a síntese de éster palmitato de caveol e de cafestol, a partir de padrões dos dois compostos não esterificados, usados como auxiliares na identificação. A partir de amostras de café, isolaram-se os ésteres de diterpenos, inclusive de 16-O-metilcafestol. Para isto, empregou-se diclorometano, como extrator e solvente do componente lipídico, e extração em fase sólida (SPE) em coluna de sílica-gel com eluentes acetato de etila e n-hexano. Ao todo, 12 diferentes ésteres de caveol puderam ser identificados e 6 deles (C_{16} , C_{18} , $C_{18:1}$, $C_{18:2}$, C_{20} e C_{22}) foram predominantes. Outros 12 ésteres de 16-O-metilcafestol e 14 de cafestol foram identificados. Em outro estudo, foi desenvolvido um método para determinação dos diterpenos livres (não esterificados) em cafés torrados e grãos verdes. Utilizando CLAE de fase reversa, foi possível analisar as pequenas quantidades de caveol, cafestol e 16-O-metilcafestol na forma livre (KOLLING-SPEER; STROHSCHNEIDER; SPEER, 1999).

Com relação à validação das metodologias, para ésteres de cafestol,

foi descrita recuperação variando de 94 a 103 % (KURZROCK; SPEER, 2001a). Kolling-Speer, Strohschneider e Speer (1999), para diterpenos livres, citaram recuperação de cafestol de 80,5 %, para adição de padrão em torno de 50 % do valor inicial da amostra, mas não relataram dados para caveol.

Scharnhop e Winterhalter (2009) desenvolveram um procedimento de extração por Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade e análise posterior por CLAE com o objetivo de isolar, identificar e quantificar os compostos caveol, cafestol, dehidroditerpenos, 16-O-metilcaveol e 16-O-metilcafestol de *C. arabica* e *C. canephora* torrados. Utilizaram para isto CLAE-DAD-EM/EM e Ressonância Magnética Nuclear. Como condições cromatográficas, coluna C12 de fase reversa, fase móvel composta por acetonitrila e água com vazão de 0,8 mL/min, detecção a 220 e 280 nm, foram aplicadas com sucesso, apesar de não terem sido relatados dados de validação.

Avaliando-se os trabalhos disponíveis na literatura, não foi encontrada metodologia desenvolvida e validada para CLAE-EM para avaliação dos teores totais de caveol e cafestol aplicável às diferentes variedades e tecidos do café, bem como o monitoramento destes compostos e a verificação de possíveis degradados durante processo de torra em condições controladas.

2.2 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver e validar metodologia para avaliação de caveol e cafestol em tecidos do café verde e cafés torrados das espécies *C. arabica* e *C. canephora*, avaliando a aplicabilidade do método a essas matrizes e a estabilidade dos diterpenos ao processo de torra.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar metodologia por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para avaliação de caveol e cafestol em tecidos de frutos

frescos e amostras torradas de diferentes espécies;

- Validar metodologia de análise de caveol em grãos torrados por Espectrofotometria;
- Comparar métodos de extração e preparo de amostra para avaliação dos diterpenos;
- Avaliar a aplicabilidade da metodologia por CLAE em tecidos do cafeeiro e frutos frescos, estudando a variação dos teores de caveol e cafestol nas espécies *C. arabica* e *C. canephora*;
- Avaliar a aplicabilidade da metodologia por CLAE a cafés torrados, verificando o potencial de discriminação de espécies de café *C. arabica* e *C. canephora* pelos teores de caveol e cafestol;
- Identificar e confirmar as estruturas de caveol, cafestol e possíveis derivados formados durante o processo de torra utilizando CLAE com detectores UV-Vis e espectrômetro de massas;
- Avaliar a estabilidade de caveol e cafestol ao processo de torra nas matrizes dos grãos das espécies *C. arabica* e *C. canephora*.

2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A. T. E. **Atributos químicos de espécies de café**. 2005. Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ALVES, S. T. **Desenvolvimento de metodologia analítica para diferenciação de café torrado arábica (*Coffea arabica*) e conilon (*Coffea canephora*) e misturas**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ALVES, S. T.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. Desenvolvimento de metodologia espectrofotométrica para diferenciação de café torrado, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 8., 2003, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 2003. p. 343-348.

AOAC. Methods of the association of official analytical chemists. Method No. 920.85. 15 ed. v. 2. Virginia: Arlington, 1990. p.780.

ARAÚJO, J. M. A; SANDI, D. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, Oxford, v.101, n. 3, p. 1087-1094, 2006.

ARAÚJO, Júlio Maria de Andrade. **Química de Alimentos - Teoria e Prática**. 2 ed. Viçosa: Imprensa Universitária 2001.

ARRUDA, N. P.; REZENDE, C. C.; COURI, S.; PEREIRA, S. F.; SILVA, C. G. Perfil de voláteis, compostos fenólicos, atividade antioxidante e fator de proteção solar em óleo de café extraído por etanol. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 32. 2009, Fortaleza, **Proceedings...** São Paulo.

ASSAD, E. D.; SANO, E. E.; DA CUNHA, S. A. R.; CORREA, T. B. S.; RODRIGUES, H. R. Identificação de impurezas e misturas em pó de café por meio de comportamento espectral e análise de imagens digitais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 211-216, 2002.

BANDEIRA, C. M.; FERREIRA, J. M.; BRAGAGNOLO, N.; MARIUTTI, L. R. B. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de colesterol em ração para ruminantes através de planejamento experimental fatorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p.1422-1426, 2008.

BASSOLI, D. G. **Impacto aromático dos componentes voláteis do café solúvel** : uma abordagem analítica e sensorial. 2006. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

BERTHOLET, R (1988) Preparation of a mixture of cafestol and cafeol. US Patent 4,748,258.

BICCHI, C. P.; BINELLO, A. E.; PELLEGRINO, G. M.; VIANNI, A. C. Characterization of green and roasted coffees through the chlorogenic acid fraction by HPLC-UV and principal component analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 6, p. 1549-1555, 1995.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p 911-917, 1959.

BOEKSCHOTEM, M. V.; ENGBERINK, M. F.; KATAN, M. B.; SCHOUTEN, E. G. Reproducibility of the serum lipid response to coffee oil in healthy volunteers. **Nutrition Journal**, London, v. 2, n.8, p.1-8, 2003.

BOHLMANN, J.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, Washington, v. 95, n. 8, p. 4126-4133, 1998.

BRAGANÇA, S. M.; CARVALHO, C. H. S.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G. Variedades clonais de café conilon para o estado do Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 765-770, 2001.

BRUM, A. A. S. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba.

CAMPA, C.; BALLESTER, J. F.; DOULBEAU, S.; DUSSERT, S.; HAMON, S.; NAIROT, M. Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. **Food Chemistry**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 39-43, 2004.

CAMPANHA, F. G. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) pela composição de diterpenos**. 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CARVALHO, L. M.; SILVA, E. A. M.; AZEVEDO, A. A.; MOSQUIM, P. R.; CECON, P. R. Aspectos morfofisiológicos dos cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-416, 2001.

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.

CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; ALVES, M. R.; FERREIRA, M. A. Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3420-3424, 2000.

CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B.; FERREIRA, M. A. HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. **Food Chemistry**, Oxford, v. 68, n. 4, p. 481-485, 2000.

CASTILLO, M. L. R.; HERRAIZ, M.; BLANCH, G. P. Rapid analysis of cholesterol-elevating compounds in coffee brews by off-line high performance liquid chromatography / high resolution gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 4, p. 1525-1529, 1999.

CAVIN, C.; HOLZÄUSER, D.; CONSTABLE, A.; HUGGETT, A. C.; SCHILTER, B. The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against aflatoxin B1-induced genotoxicity through a dual mechanism. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 1369-1375, 1998.

CAVIN, C.; HOLZHÄUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W. W.; SCHILTER, B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 8, p.1155-1163, 2002.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. F. S. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

DAGLIA, M.; CUZZONI, M. T.; DECANO, C. Antibacterial activity of coffee: relationship between biological activity and chemical markers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 10, p. 2273-2277, 1994.

DE CASTRO, R. D., ESTANISLAU, W. T., CARVALHO, M. L. M, HILHORST, H. W. M. Functional development and maturation of coffee (*Coffea arabica*) fruits and seeds. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE. 2005, 20, Bangalore, **Proceedings...**, Bangalore, p. 619–635.

DE CASTRO, R. D.; ESTANISLAU, W. T.; MESQUITA, P. R.; PUPIM, T. L.; TIMÓTEO, T. S. Modelo Funcional de Desenvolvimento de Sementes de Cafeeiro (*Coffea arabica*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 28, 2002, Caxambu, **Resumos...**, Caxambu.

DE CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 175-199, 2006.

DIAS, R. C. E. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) em diferentes graus de torra**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

DIAS, R. C. E.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. Diferenciação de café arábica (*Coffea arabica*) e conilon (*Coffea canephora*) com diferentes graus de torra. In: IV SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2005, Londrina, **Anais...** Londrina, 2005a.

DIAS, R. C. E.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. Otimização de método espectrofotométrico para discriminação de café arábica e conilon em diferentes graus de torra. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 6, 2005, Campinas, **Anais...** Campinas, 2005b.

DURAND, N. 2006. Variabilité biochimique et nucléotidique du métabolisme des diterpènes dans des géotypes de *Coffea canephora* d'Ouganda. Master BGAE, spécialité Biodiversité Biodétection et Biotraçabilité Année 1. Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc.

DUSSELDORP, V.; KATAN, M. B.; VLIET, T. V.; DEMACKER, P. N. M.; STALENHOEF, A. Cholesterol-raising factor from boiled coffee does not pass a paper filter. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, Dallas, v. 11, n. 3, p.586-593, 1991.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 23-26, 2006.

FARAH, A.; TOCI, A. T. Volatile compounds as potential defective coffee beans markers. **Food Chemistry**, Oxford, v. 118, n. 3, p. 1133-1141, 2008.

FERNANDES, S. M.; PEREIRA, R. G. F. A.; THÉ, P. M. P.; PINTO, N. A. V. D.; CARVALHO, V. D. Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 3, p.197-199, 2001.

FOLCH, J; LEES, M., STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; MENDONÇA, J. C. F.; SILVA, X. A. Physical and chemical attributes of defective crude and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, Oxford, v. 90, n.1/2, p. 89-94, 2005.

FRANK, O.; ZEHENTBAUER, G.; HOFMANN, T. Bioresponse-guided decomposition of roast coffee beverage and identification of key bitter taste compounds. **European Food Research Technology**, Heidelberg, v. 222, n. 5/6, p. 492–508, 2006.

FREGA, N.; BOCCI, F.; LERCKER, G. High resolution gas chromatographic method for determination of robusta coffee in commercial blends. **Journal of High Resolution Chromatography**, Weinheim, v. 17, n. 5, p. 303-307, 1994.

GONZALEZ-RIOS, O.; SUAREZ-QUIROZ, M. L.; BOULANGER, R.; BAREL, M.; GUYOT, B.; GUIRAUD, J. P.; SCHORR-GALINDO, S. Impact of "ecological" post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans: I. Green coffee. **Journal of Food Composition and Analysis**, Roma, v.20, n. 3/4, p. 289–296, 2007.

GROLLIER, J. F; PLESSIS, S. (1998) Use of coffee bean oil as a sun filter. US Patent 4,793,990.

GROSS, G.; JACCAUD, E.; HUGGETT, A. C. Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 6, 1997.

GUERRERO, G.; SUÁREZ, M.; MORENO, G. Chemosystematic study of diterpenoids in green coffee beans. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE (ASIC), 20. 2005, Paris, **Proceedings...** Paris. p. 292-296.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 46, n. 2, p. 101-123, 2006.

HIGGINS, L. G.; CAVIN, C.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; HAYES, J. D. Induction of cancer chemopreventive enzymes by coffee is mediated by transcription factor Nrf2. Evidence that the coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol confer protection against acrolein. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 226, n. 3, p. 328-337, 2008.

HUBER, W. W.; SCHARF, G.; ROSSMANITH, W.; PRUSTOMERSKY, S.; GRASL-KRAUPP, B.; PETER, B.; TURESKY, R. J.; SCHULTE-HERMANN, R. The coffee components kahweol and cafestol induce γ -glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of chemoprotective glutathione synthesis, in several organs of the rat. **Archives of Toxicology**, Berlin / Heidelberg, v.75, n. 11-12, p.685-694, 2002.

IBAÑEZ, E; CIFUENTES, A. New Analytical Techniques in Food Science. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Abridgeon, v. 41, n. 6, p. 413-450, 2001.

KEMSLEY, E. K.; RUAULT, S.; WILSON R.H. Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant *robusta* beans using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 321-326, 1995.

KIM, H. G.; HWANG, Y. P.; JEONG, H. G. Kahweol blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 187, n. 1, p. 28–34, 2009.

KIM, H. G.; KIM, J. Y.; HWANG, Y. P.; LEE, K. J.; LEE, K. Y.; KIM, D. H.; KIM, D. H.; JEONG, H. G. The coffee diterpenes kahweol inhibits tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in human endothelial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 217, n. 3, p. 332-341, 2006.

KÖLLING-SPEER, I.; KURT, A.; NGUYEN, T.; SPEER, K. Cafestol and dehydrocastestol in roasted coffee. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE (ASIC), 17. 1997. Paris, **Proceedings...** Paris. p. 201.

KÖLLING-SPEER, I.; KURZROCK, T.; SPEER, K. Content of diterpenes in green coffees assigned for the European market. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE (ASIC), 19, 2001. Trieste, **Proceedings...** Paris.

KÖLLING-SPEER, I.; SPEER, K. Diterpenes in coffee leaves. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE (ASIC), 17. 1997, Paris, **Proceedings...** Paris. p. 150.

KÖLLING-SPEER, I.; STROHSCHNEIDER, S.; SPEER, K. Determination of free diterpenes in green and roasted coffees. **Journal of High Resolution Chromatography**, Weinheim v. 22, n. 1, p. 43-46, 1999.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Diterpenes and diterpene esters in coffee. **Food Reviews International**, New York, v.17, n.4, p.433-450, 2001a.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Identification of kahweol fatty acid esters in arabica coffee by means of LC/MS. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v.24, n. 10/11, p.843-848, 2001b.

KY, C. L.; LOUARN, J.; DUSSERT, S.; GUYOT, B.; HAMON, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acid and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry**, Oxford, v. 75, n. 2, p. 223-230, 2001.

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

LANÇAS, F. M. The Role of the Separation Sciences in the 21th Century. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 183-197, 2003.

LEE, K. J.; CHOI, J. H.; JEONG, H. G. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 11, p. 2118-2125, 2007.

LEE, K. J.; JEONG, H. G. Protective effects of kahweol and cafestol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 173, n. 2, p. 80-87, 2007.

LERCKER, G.; FREGA, N.; BOCCI, F.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. High resolution gas chromatographic determination of diterpenic alcohols and sterols in coffee lipids. **Chromatographia**, Wiesbaden, v.41, n.1/2, p.29-33, 1995.

LOPES, L. M. V. **Avaliação da qualidade de grãos de diferentes cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MARIUTTI, L. R. B.; NOGUEIRA, G. C.; BRAGAGNOLO, N. Optimization and Validation of Analytical Conditions for Cholesterol and Cholesterol Oxides Extraction in Chicken Meat Using Response Surface Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 9, p. 2913–2918, 2008.

MARTÍN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. **Talanta**, Amsterdam, v. 46, n. 6, p. 1259-1264, 1998.

MAZZAFERA, P. Chemical composition of defective coffee beans. **Food Chemistry**, Oxford, v. 64, n. 4, p. 547-554, 1999.

MENDES, L. C. **Otimização do processo de torração do café robusta (*Coffea canephora* conillon) para formulação de blends com café arábica (*Coffea arabica*)**. 1999. 101 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MORRISON, Robert T., BOYD, Robert N. **Organic Chemistry**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2008.

NKONDJOCK, A. Coffee consumption and the risk of cancer: An overview. **Cancer Letters**, Oxford, v. 277, n. 2, p. 121–125, 2009.

NOLLET, Leo M. L. **Handbook of Food Analysis**. New York: Marcel Dekker, 1996. v.1.

OOSTERVELD, A.; VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H. A. Effect of roasting on the carbohydrate composition of *Coffea arabica* beans. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 183-192, 2003.

PERRONE, D.; FARAH, A.; DONANGELO, C. M.; DE PAULIS, T.; MARTIN, P. R. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. **Food Chemistry**, Oxford, v. 106, n. 2, p. 859-867, 2008.

PETTITT JR., B. C. Identification of the diterpene esters in arabica and canephora coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.35, n. 4, p. 549-551. 1987.

POSTE, S. M.; ROOS, B.; VERMEULEN, M.; AFMAN, L.; JONG, M. C.; DAHLMANS, V. E. Cafestol increases serum cholesterol levels in apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice by suppression of bile acid synthesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, Dallas, v. 20, n. 6, p.155-156, 2000.

RAMALAKSHMI, K.; KUBRA, I. R.; RAO, L. J. M. Physicochemical characteristics of green coffee: comparison of graded and defective beans. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 5, p. S333-S337, 2007.

REDGWELL, R. J.; VÉRONIQUE, T.; CURTI, D.; FISHER, M. Effect of roasting on degradation and structural features of polyssaccharides in Arabica coffee beans. **Carbohydrate Research**, London, v. 337, n. 5, p.421-431, 2002.

ROBINSON, James W.; FRAME, Eileen M. Skelly; FRAME II, George M. **Undergraduate Instrumental Analysis**. 6. ed. New York: Marcel Dekker, 2005.

ROOS, B.; VAN DER WEG, G.; URGERT, R.; VAN DE BOVENKAMP, P.; CHARRIER, A.; KATAN, M. B. Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, n. 8, p. 3065-3069, 1997.

RUBAYIZA, A. B.; MEURENS, M. Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by Fourier Transform Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 53, n.12, p. 4654-4659, 2005.

SALDANHA, T.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N; BRAGAGNOLO, N. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 12, 4107-4113, 2006.

SCHARNHOP, H; WINTERHALTER, P. Isolation of coffee diterpenes by means of high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Food Composition and Analysis**, Roma, v. 22, n. 3, p. 233-237, 2009.

SCHOLZ, M. B. S. **Tipologia dos cafés paranaense: uma abordagem através da análise fatorial múltipla dos aspectos físico-químicos e sensoriais**. 2008. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SEHAT, N.; MONTAG, A.; SPEER, K. In: 20th International Symposium on Capillary Chromatography. The forum for microcolumn separations, 28. 1999. Riva del Garda, **Proceedings...**, Riva del Garda.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; TIMOTHY, A. N. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SONDAHL, M. R.; BAUMANN, T. W. Agronomy II: Developmental and Cell Biology. In: CLARKE R. J.; VITZTHUM O. G. (Eds). **Coffee**: recent developments. Blackwell Science, Oxford, p. 202-220, 2001.

SOUZA, V. F.; MODESTA, R. C. D.; GONÇALVES, E. B.; FERREIRA, J. C. S.; MATOS, P. B. Influência dos fatores demográfico e geográfico na preferência da bebida de café no estado do Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2004.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchtfettes. **Polytechnisches Journal**, Erlangen, v. 232, n. 5, p. 461-465, 1879.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 201-216, 2006.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER. Lipids. In: CLARKE R. J.; VITZTHUM O. G. (Eds) **Coffee: recent developments**. Blackwell Science, Oxford, p. 33-49, 2001.

SPEER, K.; TEWIS, R.; MONTAG, A. 16-o-methylcafestol a quality indicator for coffee. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE (ASIC), 14., 1991, San Francisco. **Proceedings...** San Francisco, 1991. p. 237-244.

TAO, K.; WANG, W.; WANG, L.; CAO, D.; LI, Y.; WU, S.; DOU, K. The multifaceted mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on liver. **Medical Hypotheses**, Kidlington, v. 71, n. 5, p 730-736, 2008.

TERPSTRA, A.H.M; KATAN, M.B.; WEUSTEN-VAN DER WOUW, M.P.M.E.; DE ROOS, B.; BEYNEN, A.C. The hypercholesterolemic effect of cafestol in coffee oil in gerbils and rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, St. Louis , v. 11, n. 6, p. 311–317, 2000.

THELLE, D.S; HEYDEN, S.; FODOR, J. G. Coffee and cholesterol in epidemiological and experimental studies. **Atherosclerosis**, Amsterdam, v. 67, n. 2/3, p. 97-103, 1987.

TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. B. , L. C. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics**, Pittsburgh, v. 158, n. 2, p. 811-832, 2001.

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.

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.

URGERT, R.; KATAN, M. B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v.17, n.1, p.305-324, 1997.

URGERT, R.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUIL, T. G.; VAN DE BOVENKAMP, P.; HOVENIER, R.; KATAN, M. B. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 8, p. 2167-2172, 1995.

VASCONCELOS, A. L. S.; FRANÇA, A. S.; GLÓRIA, M. B. A.; MENDONÇA, J. C. F. A comparative study of chemical attributes and levels of amines in defective green and roasted coffee beans. **Food Chemistry**, Oxford, v. 101, n. 1, p. 26-32, 2007.

VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 95-108, 2006.

WEUSTEN-VAN DER WOUW, M. P. M. E.; KATAN, M. B.; VIANI, R.; HUGGETT, A. C.; LIARDON, R.; LUND-LARSEN, P. G.; THELLE, D. S.; AHOLA, I.; ARO, A; MEYBOOM, S.; BEYNEN, A. C. Identity of the cholesterol-raising factor from boiled coffee and its effects on liver function enzymes. **Journal of Lipid Research**, Stanford, v. 35, n.4, p.721-733, 1994.

WORMER, T. M, 1966. In: DE CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. **Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development**. Brazilian Journal of Plant Physiology, Pelotas, v. 18, n. 1, p 175-199, 2006.

WURZIGER, J. Coffee oil and roast coffee quality. **Fette Seifen Anstrichmittel**, Hamburgo, v. 87, n. 2, p. 334-339, 1977.

WURZIGER, J. Evaluation of raw coffee type and processing method, on the basis of the diterpenes in coffee oils. **Fette Seifen Anstrichmittel**, Hamburgo, v. 79, n. 8, p. 82-87, 1985.

ZENEBON, Odair; PASCUET, Neus S.; TIGLEA, Paulo. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

CAPÍTULO 3

**METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE CAVEOL E
CAFESTOL EM FOLHAS E TECIDOS DE FRUTOS DE
CAFEIRO E EM GRÃOS DE CAFÉ TORRADOS**

3 METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE CAVEOL E CAFESTOL EM FOLHAS E TECIDOS DE FRUTOS DE CAFEIEIRO E EM GRÃOS DE CAFÉ TORRADOS

3.1 RESUMO

Caveol e cafestol são diterpenos do óleo do café e importantes para a saúde dos consumidores, mas podem discriminar espécies de café por estarem em diferentes concentrações. A determinação desses compostos torna-se interessante também para avaliação do metabolismo no cafeeiro, visto a falta de informações das funções deste composto para planta e vias de produção. Um método por CLAE que utiliza fase reversa foi desenvolvido para quantificação simultânea de caveol e cafestol em tecidos de frutos frescos, folhas e amostras de café torrado e moído. A melhor resolução foi obtida com eluição isocrática de acetonitrila/água 55/45 (v/v) e detecção no UV. Um método simples de preparo de amostra por saponificação direta e extração com solvente orgânico foi padronizado para todas as matrizes. Obtiveram-se boa recuperação (média de 99 % para caveol e 94 % para cafestol), repetibilidade e linearidade. Limites de Detecção de 2,3 e 3,0 mg/100 g foram observados para caveol e cafestol, respectivamente. O método mostrou-se eficiente para a quantificação dos diterpenos estudados nas diferentes matrizes. Endosperma e perisperma de *Coffea arabica* (cv. Iapar-59) mostraram elevada quantidade de caveol comparado ao pericarpo e folhas. Cafestol foi detectado em todas as amostras, exceto em folhas de *C. canephora* (cv. Apatã). Em mistura torrada de *C. arabica* e *C. canephora* (70/30 p/p), o teor de caveol foi superior que ao cafestol.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *Coffea canephora*. Diterpenos. CLAE. Validação.

3.2 INTRODUÇÃO

O café é um dos principais produtos agrícolas de exportação de países em desenvolvimento. As espécies mais cultivadas são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, que devem corresponder a 74,6 % e 25,4 %, respectivamente, da produção brasileira, segundo estimativa para safra 2009. O Brasil é o maior produtor e exportador, além de segundo maior consumidor de café do mundo (CONAB, 2009).

Muitos estudos têm relacionado o consumo da bebida café com a saúde, vários com ênfase na composição lipídica (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006; BOEKSCHOTEM et al., 2003; POSTE et al., 2000; CAVIN et al., 1998). Além dos triacilgliceróis, esteróis e tocoferóis, componentes da maioria dos óleos vegetais, o óleo de café contém em sua matéria insaponificável álcoois diterpênicos pentacíclicos da família dos caurenos. Diterpenos produzidos apenas por plantas do gênero *Coffea*, cafestol e caveol são de interesse por seus efeitos fisiológicos e pela capacidade de discriminação entre espécies (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006; URGERT; KATAN, 1997). O cafestol é encontrado tanto em *C. arabica* como em *C. canephora*. O caveol, porém, é citado como específico de *C. arabica* (SPEER; KÖLLING-SPEER, apud CLARKE; VITZTHUM, 2001; ROOS et al., 1997).

Existe grande interesse no estudo das vias metabólicas de produção de caveol e cafestol na planta do café. Torna-se necessário uma metodologia rápida e prática para avaliar os compostos em diferentes tecidos da planta e frutos em desenvolvimento, o que auxiliaria a identificação de genes e a elucidação das vias biossintéticas envolvidas, interessante aos estudos do genoma do cafeeiro (VIEIRA et al., 2006). Não há ainda relatos conclusivos da função fisiológica dos diterpenos na planta. Além disto, o teor dos diterpenos poderia ser utilizado tanto na classificação taxonômica das espécies de *Coffea*, quanto como uma ferramenta de discriminação das espécies presentes no produto torrado e moído, como mostrado em trabalho anterior (DIAS, 2005).

O efeito fisiológico de caveol e cafestol nos consumidores da bebida tem sido relatado importante à saúde humana. Foi atribuída a diterpenos a ação de degradação de substâncias tóxicas, ação protetora contra toxinas, propriedades anticarcinogênicas, antioxidantes e antiinflamatórias, além do efeito hepatoprotetor (LEE; JEONG, 2007; LEE; CHOI; JEONG, 2007; KIM et al., 2006; CAVIN et al., 1998 e 2002;). A ação hipercolesterolemica do cafestol também foi verificada (BOEKSCHOTEM et al., 2003; POSTE et al., 2000; URGERT et al., 1995; WEUSTEN-VAN DER WOUW et al., 1994). Comprovou-se ainda o efeito cosmético de diterpenos e um filtro solar composto por óleo de café foi patenteado (GROLLIER; PLESSIS, 1998; BERTHOLET, 1988).

Diferentes metodologias têm sido exploradas para identificação e quantificação de caveol e cafestol. Já foram relatados o uso de Espectroscopia Raman (RUBAYIZA; MEURENS, 2005) e Cromatografia Gasosa (CG) (GUERRERO;

SUÁREZ; MORENO, 2005; CASTILLO; HERRAIZ; BLANCH, 1999; ROOS et al., 1997; URGERT et al., 1995; LERCKER et al., 1995; PETTITT JR., 1987) para análise em bebida e frutos frescos, além de técnica espectrofotométrica para caveol em café torrado (DIAS, 2005; ALVES, 2004;). Contudo, destaca-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (ARAÚJO; SANDI, 2006; KURZROCK; SPEER, 2001b; CASTILLO; HERRAIZ; BLANCH, 1999; GROSS; JACCAUD; HUGGETT, 1997; PETTITT JR., 1987).

A técnica por CLAE permite trabalhar sem derivatização da amostra, evitando a degradação térmica de componentes lipídicos (SALDANHA et al., 2006; YAN; WHITE, 1990). Para avaliação de diterpenos, é geralmente empregada fase reversa e, como fase móvel, misturas de água e solventes orgânicos (acetonitrila, isopropanol e metanol) (ARAÚJO; SANDI, 2006; KURZROCK; SPEER, 2001a, 2001b; GROSS; JACCAUD; HUGGETT, 1997; PETTITT JR., 1987). No entanto, existe ainda muita divergência quanto à forma de extração. A utilização de Soxhlet e solvente orgânico (n-hexano, dietil éter ou éter de petróleo) é a metodologia clássica de extração lipídica e foi aplicada para extração de diterpenos com posterior saponificação (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006; RUBAYIZA; MEURENS, 2005; LERCKER et al., 1995; PETTITT JR., 1987). Alguns trabalhos utilizaram saponificação direta com KOH em álcool (metanol ou etanol) e extração da matéria insaponificável utilizando um solvente orgânico (n-hexano, éter diisopropil e terc-butil metil éter) (DIAS, 2005; ALVES, 2004; URGERT et al., 1995). A saponificação direta tem sido descrita como uma alternativa rápida e eficiente na extração de outros compostos insaponificáveis, evitando a formação de artefatos (SALDANHA et al., 2006).

Os métodos para análise de caveol e cafestol têm sido desenvolvidos e aplicados para produtos específicos e são poucos os trabalhos que fazem validação da metodologia, além disto, sem detalhar os resultados desta etapa. Não se tem relato de técnica que permita a avaliação simultânea desses diterpenos em diferentes matrizes, como produto torrado, folhas e tecidos de frutos.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE que permitisse determinar simultaneamente caveol e cafestol em café torrado, em diferentes tecidos dos frutos frescos (pericarpo, perisperma, endosperma) e em folhas do cafeeiro.

3.3 MATERIAL

3.3.1 Café torrado e moído

As amostras de café torrado e moído de *Coffea arabica* cv. Iapar-59 e *C. canephora* cv. Apoatã foram obtidas junto ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). A torra foi feita em um torrador marca Rod-Bel (aquecimento a gás com capacidade para 300 g) com a temperatura variando de 190 a 230 °C e tempo suficiente para atingir 17 % de perda de peso das amostras (5 a 8 min), denominado torra média. Após os processos de torra e moagem, a uma granulometria de 0,500 mm (peneira ABNT 35), foi feita mistura das espécies na proporção 30 % de café conilon e 70 % de arábica (p/p). A amostra mostrou parâmetros de cor de 24,3 para luminosidade (L^*) e 54,9 para a tonalidade cromática ($H^* = \arctg b^*/a^*$ onde b^* é o componente amarelo/azul e a^* é o componente vermelho/verde).

3.3.2 Frutos frescos e folha

As amostras de frutos de café frescos e folhas foram obtidas junto ao IAPAR. Utilizaram-se as espécies *Coffea arabica* cv. Iapar-59 e *C. canephora* cv. Apoatã.

Coletaram-se os frutos em diferentes tempos, visando maior facilidade na separação dos tecidos e obtenção de maior massa de amostra para análise. O perisperma está presente principalmente no início do amadurecimento, até 150 dias após florada (DAF) e o endosperma está em maior proporção nas fases mais maduras do fruto (entre 150 e 240 DAF). O pericarpo (polpa) está no fruto em todos os estádios de maturação (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006; GEROMEL et al., 2006).

Os frutos de *C. arabica* foram coletados nos tempos de 83 e 240 DAF. O perisperma analisado foi obtido a partir dos frutos coletados 83 dias após a florada, e o endosperma e pericarpo, dos frutos coletados a 240 DAF. Para o *Coffea canephora*, os frutos foram coletados a 120 DAF (para perisperma) e 214 DAF (para endosperma e pericarpo). Além dos frutos, folhas maduras foram também coletadas.

Os frutos e as folhas foram acondicionados em tubos de plástico com tampa, imediatamente congelados em nitrogênio líquido para evitar oxidação e armazenados a - 80 °C antes de serem analisados. Após separação dos tecidos dos

frutos, cada amostra foi macerada, com auxílio de pistilo e almofariz, sempre na presença de N_2 . As amostras foram pesadas em tubos de ensaio, tomando-se o cuidado para evitar a elevação da temperatura (evaporação completa do N_2).

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Extração de caveol e cafestol e preparo das amostras

Foi utilizado um procedimento para extração dos diterpenos, por saponificação direta com posterior separação da fração insaponificável, originalmente empregado para um método espectrofotométrico de avaliação de caveol em café torrado (DIAS, 2005; ALVES, 2004). Para saponificação das amostras, utilizou-se hidróxido de potássio (Synth, Diadema, Brasil) em etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), seguido de extração com terc-butil metil éter (Vetec, de grau analítico – Duque de Caxias, Brasil) e limpeza com água purificada (sistema de purificação Milli-Q[®], Millipore, Billencia, EUA) (Figura 3.1). O extrato etéreo foi ressuspendido na fase móvel, seguido de diluição, filtração em membrana de nylon 0,45 μm (Millipore) e injeção no cromatógrafo.

Os padrões de caveol e cafestol (Axxora, San Diego, EUA) certificados por Alexis Biochemicals com pureza de 98 % (Lausen, Suíça), mantidos a $-22\text{ }^{\circ}C$, foram utilizados para identificação dos picos correspondentes nos cromatogramas e para a validação do método.

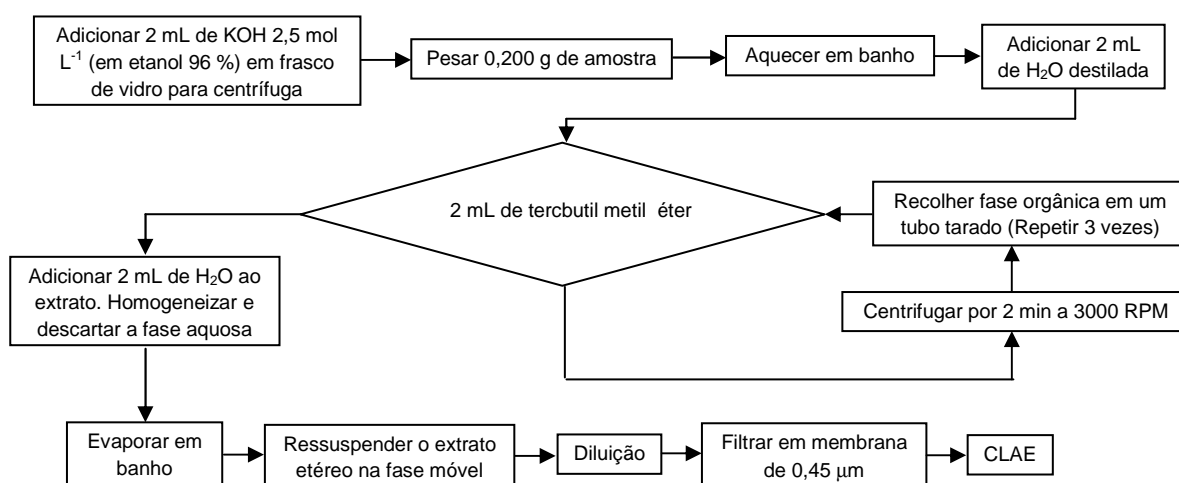


Figura 3.1 – Fluxograma para extração de matéria insaponificável.

3.4.2 Avaliação cromatográfica

Utilizou-se um Cromatógrafo a Líquido Shimadzu (Kyoto, Japão) com sistema quaternário de bombeamento de solvente (modelo LC10 ATvp), degaseificador DGU-14 Avp, forno para coluna modelo CTO-10 ASvp e válvula injetora Rheodyne com “loop” de 20 μ L. O sistema estava acoplado a um detector espectrofotométrico UV/Visível de arranjo de diodos (varredura de 190 a 800 nm) Shimadzu modelo SPD-M10 Avp, conectado por interface (SCL-10 Avp) a um microcomputador para processamento dos dados. As fases móveis utilizadas foram filtradas em sistema Millipore de filtração a vácuo em membranas de 0,45 μ m (de nylon e celulose).

Para identificação, quantificação dos compostos e validação do método foram empregados padrões de cafestol e caveol. A identificação foi realizada no cromatógrafo a líquido, com base nos tempos de retenção dos solutos eluídos da coluna comparados com o do padrão e por co-cromatografia, e pelo espectro UV-Vis. A quantificação foi feita por padronização externa, construindo-se as curvas de calibração considerando-se a área do pico.

As condições cromatográficas foram estudadas com base na literatura (ARAÚJO; SANDI, 2006; KURZROCK; SPEER, 2001b; CASTILLO; HERRAIZ; BLANCH, 1999; FREGA; BOCCI; LERCKER, 1994). Foram testadas duas colunas (Spherisorb – Milford, EUA - ODS 1, 7 % de substituição, não capeada; ODS 2, 12 % de substituição, capeada) e fases móveis com modificadores orgânicos acetonitrila (Carlo Erba, Duque de Caxias, Brasil) e metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) em misturas com água, estudando-se o tipo de eluição (gradiente ou isocrática), vazão e a diluição da amostra.

É importante ressaltar que a técnica por CLAE foi estudada em paralelo com os testes efetuados para a extração e preparo de amostra, visto a dependência entre estas partes. Portanto, os parâmetros cromatográficos foram definidos quando se atingiu a maior eficiência possível de extração dos diterpenos, ou seja, máximo rendimento de extração e pureza de caveol e cafestol.

3.4.3 Validação do método cromatográfico

Os procedimentos para validação do método por cromatografia foram baseados nas normas da AOAC (2003), como sugere Ribani et al. (2004) e o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” (ANVISA, 2003).

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar linearidade, precisão, sensibilidade, exatidão e limites de detecção e quantificação adequados à análise (ANVISA, 2003).

A linearidade foi determinada pela análise em triplicata de misturas padrão em seis concentrações eqüidistantes, entre 50 e 1000 mg de caveol ou cafestol por 100 g, construindo-se as curvas de calibração e calculando-se o coeficiente de determinação (R^2) e nível de significância (p). A faixa de concentração foi determinada baseada em análises prévias e em dados da literatura (RUBAYIZA; MEURENS, 2005; KURZROCK; SPEER, 2001a; URGERT; KATAN, 1997; ROOS et al., 1997; URGERT et al., 1995).

A exatidão do método foi verificada por ensaios de recuperação realizados em duplicata. Foi feita adição de padrão de caveol e cafestol às amostras (0,200 g) antes da análise, na quantidade de aproximadamente 50 % do teor inicial, ou seja, adição de 0,01; 0,01; 0,05 mg para perisperma, endosperma e pericarpo de *C. canephora*; 0,04 mg para folha de *C. arabica* e 0,4 mg para café torrado.

Para determinação da precisão, foram analisadas cinco extrações diferentes da mesma amostra (0,200 g), sujeitas às mesmas condições de extração e análise, no mesmo equipamento, no menor espaço de tempo possível (repetibilidade em diferentes extrações). O estudo de repetibilidade foi feito para cada uma das matrizes.

Os valores de Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) foram estimados usando a Equação 1:

$$LD, LQ = c.(S/N).N/H \quad (1)$$

onde: S/N é a razão sinal/ruído (para LD, S/N = 3,3 e para LQ, S/N = 10);

c = concentração da amostra;

N = valor do ruído quando branco é analisado;

H = valor do sinal quando a amostra é analisada.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Extração dos diterpenos e preparo de amostra

O procedimento de extração original por saponificação direta (Figura 3.1) foi adaptado após testes preliminares com padrões comerciais de caveol e cafestol e todas as matrizes em estudo. Fez-se o ajuste de temperatura do primeiro banho para 80 °C por tempo de 1 h, temperatura do banho de evaporação do solvente para 70 °C e tempo de centrifugação de 2 min. Definiu-se ainda uma diluição 1:6 das amostras antes da injeção no cromatógrafo. Foi verificado que não é necessária etapa adicional de limpeza para extrato de folha, onde foi observada a presença de pigmentos. Apesar do número maior de substâncias eluídas no início do cromatograma, a eficiência do sistema cromatográfico não foi afetada, visto que os picos de caveol e cafestol apresentaram perfil cromatográfico e eficiência de separação semelhantes aos resultados com as outras matrizes (Figura 3.3).

Cabe ressaltar que, para evitar oxidação dos compostos e escurecimento enzimático, é necessário um cuidado especial na maceração e pesagem dos tecidos dos frutos e folha, realizado sob baixa temperatura, como descrito. Observou-se melhor repetibilidade pesando as amostras de folha e tecidos de frutos frescos diretamente na solução de KOH ao invés da pesagem no tubo e posterior adição da solução saponificante, provavelmente devido à menor exposição ao oxigênio do ar, evitando-se a oxidação (Figura 3.1).

3.5.2 Definição das condições cromatográficas

Para definição de um procedimento cromatográfico padrão avaliou-se a resolução dos compostos de interesse em todas as matrizes, bem como a possibilidade de avaliação dos compostos em conjunto. Conforme verificado em outros trabalhos (ARAÚJO; SANDI, 2006; KURZROCK; SPEER, 2001b; PETTIT JR., 1987), a maior dificuldade foi a separação adequada dos picos do caveol e cafestol. Mesmo utilizando-se um detector de arranjo de diodos, que permite a leitura em comprimentos de onda diferenciados, dependendo das condições utilizadas os picos apresentavam-se com tempos de retenção muito próximos, comprometendo a eficiência do processo cromatográfico. Entre as várias combinações de condições

testadas, as diferenças quanto à separação dos picos de interesse foram pequenas. Isto ocorreu provavelmente devido à semelhança estrutural dos compostos avaliados: apenas uma dupla ligação no anel de caureno diferencia o caveol do cafestol (Figura 3.2).

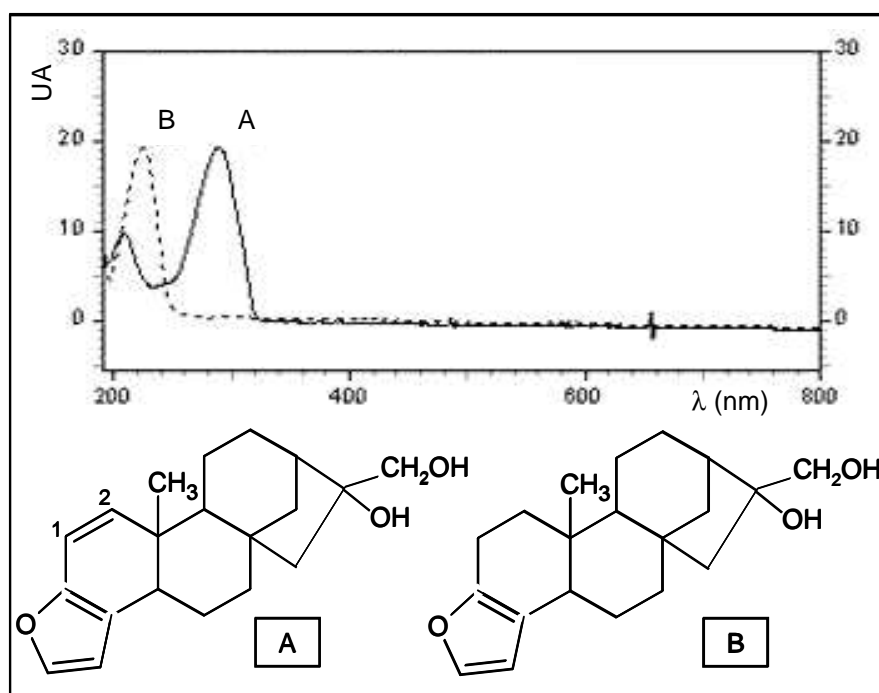


Figura 3.2 – Espectro (190 a 800 nm) de caveol (A) e cafestol (B) obtidos com padrão comercial.

Optou-se pelo emprego de coluna Spherisorb ODS 1 e eluição isocrática com mistura acetonitrila/água, condições que resultaram em picos melhor definidos e maior tempo de separação (Tabela 3.1 e Figura 3.3). Considerou-se, ainda, o comprimento de onda de máxima absorção para caveol (290 nm) e cafestol (230 nm), obtidos pelos espectros dos compostos adquiridos no detector de diodos (Figura 3.2).

Tabela 3.1. Resumo das condições cromatográficas propostas.

Fase Estacionária	Coluna	Spherisorb ODS 1 – 250 mm x 4,6 mm Partículas esféricas de 5 µm, 7 % de substituição, não capeada;
		Coluna de guarda de C18, partícula de 5 µm
Fase Móvel	Composição	Acetonitrila/água 55/45 % (v/v)
	Vazão	0,9 mL/min
	Eluição	Isocrática
Detecção no UV-Vis	Programação	230 nm para cafestol e 290 nm para caveol
Tempo de corrida		20 min
Temperatura da coluna		25 °C

Verificou-se a pouca complexidade das condições, visto a não necessidade de gradiente de fase móvel. A metodologia apresentou tempo de corrida relativamente curto (20 min), com tempo de retenção próximo a 16 min para caveol e 17 min para cafestol (Figura 3.3).

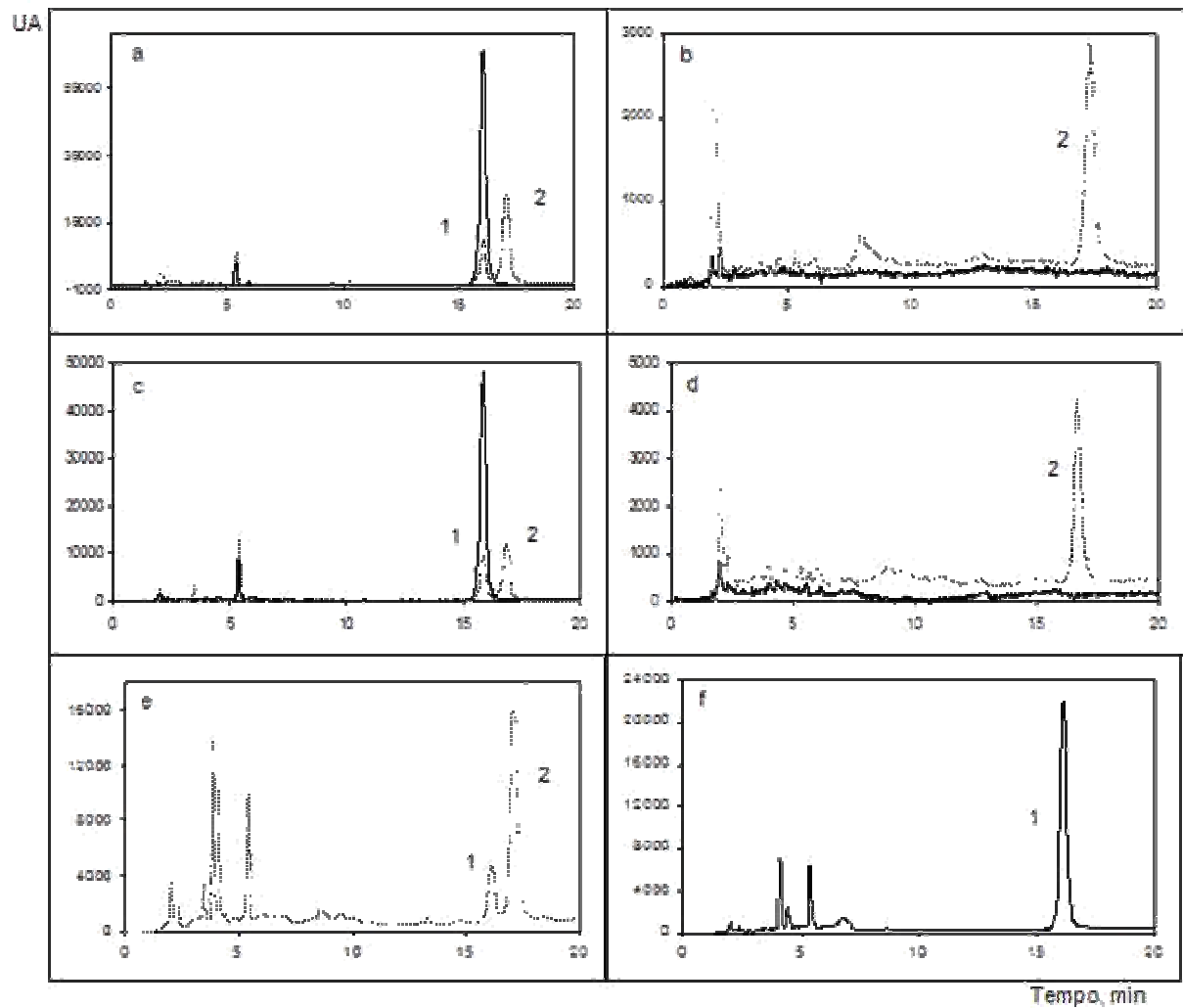


Figura 3.3 – Cromatogramas típicos: endosperma (a), pericarpo (b), perisperma (c) e folha (d) de *C. arabica*, e café torrado (mistura 70:30 *C. arabica*:*C. canephora*) (e - 230 nm; f - 290 nm). Detecção a 230 (----) e 290 nm (—). Picos de cafeol (1) e cafestol (2).

3.5.3 Validação da metodologia analítica

As curvas de calibração mostraram-se lineares na faixa estudada, com alta correlação (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 – Parâmetros da regressão linear das curvas de calibração^a dos diterpenos.

Parâmetros	Caveol	Cafestol
Equação ^b	$y = 0,00051991x + 79,5875$	$y = 0,000477975x + 12,3132$
R ² ; p	0,98; <0,001	0,99; <0,001
Faixa de linearidade (mg/100 g de amostra)	50 a 1000	50 a 1000

^an = 18 (6 pontos em triplicata)

^by = quantidade da substância em mg/100 g de amostra; x = área do pico cromatográfico.

Observou-se boa recuperação para caveol em todas as amostras: 94 % (perisperma), 101 % (polpa), 95 % (endosperma), 97 % (folha) e 109 % (café torrado). Resultados satisfatórios foram também observados para cafestol: 99 % (perisperma), 88 % (polpa), 93 % (endosperma), 82 % (folha) e 106 % (café torrado). Para ésteres de cafestol, foi descrita recuperação variando de 94 a 103 % (KURZROCK; SPEER, 2001a). Kolling-Speer; Strohschneider; Speer (1999), para diterpenos livres, citaram recuperação de cafestol de 80,5 % (para adição de padrão em torno de 50 % do valor inicial da amostra), mas não relataram a recuperação para caveol.

Para os dois compostos foram observados coeficientes de variação (CV) inferiores a 6 % para 5 repetições de extração, com exceção da análise de caveol no perisperma de *C. arabica* (Tabela 3.3). Para determinação de cafestol na forma livre, foi descrito CV de 2 %, mas não foi citada a repetibilidade observada para caveol (KOLLING-SPEER; STROHSCHNEIDER; SPEER, 1999). Durante todas as etapas de desenvolvimento do método, observou-se que havia diferença de estabilidade dos diterpenos durante a extração e análise, evidenciada pela menor repetibilidade na quantificação de caveol (maior CV). Por apresentar uma dupla ligação a mais em sua estrutura (Figura 3.2), caveol tende a ser mais sensível a reações de adição e hidrogenação. É relatado que o caveol, em sua forma purificada, apresenta pouca estabilidade ao calor e luz (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006).

Os teores de diterpenos nas amostras analisadas foram maiores que o limite de detecção e quantificação do método (Tabela 3.3). Para o caveol, obteve-se LD de 2,3 mg/100 g de amostra e LQ de 7,1 mg/100 g, respectivamente. Para cafestol, os resultados foram semelhantes: 3,0 e 9,1 mg/100 g. O menor teor detectável de caveol, 446 mg/100 g, foi encontrado para a amostra de café torrado, valor no

mínimo 60 vezes maior que o LQ do composto. Para o cafestol, o menor teor, foi encontrado para pericarpo de *C. canephora*, com aproximadamente três vezes o valor de LQ.

Tabela 3.3 – Teores^a dos diterpenos nos tecidos separados de frutos, em folhas e grãos torrados.

	Amostra	Perisperma	Endosperma	Pericarpo ^c	Folha ^d	Café torrado
Caveol	<i>C. arabica</i>	516 ± 68 (13)	589 ± 31 (5)	Nd	Nd	446 ± 8 (2)
	<i>C. canephora</i>	Nd ^b	Nd	Nd	Nd	
Cafestol	<i>C. arabica</i>	132 ± 4 (3)	304 ± 11 (3)	49 ± 2 (5)	45 ± 2 (4)	323 ± 14 (4)
	<i>C. canephora</i>	109 ± 4 (3)	94 ± 3 (3)	36 ± 2 (6)	Nd	

^a Média (mg/100 g de amostra) para 5 repetições ± desvio-padrão (coeficiente de variação, %).

^b Nd = não detectado.

^{c,d} Valores estimados pela equação da curva pois estão abaixo do menor ponto (Tabela 3.2).

Verificou-se que apenas o cafestol esteve presente em folhas de *C. arabica* e pericarpo de ambas as espécies (Tabela 3.3). O teor de caveol em folhas de *C. arabica* foi relatado como desprezível (< 0,01 mg/100 g amostra), enquanto que a concentração de cafestol foi descrita como próxima a 55,0 mg/100 g de folhas de *C. arabica* e 4,9 mg/100 g para folhas de *C. canephora* (KÖLLING-SPEER; SPEER, 1997).

Dentre as folhas e os tecidos de frutos analisados, as maiores concentrações de caveol foram detectadas em endosperma (589 mg/100 g) e perisperma (516 mg/100 g) de *C. arabica* cv. Iapar-59 (240 e 83 DAF, respectivamente). O *C. canephora* cv. Apatã não apresentou quantidade de caveol detectável nos tecidos analisados. Para cafestol, a maior concentração (304 mg/100 g) foi detectada no endosperma de *C. arabica* (Tabela 3.3).

Para grãos secos de café verde de *C. arabica*, compostos predominantemente pelo endosperma, os valores encontrados na literatura variaram entre 100 e 736 mg de caveol/100 g de amostra (RUBAYIZA; MEURENS, 2005; KURZROCK; SPEER, 2001a; URGERT et al., 1995). Os teores de cafestol também apresentaram grande variabilidade na literatura: de 150,0 a 370,0 (URGERT et al., 1995) e de 300 a 700 mg/100 g (RUBAYIZA; MEURENS, 2005). Para café verde de *C. canephora*, foram

reportados valores inferiores a 10,0 mg de caveol/100 g de amostra e na faixa de 270,0 a 670,0 mg cafestol/100 g de amostra (URGERT et al., 1995; ROOS et al., 1997). Outro trabalho mostrou menor variação e teores mais baixos de cafestol, entre 100 e 300 mg /100 g (RUBAYIZA; MEURENS, 2005). A ampla faixa de concentração observada nos relatos é devida a amostras provenientes de diferentes origens geográficas, diferentes cultivares de *C. arabica* e *C. canephora* e mais provavelmente às metodologias aplicadas para extração e quantificação de cafestol e caveol.

Em amostra de café torrado (composta de mistura *C. arabica* e *C. canephora*, 70:30), o teor de caveol foi superior ao de cafestol (446 e 323 mg/100 g) e comparáveis aos descritos na literatura. Foram reportados valores próximos a 650 mg de caveol/100 g e 600 mg de cafestol/100 g de amostra de *Coffea arabica* com torra escura (URGERT et al., 1995). Em amostra de *C. canephora* de torra média, não foi detectado caveol e para cafestol foi relatado 250 mg/100 g de amostra (CAMPANHA, 2008).

3.6 CONCLUSÕES

Foi desenvolvida metodologia cromatográfica para separação e quantificação simultânea de caveol e cafestol em amostras das espécies *C. arabica* e *C. canephora*, para tecidos de frutos, folhas e café torrado. As melhores condições foram obtidas utilizando-se coluna de fase reversa Spherisorb ODS-1, fase móvel acetonitrila/H₂O e detecção no UV. Padronizou-se um procedimento de extração para todas as amostras utilizando saponificação direta com posterior separação da fração insaponificável e limpeza com água. Para tecidos de frutos frescos (pericarpo, endosperma, perisperma) e folhas do cafeeiro, destaca-se a necessidade do emprego de nitrogênio líquido no início da extração (separação dos tecidos, maceração e pesagem) para evitar oxidação do material.

As curvas de calibração mostraram-se lineares na faixa estudada (50 a 1000 mg/100 g) e observou-se adequada repetibilidade e recuperação (94-109 % para caveol e 82-106 % para cafestol). Os baixos limites de detecção (2,3 e 3,0 mg/100 g para caveol e cafestol), inferiores às menores concentrações encontradas nas amostras, permitiram a quantificação com segurança. Caveol esteve presente em maior quantidade no endosperma e perisperma de *C. arabica* cv. Iapar-59. Cafestol

não foi detectado apenas em folhas do cultivar Apoatã de *C. canephora*. A metodologia pode ser aplicada na quantificação dos diterpenos em amostras com mistura de espécies torradas.

3.7 COLABORADORES

Fernanda Gonçalves Campanha

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina

Luiz Gonzaga Esteves Vieira, Lucia Pires Ferreira

Instituto Agronômico do Paraná

David Pot, Pierre Marraccini

Cirad, Montpellier, França

3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. T. **Desenvolvimento de metodologia analítica para diferenciação de café torrado arábica (*Coffea arabica*) e conilon (*Coffea canephora*) e misturas** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2004. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.uel.br>>. Acesso em: 07 jul. 2009.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 17^a ed., Association of Official Analytical Chemists: Arlington, 2003, apêndice E.

ARAÚJO, J. M. A.; SANDI, D. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, Oxford, v. 101, n. 3, p. 1087-1094, 2006.

BERTHOLET, R. (1988) Preparation of a mixture of cafestol and kahweol. US Patent 4,748,258.

BOEKSCHOTEN, M. V.; ENGBERINK, M. F.; KATAN, M. B.; SCHOUTEN, E. G. Reproducibility of the serum lipid response to coffee oil in healthy volunteers. **Nutrition Journal**, London, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2003.

CAMPANHA, F. G. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) pela composição de diterpenos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2008. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.uel.br>>. Acesso em: 07 jul. 2009.

CASTILLO, M. L. R.; HERRAIZ, M.; BLANCH, G. P. Rapid analysis of cholesterol-elevating compounds in coffee brews by off-line high performance liquid chromatography / high resolution gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 4, p. 1525-1529, 1999.

CAVIN, C.; HOLZÄUSER, D.; CONSTABLE, A.; HUGGETT, A. C.; SCHILTER, B. The coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol protect against aflatoxin B1-induced genotoxicity through a dual mechanism. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 1369-1375, 1998.

CAVIN, C.; HOLZHÄUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W. W.; SCHILTER, B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 8, p.1155-1163, 2002.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café: safra 2009, primeira estimativa**. Brasília: CONAB, 2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1_levantamento_2009.pdf>. Acesso em: 07 jul. 2009.

DE CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 18, n. 1, p 175-199, 2006.

DIAS, R. C. E. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) em diferentes graus de torra**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2005. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.uel.br>>. Acesso em: 07 jul. 2009.

FREGA, N.; BOCCI, F.; LERCKER, G. High resolution gas chromatographic method for determination of robusta coffee in commercial blends. **Journal of High Resolution Chromatography**, Weinheim, v. 17, n. 5, p. 303-307, 1994.

GEROMEL, C., FERREIRA, L. P., CAVALARI, A. A., PEREIRA, L. F. P., GUERREIRO, S. M. C., VIEIRA, L. G. E., LEROY, T., POT, D., MAZZAFERA, P., MARRACCINI, P. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 12, p. 3243-3258, 2006.

GROLLIER, J. F; PLESSIS, S. (1998) Use of coffee bean oil as a sun filter. US Patent 4,793,990.

GROSS, G.; JACCAUD, E.; HUGGETT, A. C. Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 6, 1997.

GUERRERO, G.; SUÁREZ, M.; MORENO, G. Chemosystematic study of diterpenoids in green coffee beans. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE (ASIC), 20. 2005, Paris, **Proceedings...** Paris. p. 292-296.

KIM, H. G.; KIM, J. Y.; HWANG, Y. P.; LEE, K. J.; LEE, K. Y.; KIM, D. H.; KIM, D. H.; JEONG, H. G. The coffee diterpenes kahweol inhibits tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in human endothelial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 217, n. 3, p. 332-341, 2006.

KÖLLING-SPEER, I.; SPEER, K. In: In INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE (ASIC), 17. 1997, Paris, **Proceedings...** Paris. p. 150-154.

KÖLLING-SPEER, I.; STROHSCHNEIDER, S.; SPEER, K. Determination of free diterpenes in green and roasted coffees. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, n. 1, p. 43-46, 1999.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Diterpenes and diterpene esters in coffee. **Food Reviews International**, New York, v. 17, n. 4, p. 433-450, 2001a.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Identification of kahweol fatty acid esters in arabica coffee by means of LC / MS. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 24, n. 10-11, p. 843-848, 2001b.

LEE, K. J.; CHOI, J. H.; JEONG, H. G. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 11, p. 2118-2125, 2007.

LEE, K. J.; JEONG, H. G. Protective effects of kahweol and cafestol against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 173, n. 2, p. 80-87, 2007.

LERCKER, G.; FREGA, N.; BOCCI, F.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. High resolution gas chromatographic determination of diterpenic alcohols and sterols in coffee lipids. **Chromatographia**, Oxford, v. 41, n. 1-2, p. 29-33, 1995.

PETTITT JUNIOR, B. C. Identification of the diterpene esters in arabica and canephora coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 35, n. 4, p. 549-551, 1987.

POSTE, S. M.; ROOS, B.; VERMEULEN, M.; AFMAN, L.; JONG, M. C.; DAHLMANS, V. E. Cafestol increases serum cholesterol levels in apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice by suppression of bile acid synthesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. Dallas, v. 20, n.6, p.155-156, 2000.

RIBANI, M.; BATTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROOS, B.; VAN DER WEG, G.; URGERT, R.; VAN DE BOVENKAMP, P.; CHARRIER, A.; KATAN, M. B. Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.45, n. 8, p. 3065-3069, 1997.

RUBAYIZA, A. B.; MEURENS, M. Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by fourier transform raman spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 12, p. 4654-4659, 2005.

SALDANHA, T.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N; BRAGAGNOLO, N. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, n. 12, 4107-4113, 2006.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 201-216, 2006.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER. Lipids. In: CLARKE R. J.; VITZTHUM O. G.(Eds). **Coffee: recent developments**. Blackwell Science, Oxford, p. 33-49, 2001.

URGERT, R.; KATAN, M. B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 17, n. 1, p. 305-324, 1997.

URGERT, R.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUIL, T. G.; VAN DE BOVENKAMP, P.; HOVENIER, R.; KATAN, M. B. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 8, p. 2167-2172, 1995.

VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 95-108, 2006.

WEUSTEN-VAN DER WOUW, M. P. M. E.; KATAN, M. B.; VIANI, R.; HUGGETT, A. C.; LIARDON, R.; LUND-LARSEN, P. G.; THELLE, D. S.; AHOLA, I.; ARO, A; MEYBOOM, S.; BEYNEN, A. C. Identity of the cholesterol-raising factor from boiled coffee and its effects on liver function enzymes. **Journal of Lipid Research**, Stanford, v. 35, n.4, p.721-733, 1994.

YAN, P. S.; WHITE, P. J. Cholesterol oxidation in heated lard enriched with two levels of cholesterol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 67, n.12, p. 927-931, 1990.

CAPÍTULO 4

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR ESPECTROFOTOMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DE CAVEOL EM GRÃOS DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO

4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR ESPECTROFOTOMETRIA PARA DETERMINAÇÃO DE CAVEOL EM GRÃOS DE CAFÉ TORRADO E MOÍDO

4.1 RESUMO

O diterpeno caveol, componente da matéria insaponificável do óleo do café, apresenta propriedades anticarcinogênica e antioxidante. Pode ser usado como ferramenta de discriminação de espécies de café por estar presente em diferentes teores. Realizou-se a validação de uma metodologia por Espectrofotometria para determinação de caveol em café torrado e moído. Utilizou-se saponificação direta com KOH e extração da matéria insaponificável com terc-butil metil éter, limpeza com água e reação colorimétrica de KI com o caveol para posterior análise do produto de reação a 620 nm. Os ensaios de repetibilidade em diferentes extrações e intra-dia (para mesma extração) apresentaram CV abaixo de 5 %, mostrando boa precisão. A metodologia apresentou linearidade ($R^2=0,996$, $p\leq 0,05$), com limites de detecção e quantificação equivalentes a 5,16 mg/100 g e 17,2 mg/100 g, respectivamente. Foi obtida recuperação média de 116 % para dois níveis de adição de padrão. Na comparação com a metodologia por CLAE, não se observou diferença significativa para o teor de caveol determinado. O método espectrofotométrico foi aplicado com sucesso na quantificação de caveol em cafés torrados comerciais e mostrou potencial para emprego em outras matrizes de café (tecidos de frutos e folhas). A validação permitiu que o método pudesse ser aplicado como triagem na identificação da adição de *Coffea canephora* ao *Coffea arabica* com relativa simplicidade e rapidez.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *Coffea canephora*. Espectro UV-Vis. Diterpeno. Discriminação.

4.2 INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos da cafeicultura nacional é tornar o produto brasileiro competitivo internacionalmente em nível de qualidade, uma vez que, atualmente, sua imagem positiva baseia-se principalmente no aspecto econômico,

sendo atrativo apenas pelo baixo valor comercial (ASSAD et al., 2002; LOPES, 2000). As espécies do gênero *Coffea* diferem consideravelmente no preço, qualidade e aceitabilidade, mas também nos aspectos visuais. Porém, após os processos de torra e moagem, não se distinguem as espécies visualmente e, como pertencem ao mesmo gênero, possuem poucas diferenças para detecção da adição de café conilon, de menor valor comercial, ao arábica.

O teor de matéria insaponificável é de aproximadamente 12 g/100 g de óleo do café, destacando-se a presença do diterpeno caveol (LAGO, 2001). O teor de caveol foi citado como possível ferramenta de discriminação de espécies de café em misturas, por estar presente em diferentes quantidades nas espécies (maior teor em café arábica que no conilon) e ser relativamente estável à temperatura de processo (CAMPANHA, 2008; DIAS, 2005; KEMSLEY; RUAULT; WILSON, 1995).

Entre as técnicas utilizadas para determinação de caveol, destaca-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (DIAS et al., 2009; ARAÚJO; SANDI, 2006; KURZROCK; SPEER, 2001b; CASTILLO; HERRAIZ; BLANCH, 1999; PETTITT JR., 1987). No entanto, deve-se considerar que é uma metodologia relativamente cara e dependente de equipamento nem sempre disponível.

Uma metodologia baseada na técnica por Espectrofotometria, semi-quantitativa, mais simples e barata, foi desenvolvida para avaliação de caveol (DIAS; SCHOLZ; BENASSI, 2005; ALVES; SCHOLZ; BENASSI, 2003), com o objetivo de discriminar amostras de misturas de espécies de café torrado e moído. Foi proposta a saponificação a quente das amostras, seguida de extração com terc-butil metil éter e limpeza com água. Após reação colorimétrica com KI, mediu-se a absorvância a 620 nm, comprimento de onda (λ) de máxima absorção do produto de reação com o iodeto de potássio. A avaliação de cada etapa e testes de rusticidade definiram o procedimento de extração e determinação do caveol. A metodologia mostrou-se eficiente na identificação da adição de conilon ao arábica em proporções acima de 30 %, considerando cafés com diferentes graus de torra, indicando a possível utilização como método de triagem para adição de conilon, como havia sugerido Kemsley, Ruault e Wilson (1995). No entanto, tendo em vista a não utilização de padrão comercial de caveol para confirmação da especificidade da reação colorimétrica, validação da metodologia e construção de uma curva de calibração, o método foi considerado semi-quantitativo, permitindo apenas avaliação dos valores

de absorvância que indicavam comparativamente maior ou menor presença de caveol nas amostras.

Assim, o objetivo do trabalho foi validar a metodologia por Espectrofotometria para determinação de caveol. Além de garantir o atendimento às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados, a validação possibilita que o método seja usado para o uso rotineiro de análise quantitativa de caveol em cafés torrados e moídos.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Amostras

As amostras de café torrado e moído de *Coffea arabica* e *C. canephora* foram adquiridas junto a Companhia Iguaçu de Café Solúvel (Cornélio Procópio, PR). Realizou-se o processo de torra em torrador Rod Bel, tipo piloto, capacidade de 3,6 kg/h, a uma temperatura máxima de 230 °C, e moagem em moedor acoplado, até granulometria de 0,590 mm (peneira ABNT 30).

A caracterização das amostras quanto à cor (triplicata) foi efetuada com um colorímetro portátil Color-guide (BYK-Gardner, EUA), com geometria 45/0, iluminante D65, e região circular de leitura de 11 mm de diâmetro, com coeficientes de variação menor que 5 % para todas as avaliações.

A amostra de café arábica foi utilizada para os ensaios de repetibilidade, com luminosidade (L^*) de 22,0 e tonalidade cromática (H^*) de 55,2 ($H^* = \arctg b^*/a^*$, onde b^* é o componente amarelo/azul e a^* é o componente vermelho/verde). Fez-se a análise de *C. canephora* (conilon) apenas para comparação com o café arábica e dados da literatura. L^* de 30,3 e H^* de 60,2 foram obtidas para o conilon. Uma mistura das espécies na proporção 70 % de café conilon e 30 % de arábica (p/p) foi utilizada para os ensaios de recuperação. A amostra apresentou parâmetros de cor de 31,5 para L^* e 59,4 para H^* .

Para a avaliação da precisão da metodologia, foram também utilizados cafés comerciais, obtidos em comércio local: amostras A (L^* de $18,2 \pm 1,3$; H^* de $54,3 \pm 0,4$), B (L^* de $17,6 \pm 0,7$; H^* de $54,2 \pm 0,3$) e C (L^* de $19,1 \pm 0,7$; H^* de $58,6 \pm 1,2$). Os cafés tinham denominação Tradicional, indicando *blend* constituído de café arábica e até 30 % de conilon, e cor indicando grau de torra de médio a escuro.

Além das amostras de café torrado e moído, foram testados tecidos de frutos frescos de *Coffea arabica* e folhas do cafeeiro, fornecidos pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR, Londrina - PR). O perisperma analisado foi obtido a partir dos frutos coletados 83 dias após a florada (DAF), e o endosperma e pericarpo, dos frutos coletados a 240 DAF, época em que os frutos apresentam maiores proporções desses tecidos (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006; GEROMEL et al., 2006). Avaliaram-se folhas jovens e maduras do cafeeiro de *C. arabica* e *C. canephora*, para verificação principalmente da existência de interferentes na região do λ de maior absorção do produto da reação colorimétrica (620 nm), considerando a presença de grande quantidade de pigmentos nas folhas. Os frutos e as folhas foram acondicionados em tubos de plástico com tampa, imediatamente congelados em nitrogênio líquido para evitar oxidação e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de serem analisados. Após separação dos tecidos, cada amostra foi macerada, com auxílio de pistilo e almofariz, sempre na presença de N_2 .

4.3.2 Reagentes e equipamentos

Foram utilizados hidróxido de potássio (Synth, Diadema, Brasil), etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha); terc-butil metil éter (Vetec, de grau analítico – Duque de Caxias, Brasil), água purificada (sistema de purificação Milli-Q[®], Millipore, Billencia, EUA) e iodeto de potássio (Icasa SA., Monterrey, México). As leituras de absorvância foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis GBC Cintra 20, com faixa de detecção de 190 a 1000 nm e abertura de fenda de 2 nm. Para a validação do método utilizou-se padrão de caveol (Axxora, San Diego, EUA) certificado por Alexis Biochemicals com pureza de 98 % (Lausen, Suíça).

4.3.3 Extração e análise por Espectrofotometria

As amostras foram submetidas a saponificação direta a quente com hidróxido de potássio, extração da matéria insaponificável (MI) com terc-butil metil éter e limpeza com água destilada. A reação colorimétrica da MI foi efetuada com adição de iodeto de potássio (KI) que reage com o caveol para formar composto de cor, conforme método desenvolvido anteriormente (ALVES; SCHOLZ; BENASSI, 2003; DIAS; SCHOLZ; BENASSI, 2005) (Figura 4.1).

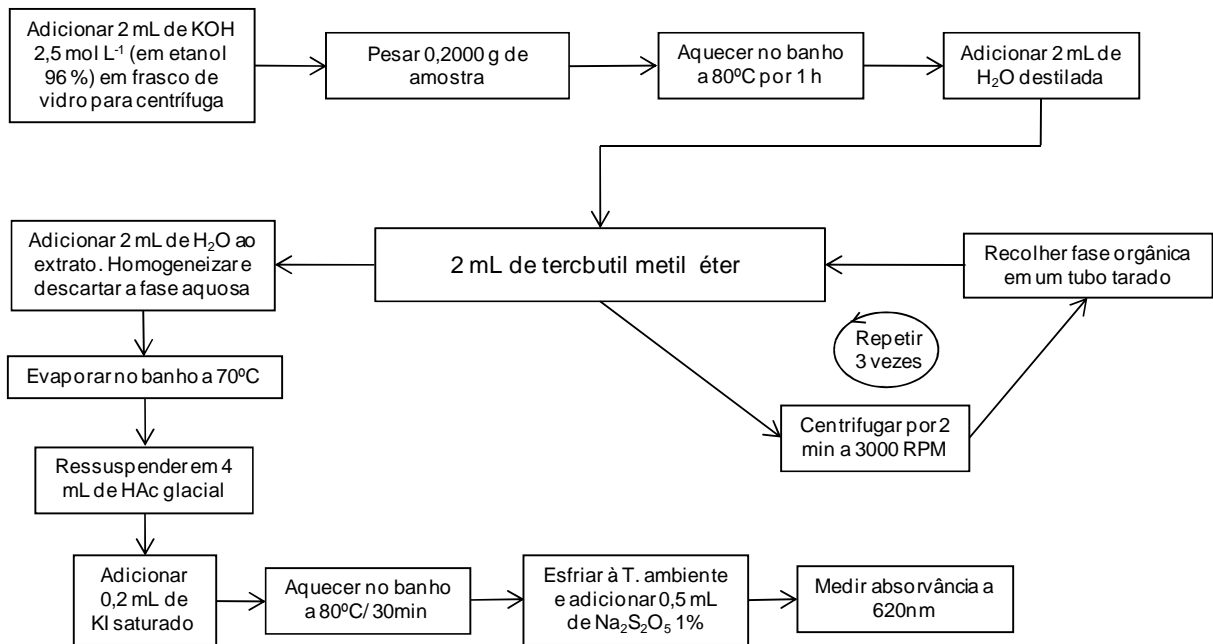


Figura 4.1 - Fluxograma de extração e análise de caveol por espectrofotometria.

Nos testes efetuados com tecidos de frutos frescos e folhas, destaca-se a necessidade do emprego de nitrogênio líquido no início da extração (separação dos tecidos, maceração e pesagem) para evitar oxidação do material (DIAS et al., 2009).

4.3.4 Validação do método espectrofotométrico

Para a validação, foram seguidas as recomendações da AOAC (2003), estudando-se a linearidade, repetibilidade, sensibilidade, e recuperação, conforme sugerido por Ribani et al. (2004).

A linearidade do método foi determinada pela análise de misturas-padrão em seis diferentes concentrações, equidistantes, entre 0,05 e 0,35 mg de caveol/mL de solução. Foi construída a curva analítica para obtenção do nível de significância (p), coeficiente de determinação (R^2) e equação de regressão.

O cálculo do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) permitiu avaliar a sensibilidade do método (Equações 1 e 2).

$$LD = 3 s / S$$

Equação 1

$$LQ = 10 s / S$$

Equação 2

onde s é a estimativa do desvio-padrão do branco (10 leituras) e S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

Para verificação da precisão do método, realizou-se seis extrações (0,200 g) da mesma amostra, sujeitas às mesmas condições de extração e análise, no mesmo equipamento, no menor espaço de tempo possível (repetibilidade em diferentes extrações). Foi estudado também a repetibilidade intra-dia, avaliando-se a mesma extração da amostra (0,200 g) com cinco repetições de leitura.

A exatidão foi estimada, inicialmente, pela porcentagem de recuperação. Foram adicionadas duas concentrações de padrão de caveol às amostras, em duplicata. Quantidades equivalentes a 17,7 % e 35,0 % foram incrementadas à quantidade inicial de caveol da amostra de café torrado (mistura 70:30 de conilon:arábica). Foi ainda realizada comparação entre a metodologia proposta e os resultados obtidos por técnica de cromatografia a líquido de fase reversa (DIAS et al., 2009) para as amostras de café torrado e moído comerciais (análises em duplicata). Esta abordagem assume que a incerteza do método de referência é conhecida. Os dados de concentração de caveol foram submetidos à análise de variância (ANOVA, teste de Tukey para $p \leq 0,05$), considerando-se a metodologia empregada (Espectrofotometria e CLAE) como causa de variação, utilizando-se o programa Statistica 6.0 (STATSOFT, 2001).

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil do espectro é característico na faixa de detecção do produto da reação colorimétrica (a 620 nm), observado nos espectros do padrão (independente da concentração) e da amostra analisada após extração da matéria insaponificável e reação com KI (Figura 4.2).

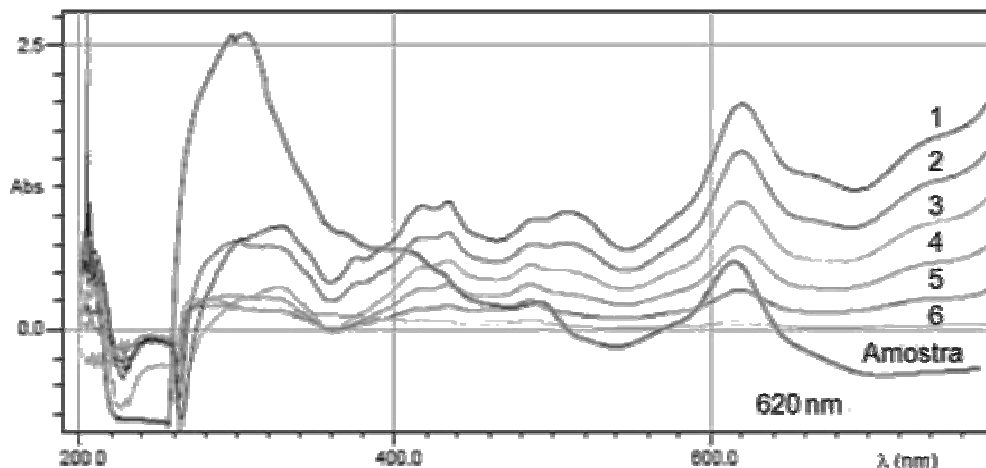


Figura 4.2 - Espectrogramas correspondentes a amostra de café torrado (*blend* de 30 % de arábica e 70 % de conilon) e diferentes concentrações de cateol, correspondentes aos valores da curva de calibração: 1 – 0,35 mg/mL; 2 – 0,29; 3 – 0,23; 4 – 0,17; 5 – 0,11; 6 – 0,05 mg/mL.

Para a amostra de café torrado, foram observados outros compostos absorventes principalmente entre 260 e 400 nm. Na região de interesse analítico não ocorreu interferência e os espectros da amostra e padrão se assemelharam, o que indicou a especificidade da reação colorimétrica do KI com o cateol (Figura 4.2).

A faixa de concentração utilizada para a construção da curva de calibração, de 0,05 a 0,35 mg de cateol/mL de solução, correspondeu a um valor máximo de 700 mg de cateol/100 g de amostra, estimativa extraída da literatura para *C. arabica* (URGERT et al., 1995). O valor mínimo foi definido segundo estudo prévio (DIAS, 2005) que demonstrou que abaixo deste limite não é possível uma leitura precisa da absorvância. Nicolau-Souza et al. (2009) relataram para cafés comerciais de mercado de denominação Tradicional (28 amostras) valores médios de 415 ± 19 mg/100 g de amostra.

A curva de calibração apresentou linearidade na ampla faixa de concentração estudada, com coeficiente de determinação, R^2 , de 0,996 ($p \leq 0,05$). A Equação 3 é resultado da regressão linear da curva.

$$y = 1,6264x - 0,3278$$

Equação 3

onde y é a absorvância obtida experimentalmente e x a quantidade de cateol utilizada antes da ressuspensão em ácido acético glacial (Figura 4.1).

A partir da curva de calibração foi estimada a sensibilidade do método. Observaram-se valores de LD e LQ de 5,16 mg/100 g e 17,2 mg/100 g, respectivamente. Na validação de metodologia por cromatografia a líquido para análise de diterpenos em amostras de café, verificou-se para caveol LD de 2,3 mg/100 g de amostra e LQ de 7,1 mg/100 g (DIAS et al., 2009). Isto indicou que a metodologia por Espectrofotometria, apresentada neste trabalho, tem sensibilidade comparável àquela por CLAE. Os trabalhos que realizaram a quantificação de caveol em amostras de café torrado e moído utilizaram metodologia cromatográfica (ARAÚJO; SANDI, 2006; KURZROCK; SPEER, 2001b; URGERT et al., 1995; FREGA; BOCCI; LERCKER, 1994) e houve um relato por Espectroscopia Raman (RUBAYIZA; MEURENS, 2005). Porém, não houve descrição de avaliação da sensibilidade em nenhum destes estudos.

Considerando os valores observados para caveol em cafés torrados, a sensibilidade é bastante adequada. A concentração para amostra de café arábica foi de aproximadamente 485 mg de caveol/100 g de amostra; no café conilon, não foi detectada a presença de caveol. Na literatura foram encontrados teores de caveol numa ampla faixa, principalmente devido às diferentes origens geográficas e espécies de café: próximo a 13 mg/100 g de café conilon a 650 mg/100 g de café arábica. O menor nível descrito para café arábica foi de 50 mg/100 g (KURZROCK; SPEER, 2001a, 2001b; LAGO, 2001; URGERT et al., 1995; FREGA; BOCCI; LERCKER, 1994). Para amostras comerciais, o menor teor de caveol relatado foi de 100 mg/100 g (NICOLAU-SOUZA et al., 2009), quase 6 vezes maior que o LQ do método espectrofotométrico.

Observou-se ainda uma boa precisão do método (Tabela 4.1). Segundo o Boletim da Vigilância Sanitária (2002), níveis de coeficientes de variação aceitáveis para repetições de mesma amostra devem estar abaixo de 15 %.

Tabela 4.1 - Resultado dos ensaios de repetibilidade.

Precisão	DP	CV%
Entre-extrações*	6,2	1,98
Intra-dia**	17,5	3,61

*Seis repetições; **Cinco repetições.

Para os dois níveis de adição de padrão (17 e 35 %) foram obtidas médias de recuperação próximas a 116 % (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Recuperação (%) do caveol em amostra de café torrado e moído (mistura 70:30 de conilon:arábica).

Ensaio ^a	A ^b	% Adicionada correspondente	Recuperação (Duplicatas)	Recuperação (Média)
sem padrão	0,2486			
sem padrão	0,2467			
0,25	0,4604	17,66	116,4	116,1
0,25	0,4558		115,8	
0,50	0,5463	35,03	112,0	116,0
0,50	0,6095		120,0	

^a Quantidade adicionada (mg) junto com a solução de KOH no início do processo de extração (Figura 4.1).

^b Absorvância a 620 nm.

Mesmo com a indicação de que a metodologia poderia superestimar as concentrações, se for considerado o fato da matriz do café torrado ser relativamente complexa (muitos componentes e interações), os resultados de recuperação encontrados foram satisfatórios. A metodologia por Espectrofotometria, que emprega neste caso uma reação colorimétrica prévia, e, portanto, não é uma análise direta do analito e sim do produto da reação deste com um reagente, dificilmente apresentaria resultados de exatidão e precisão tão bons quanto metodologias de avaliação direta, como a cromatografia.

Estudando a capacidade de técnicas multivariadas de analisar dados obtidos por Espectrofotometria para alguns aditivos de alimentos, Ni, Zhang e Kokot (2005) obtiveram recuperações de até 138 % para etil-maltol e até 112 % para maltol. Ribani et al. (2004) exemplificaram em sua revisão sobre procedimentos de validação que, para pesticidas, a associação dos analistas destes compostos indica ser aceita recuperação entre 70 e 120 %, o que depende da complexidade analítica.

Para avaliação da exatidão, foi ainda feita a comparação entre resultados obtidos empregando-se o método proposto (espectrofotométrico) e os dados obtidos por método cromatográfico (DIAS et al., 2009) para amostras de café comercial de denominação tradicional (marcas A, B e C). Não houve diferença significativa entre as médias dos teores de caveol, indicando a conformidade entre os métodos (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Comparação dos resultados obtidos para caveol por diferentes metodologias em amostras de cafés comerciais.

Amostras Marcas	Concentração* (mg/100g ± DP)	
	Espectrofotometria	CLAE
A	394,7 ^A ± 1,63	388,2 ^A ± 2,95
B	426,8 ^A ± 6,27	398,9 ^A ± 12,37
C	418,2 ^A ± 23,3	480,6 ^A ± 24,01

*Média de duas repetições ± desvio padrão, com coeficiente de variação < 5 % para todas as repetições. Letras diferentes, comparadas apenas nas linhas, indicam diferença significativa entre as médias (Tukey, $p \leq 0,05$).

Vieira et al. (2006) relataram que existe grande interesse em se estudar as vias metabólicas de produção de diterpenos na planta do café. A avaliação destes compostos em diferentes tecidos da planta e frutos em desenvolvimento auxiliaria a identificação de genes e a elucidação das vias biossintéticas envolvidas. Desta forma, como testes preliminares, foram avaliados 3 tecidos que compõem frutos frescos de café (endosperma, perisperma e polpa) e ainda folhas jovens e maduras do cafeeiro. O método mostrou potencial para ser empregado para estas matrizes, destacando-se a não necessidade de alterações no procedimento utilizado para café torrado. Os espectrogramas indicaram que mesmo para folhas, independente da espécie de café avaliada ou a época de coleta, não houve interferentes na região de λ onde o produto de reação do iodeto de potássio com o caveol absorve em maior intensidade (620 nm). O endosperma e o perisperma produziram espectros semelhantes, com compostos absorvendo antes de 400 nm e picos intensos a 620 nm, o que indicou a presença de caveol nestes tecidos (Figura 4.3).

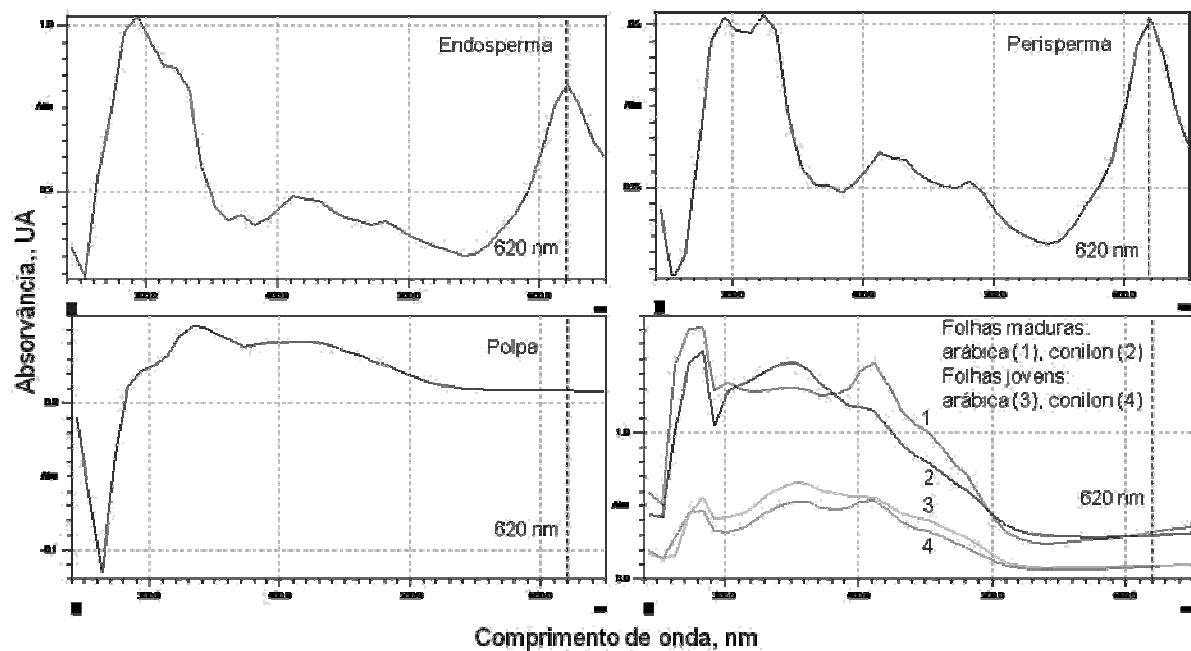


Figura 4.3 – Espectrogramas típicos das amostras de tecidos de café verde (*C. arabica*) e folhas (*C. arabica* e *C. canephora*).

O pericarpo ou polpa produziu espectro de pequena oscilação na região de λ analítico, indicando que caveol possivelmente não está presente neste tecido. Comparando-se as espécies conilon e arábica para folhas coletadas na mesma época, verificaram-se perfis de espectro semelhantes, com compostos que absorveram entre 200 e 500 nm. No geral, as curvas espectrais para as folhas maduras mostraram maiores absorvâncias, principalmente na região citada. Não ocorreram picos na região de análise (Figura 4.3).

Esses resultados são concordantes com a literatura. Kölling-Speer; Speer (1997) descreveram que existe caveol em folhas de *C. arabica* e *C. canephora*, mas em baixas concentrações, menores que 1 mg/100 g, inferiores portanto ao LD do método aqui proposto. Além disso, os próprios autores concluíram que existe grande influência da origem geográfica na quantidade de caveol, considerando-se a mesma espécie. DIAS et al. (2009) relataram, para diferentes tecidos dos frutos frescos, que endosperma e perisperma de *C. arabica* apresentaram teores acima de 500 mg de caveol/100 g de amostra, que não foi detectado em polpa e folhas desta espécie e em folhas de *C. canephora*.

4.6 CONCLUSÕES

A metodologia por Espectrofotometria foi validada e aplicada com sucesso na quantificação de caveol em cafés arábica, conilon e misturas. Apresentou boa precisão (coeficiente de variação abaixo de 5 %), linearidade ($R^2=0,996$, $p\leq 0,05$) em ampla faixa de concentração, com limites de detecção de 5,16 mg/100 g e de quantificação de 17,2 mg/100 g. Observou-se exatidão satisfatória (~ 116 % de recuperação) e resultados similares aos obtidos por metodologia cromatográfica, mesmo tratando-se de uma metodologia de quantificação indireta. O método demonstrou ainda potencial para ser empregado para outras matrizes de café, como pericarpo, endosperma, perisperma de frutos e folhas do cafeeiro. Associado à rapidez e simplicidade, a validação confirmou que o método tem eficiência para ser utilizado como triagem na identificação da adição de *Coffea canephora* ao *Coffea arabica*.

4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. T.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. Desenvolvimento de metodologia espectrofotométrica para diferenciação de café torrado, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 8., 2003, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 2003. p. 343-348.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 17^a ed., Association of Official Analytical Chemists: Arlington, 2003, apêndice E.

ASSAD, E. D.; SANO, E. E.; CUNHA, S. A. R.; CORREA, T. B. S.; RODRIGUES, H. R. Identificação de impurezas e misturas em pó de café por meio de comportamento espectral e análise de imagens digitais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 211-216, 2002.

ARAÚJO, J. M. A.; SANDI, D. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, Oxford, v. 101, n. 3, p. 1087-1094, 2007.

BOLETIM 2002 DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA – Nº 040.02. Disponível em <http://www.sindusfarma.org.br>. Acesso em: 02 jul 2009.

CAMPANHA, F. G. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) pela composição de diterpenos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2008. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.uel.br>>. Acesso em: 07 jul. 2009.

CASTILLO, M. L. R.; HERRAIZ, M.; BLANCH, G. P. Rapid analysis of cholesterol-elevating compounds in coffee brews by off-line high performance liquid chromatography / high resolution gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 4, p. 1525-1529, 1999.

DE CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 18, n. 1, p 175-199, 2006.

DIAS, R. C. E.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. Otimização de método espectrofotométrico para discriminação de café arábica e conilon em diferentes graus de torra. In: 6º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2005, Campinas, **Anais...** Campinas, 2005.

DIAS, R. C. E. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) em diferentes graus de torra**. 2005. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

DIAS, R. C. E.; CAMPANHA, F. G.; BENASSI, M. T.; VIEIRA, L. G. E.; FERREIRA, L. P.; POT, D.; MARRACCINI, P. Metodologia para avaliação de cafeol e cafestol em folhas e tecidos de frutos de cafeeiro e em café torrado. **Química Nova**, São Paulo, 2009 (a ser enviado).

FREGA, N.; BOCCI, F.; LERCKER, G. High resolution gas chromatographic method for determination of robusta coffee in commercial blends. **Journal of High Resolution Chromatography**, Weinheim, v. 17, n. 5, p. 303-307, 1994.

GEROMEL, C.; FERREIRA, L. P.; CAVALARI, A. A.; PEREIRA, L. F. P.; GUERREIRO, S. M. C.; VIEIRA, L. G. E.; LEROY, T.; POT, D.; MAZZAFERA, P.; MARRACCINI, P. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 57, n. 12, p. 3243-3258, 2006.

KEMSLEY, E. K.; RUAULT, S.; WILSON, R. H. Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant robusta beans using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 321-326, 1995.

KÖLLING-SPEER, I.; SPEER, K. Diterpenes in Coffee Leaves. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE (ASIC), 1997, Paris. **Proceedings...**, Paris, 1997.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Diterpenes and diterpene esters in coffee. **Food Reviews International**, New York, v.17, n.4, p.433-450, 2001a.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Identification of kahweol fatty acid esters in arabica coffee by means of LC/MS. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v.24, n. 10-11, p.843-848, 2001b.

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

LOPES, L. M. V. **Avaliação da qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2000. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NI, Y.; ZHANG, G; KOKOT, S. Simultaneous spectrophotometric determination of maltol, ethyl maltol, vanillin and ethyl vanillin in foods by multivariate calibration and artificial neural networks. **Food Chemistry**, Oxford, v. 89, n. 3, p. 465-473, 2005.

NICOLAU-SOUZA, R. M.; CANUTO, G. A. B.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. **Química Nova**, 2009 (em análise).

PETTITT JUNIOR, B. C. Identification of the diterpene esters in arabica and canephora coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 35, n. 4, p.549-551, 1987.

RIBANI, M.; BATTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RUBAYIZA, A. B.; MEURENS, M. Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by fourier transform raman spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 12, p. 4654-4659, 2005.

STATSOFT. **STATISTICA for Windows**: computer program manual. Versão 6.0. Tulsa: Software Inc., 2001.

URGERT, R.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUIL, T. G.; VAN DE BOVENKAMP, P.; HOVENIER, R.; KATAN, M. B. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 8, p. 2167-2172, 1995.

VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 95-108, 2006.

CAPÍTULO 5

**CAVEOL E CAFESTOL EM TECIDOS DO CAFEEIRO,
TECIDOS DE FRUTOS E EM CAFÉ TORRADO**

5. CAVEOL E CAFESTOL EM TECIDOS DO CAFEIRO, TECIDOS DE FRUTOS E EM CAFÉ TORRADO

5.1 RESUMO

Cafestol e caveol são os dois principais diterpenos presentes nos tecidos de cafeeiro e grãos de café. Apesar da importância dos diterpenos para saúde, qualidade de bebida e na discriminação de espécies em café torrado, existe pouca informação sobre seus teores nas diferentes matrizes de café. Para uma avaliação das bases genéticas e moleculares do metabolismo dos diterpenos, é necessário acompanhar os teores em diferentes tecidos do cafeeiro e do fruto fresco, ao longo da maturação. Neste trabalho, a aplicabilidade de uma metodologia por Cromatografia Líquida de Fase Reversa (com detecção no UV e fase móvel acetonitrila:água 55:45) foi verificada para a quantificação de caveol e cafestol em diferentes matrizes de *C. arabica* e *C. canephora*. Avaliaram-se perisperma, endosperma e pericarpo de frutos oriundos de três diferentes árvores ao longo da maturação, também folha, botão floral, raiz e ramo do cafeeiro, além de cafés torrados. Em *C. canephora*, cafestol não ocorreu apenas em folhas e não foi observado caveol. Em *C. arabica*, caveol esteve presente em raiz e ramo, porém ausente em botão floral e pericarpo. Perisperma e endosperma mostraram maiores teores de caveol e cafestol, comparado aos outros tecidos, com alteração ao longo do tempo. Apesar da grande variabilidade entre as árvores, observou-se comportamento semelhante: diminuição de caveol e cafestol em perisperma concomitante ao aumento no endosperma durante a maturação. Amostras de *C. arabica* apresentaram altos teores de caveol e maiores valores de cafestol que *C. canephora*. Cafés torrados comerciais tipo Tradicional continham quantidades de diterpenos intermediárias comparadas às espécies puras, mas as amostras *Gourmet* apresentaram composição similar às de *C. arabica*. Os diterpenos apresentam potencial de discriminação das espécies *C. arabica* e *C. canephora* em cafés torrados.

Palavras-chave: Perisperma. Endosperma. Pericarpo. Maturação. Cafés comerciais.

5.2 INTRODUÇÃO

O café é a segunda maior *commodity* do mundo, atrás somente do petróleo. A planta do café é do gênero *Coffea* e família Rubiaceae. Das mais de 6000 espécies descritas para esta família, as mais importantes comercialmente são *C. arabica* e *C. canephora*, cujos *blends* produzem bebidas com diferentes composições e características sensoriais (CONAB, 2009; FRANK; ZEHENTBAUER; HOFMANN, 2006; URGERT et al., 1995). A bebida do café, uma das mais consumidas do mundo, compreende uma combinação de diversos compostos químicos que ocorrem naturalmente ou são induzidos pelos processos industriais, principalmente a torra (SCHOLZ, 2008; AGUIAR, 2005; FRANK; ZEHENTBAUER; HOFMANN, 2006; FERNANDES et al., 2001; TRUGO; MOREIRA; DE MARIA, 1999 e 2000).

A avaliação de compostos relevantes para a saúde dos consumidores e qualidade da bebida vem se tornando cada vez mais importante, o que demanda o desenvolvimento de metodologias de análise eficientes, versáteis e rápidas. Entre os compostos bioativos, têm sido bastante estudados os diterpênicos de estrutura pentacíclica de caurano, caveol e cafestol, com comprovada atividade hipercolesterolêmica, além de efeitos positivos, como ação anticarcinogênica, antioxidante (NKONDJOCK, 2009; KIM; HWANG; JEONG, 2009; HIGGINS et al., 2008; TAO et al., 2008; LEE; CHOI; JEONG, 2007; HIGDON; FREI, 2006; CAVIN et al., 2002) e cosmética (GROLLIER; PLENSIS, 1998).

Alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos em relação às vias de produção de diterpenos na planta e grão de café, indicando uma importante variabilidade da expressão, estabilidade, atividade e localização das enzimas envolvidas na síntese de cafestol. O conhecimento da bioquímica e genética envolvidas na via metabólica de diterpenos em outras espécies sugere que a presença exclusiva de cafestol e caveol no gênero *Coffea* é ligada à ação de algumas enzimas específicas capazes de reconhecer e modificar o grupo caurano, produzindo cafestol e compostos relacionados, como 16-O-metilcafestol e caveol (TRAPP; CROTEAU, 2001; BOHLMANN; MEYER-GAUEN; CROTEAU, 1998; ROOS et al., 1997). Contudo, tanto estas enzimas quanto seus mecanismos de ação são desconhecidos até o momento. Para a identificação e caracterização dos genes envolvidos no metabolismo de diterpenos, é necessário o emprego de metodologia que permita a quantificação de caveol e cafestol em diferentes tecidos da planta e dos frutos, o que

permitiria o monitoramento dos teores de diterpenos ao longo do processo de amadurecimento do café.

Outra importante contribuição da avaliação do teor de diterpenos é relativa a identificação de espécies em cafés torrados comerciais. Produtos torrados são usualmente *blends* das espécies, uma vez que o café conilon é um produto atraente para a adição ao arábica, podendo ser utilizado para padronização de sabor e diminuição dos custos (SOUZA et al., 2004; BRAGANÇA et al., 2001; CARVALHO et al., 2001; MENDES, 1999). Além de outros atributos de qualidade, cafés torrados e moídos comerciais podem ser classificados pelo teor de conilon nos *blends*, como Tradicional (limite até 30 % de conilon), Superior (até 15 %) e *Gourmet* (constituído unicamente de arábica) (ABIC, 2009; BRASIL, 2008; SÃO PAULO, 2007), mas não há metodologia oficial para essa avaliação. Entre os constituintes do café, muitos já foram citados como potenciais discriminadores de espécies, como os compostos hidrossolúveis cafeína, trigonelina, 5-ACQ e ácido nicotínico (DIAS, 2005; ALVES, 2004; CAMPA et al., 2004; CASAL et al., 2000; MARTÍN; PABLOS; GONZÁLEZ, 1998; BICCHI et al., 1995), e os lipossolúveis, caveol e cafestol (CAMPANHA, 2008; RUBAYIZA; MEURENS, 2005; KURZROCK; SPEER, 2001a, 2001b; URGERT et al., 1995; FREGA; BOCCI; LERCKER, 1994). No entanto, vários desses compostos apresentam instabilidade ao processo de torra e/ou são afetados pelo teor de defeitos denominados preto, verde e ardidos para os grãos de café (PVA). Considerando-se a relativa estabilidade dos diterpenos e sua pouca dependência da presença de grãos PVA (DIAS et al., 2009a; CAMPANHA, 2008), caveol e cafestol destacam-se como potenciais indicadores das espécies presentes no produto comercial para informação ao consumidor.

Uma técnica de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi desenvolvida e validada para quantificação de caveol e cafestol em café torrado e tecidos (DIAS et al., 2009b). Este trabalho verificou a versatilidade e a aplicabilidade do método por CLAE na análise de tecidos do cafeeiro (raiz, ramo, botão floral e folhas), dos frutos frescos (endosperma, perisperma e pericarpo) e cafés torrados e moídos. Foi feito o acompanhamento dos teores de cafestol e caveol durante a maturação dos frutos de *C. arabica* e *C. canephora* e estudou-se a possibilidade de utilização de cafestol e caveol como discriminadores de espécies, avaliando-se amostras torradas de espécies conhecidas e cafés comerciais.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Amostras

Foram analisados tecidos do cafeeiro e de frutos frescos e café torrado. Todas as análises foram feitas em duplicata.

Perisperma, endosperma e pericarpo de frutos das espécies *C. arabica* cv. Iapar-59 e *C. canephora* cv. Apoatã, além de folhas, botão floral, raiz e ramo do cafeeiro de *C. arabica* cv. Iapar-59, foram avaliados. As amostras de tecidos foram fornecidas pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR).

As amostras de raiz e ramo foram coletadas de mudas e da planta adulta, respectivamente. Botão floral foi avaliado em dois períodos, com o intervalo de 15 dias. As folhas, coletadas da planta adulta por três vezes em 14 meses, foram avaliadas considerando-se este tempo de permanência no cafeeiro adulto.

Para o estudo da cinética do comportamento desses diterpenos nos frutos frescos, foi feito o acompanhamento coletando-se amostras entre a florada e completa maturação, a cada quatro semanas, com até oito avaliações durante esse período; para cada tempo foi feita avaliação de três árvores. Os tempos de maturação dos frutos, medidos em dias após a florada (DAF), foram de 67 a 320 DAF para perisperma, 93 a 370 DAF para endosperma e 67 a 370 DAF para pericarpo, de acordo com a disponibilidade do tecido no fruto e a viabilidade de separação, variando também com a espécie estudada.

Os frutos e os demais tecidos do cafeeiro foram acondicionados em tubos de plástico com tampa, imediatamente congelados em nitrogênio líquido, para evitar a oxidação, e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de serem analisados. Após a separação dos tecidos, cada amostra foi macerada, com auxílio de pistilo e almofariz, sempre na presença de N_2 . As amostras foram pesadas em tubos de ensaio, tomando-se o cuidado para evitar a elevação da temperatura (evaporação completa do N_2), como descrito por DIAS et al. (2009b).

Para o estudo com os cafés torrados, seis amostras da espécie *Coffea canephora* e seis de *C. arabica*, de diferentes procedências, foram exploradas. As amostras procedentes de cultivares conhecidos (Iapar-59, Catuaí e Mundo Novo para *C. arabica*, e Apoatã para *C. canephora*) foram fornecidas pelo IAPAR, e misturas de cultivares utilizadas usualmente na indústria foram fornecidas pela

Companhia Iguaçu de Café Solúvel. Avaliaram-se ainda seis amostras comerciais de marcas distintas: três com denominação *Tradicional* e três *Gourmet*. As amostras foram caracterizadas quanto ao grau de torra pelos parâmetros de cor luminosidade, L^* e tonalidade cromática, H^* ($\arctg b^*/a^*$, onde b^* é o componente amarelo-azul e a^* , o componente vermelho-verde) avaliados em colorímetro Color-guide (BYK-Gardner, EUA) (Tabela 5.2).

5.3.2 Extração e quantificação de caveol e cafestol

A análise foi realizada utilizando como condição cromatográfica coluna Spherisorb ODS-1, fase móvel acetonitrila/ H_2O (55:45 v/v) e detecção no UV (230 nm para cafestol e 290 nm para caveol). Para extração, empregou-se saponificação direta a quente (80 °C, 1 h) com solução etanólica (Merck, Darmstadt, Alemanha) de KOH 2,5 mol.L⁻¹ (Synth, Diadema, Brasil) com posterior separação da fração insaponificável utilizando-se terc-butil metil éter (Vetec, de grau analítico – Duque de Caxias, Brasil) e limpeza com água purificada (sistema de purificação Milli-Q®, Millipore, Billencia, EUA). O extrato etéreo foi ressuspensionado na fase móvel, seguido de diluição, filtração em membrana de nylon 0,45 µm (Millipore) e injeção no cromatógrafo (DIAS et al., 2009b).

Empregou-se um cromatógrafo a líquido Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com sistema quaternário de bombeamento de solvente (modelo LC10 ATvp), degaseificador DGU-14 Avp, forno para coluna modelo CTO-10 ASvp, válvula injetora Rheodyne (“loop” de 20 µL) e detector espectrofotométrico UV-Visível de arranjo de diodos modelo SPD-M10 Avp (varredura de 190 a 800 nm). Acetonitrila (Carlo Erba, Duque de Caxias, Brasil) e água purificada (sistema de purificação Milli-Q®, Millipore, Billencia, EUA) foram filtradas em sistema Millipore de filtração a vácuo em membranas de nylon e celulose de 0,45 µm.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível a quantificação de caveol e cafestol em diferentes amostras do cafeeiro, incluindo tecidos dos frutos, e cafés torrados.

5.4.1 Maturação e o teor dos diterpenos nos tecidos de frutos frescos e folhas

O cafestol mostrou maior ocorrência nas amostras avaliadas, estando ausente apenas em folhas de *C. canephora*. A quantidade deste diterpeno em folhas de *C. arabica* foi a mais baixa dentre as amostras onde foi detectado, próximo a $45,0 \pm 2,0$ mg/100 g, sem variação com o tempo de coleta, concordando assim com o único relato para este tecido (KÖLLING-SPEER; SPEER, 1997). O cafestol também esteve presente, em baixos teores, em ramo ($113,4 \pm 0,8$ mg/100 g) e raiz ($134,3 \pm 0,3$), de *C. arabica*. Na literatura não foram encontrados relatos de estudos para tecidos do cafeeiro.

Não se detectou caveol em botão floral. Na amostra menos desenvolvida deste tecido, a quantidade de cafestol ($299,1 \pm 5,0$ mg/100 g) foi maior que na amostra mais desenvolvida (com 15 dias a mais de permanência na planta) ($117,0 \pm 2,7$ mg/100 g).

O teor de caveol em raiz ($361,5 \pm 2,5$ mg/100 g) foi duas vezes e meia maior que em ramo ($143,4 \pm 0,9$ mg/100 g), mas observaram-se valores próximos para cafestol ($134,4 \pm 0,3$ mg/100 g de raiz e $113,4 \pm 0,8$ mg/100 g de ramo)

Essas observações indicaram que existe uma distribuição de caveol e cafestol ao longo da planta, desde a raiz até as sementes de *C. arabica*, mostrando que o estudo dos tecidos do cafeeiro, considerando-se o tempo de desenvolvimento da planta, é essencial para a elucidação de enzimas e vias metabólicas de produção/degradação dos diterpenos na planta e frutos.

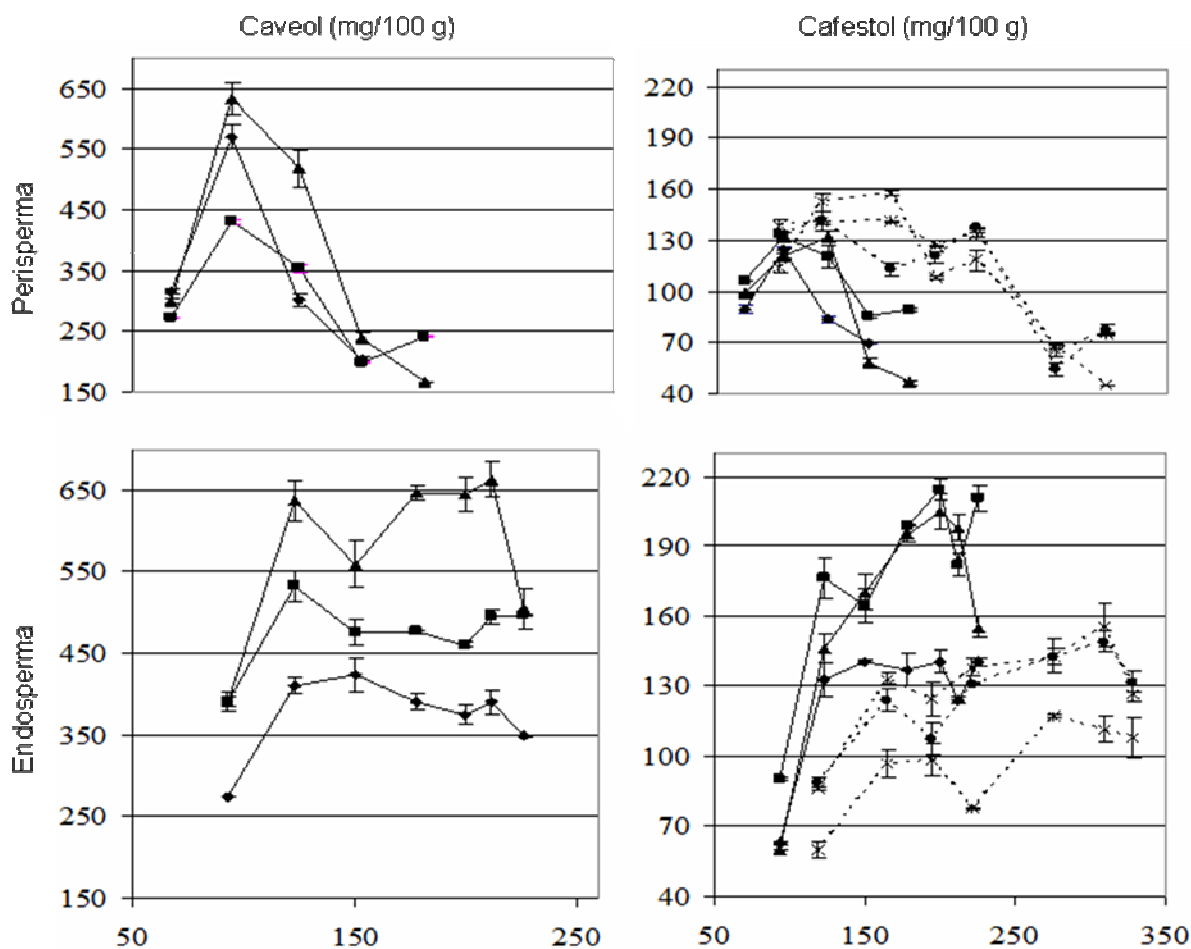


Figura 5.1 – Evolução dos teores de caveol e cafestol durante o desenvolvimento dos frutos (dias após a florada, DAF, no eixo x) em endosperma e perisperma de *C. arabica* (–) e *C. canephora* (---) (cada linha corresponde a uma planta, no total de 3). Concentrações em mg de diterpeno por 100 g do tecido.

O caveol não esteve presente em pericarpo e em nenhuma amostra de tecido de *C. canephora*. Cafestol foi observado em pericarpo em concentração inferior às dos outros tecidos de frutos frescos, entre $45,2 \pm 1,7$ a $54,4 \pm 1,7$ mg/100 g de pericarpo. Além disso, não se observou alteração significativa com o tempo, assim, o estudo da cinética no fruto foi concentrado nos tecidos endosperma e perisperma.

No perisperma e no endosperma, verificaram-se concentrações de caveol e cafestol mais elevadas, com alteração dos teores com o tempo após florada (Figura 5.1 e Tabela 5.1). Para *Coffea canephora*, que exige maior tempo (DAF) para maturação (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006), o acompanhamento foi feito por período maior.

Apesar das diferenças nos valores absolutos de concentração, o comportamento dos diterpenos foi semelhante para as três árvores.

Para caveol, a concentração aumentou em perisperma de *C. arabica* entre 67 e 93 DAF. Após este máximo (de 430 a 630 mg/100 g, considerando as três árvores), constatou-se um decréscimo de caveol no perisperma, e um aumento concomitante no endosperma foi observado, com a tendência de estabilização da concentração neste tecido. A última amostra avaliada, de 226 DAF, apresentou de 350 a 500 mg de caveol/100 g de endosperma, dependendo da árvore analisada (Figura 5.1 e Tabela 5.1).

Um comportamento semelhante foi observado para cafestol comparando-se as duas espécies de café. Um rápido aumento, entre 67 e 93 DAF para *C. arabica* e 123 DAF para *C. canephora*, seguido de um gradual decréscimo do cafestol no perisperma acompanhado por acumulação no endosperma foi verificado. Os valores máximos de concentração, obtidos até 150 DAF, foram de aproximadamente 135 e 150 mg de cafestol/100 g de perisperma de *C. arabica* e *C. canephora*, respectivamente. No endosperma, o valor máximo obtido para cafestol (~ 220 mg/100 g) foi para *C. arabica* a 200 DAF, e o menor teor, considerando amostras mais maduras (acima de 250 DAF), foi para *C. canephora* (~ 110 mg/100 g) (Figura 5.1 e Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Comportamento dos teores de caveol e cafestol em tecidos dos frutos frescos durante a maturação do fruto do café.

Amostra	Espécie ^a	Caveol		Cafestol	
		Elevação ^b	Diminuição ^c	Elevação ^b	Diminuição ^c
Perisperma	A	22-95 % (67-93 DAF)	25-75 % (93-178 DAF)	30-68 % (67-93 DAF)	35-65 % (93-178 DAF)
	C	nd ^d	nd	65-75 % (67-123 DAF)	55-65 % (123-320 DAF)
Endosperma	A	55-60 % (93-123 DAF)	Pouca variação após 123 ^o DAF	133 % (93-200 DAF)	5-25 % (200-226 DAF)
	C	nd	nd	65-90 % (123-270 DAF)	10 % (270-330 DAF)

^a Espécies *Coffea arabica* (A) e *C. canephora* (C).

^{b,c} Faixa de porcentagem de aumento^b ou diminuição^c do teor de diterpeno, considerando as 3 árvores, com o período em que foi verificado (em dias após a florada – DAF).

^d Não detectado.

Na comparação entre os cafeeiros, em cada tecido, apesar dos teores de cafestol terem sido menores que os de caveol, a variação foi semelhante, com máximo de 40 % de diferença entre as três árvores em mesmo período após a florada (Figura 5.1). É possível atribuir esta variabilidade à dificuldade em se precisar o tempo de maturação, considerando os diferentes tecidos e espécies de café. Porém, observou-se que existe um comportamento estabelecido, que consiste na manutenção do teor de cafestol em pericarpo e diminuição da concentração dos diterpenos em perisperma concomitante ao aumento no endosperma conforme a maturação. Este fato concorda com o relato de De Castro et al. (2002), que citaram a interconversão de perisperma em endosperma conforme a maturação do fruto. Foi verificado que o fruto pouco maduro contém em seu interior (abaixo do pericarpo) grande proporção de perisperma, e muito pouco do endosperma. No fruto considerado maduro, entre a 210 e 245 DAF, apenas uma fina camada de perisperma está presente no interstício do endosperma, que compõe a maior parte do fruto fresco.

Os períodos em que ocorreu a síntese de diterpenos no perisperma e endosperma dos frutos corresponderam àqueles relatados para síntese de outros componentes já descritos na literatura, como proteínas de reserva e polissacarídeos complexos (MARRACCINI et al., 2005; REDGWELL et al., 2003).

5.4.2 Teores de diterpenos em grãos de cafés torrados e moídos e seu potencial como discriminadores de espécies.

Considerando a possibilidade de utilização dos teores de caveol e cafestol como ferramenta de discriminação, analisaram-se os cafés das espécies *C. arabica* e *C. canephora* (de procedências e cultivares variados) e cafés comerciais de diferentes categorias (Tradicional e *Gourmet*) (Tabela 5.2).

A intensidade de torra pode ser monitorada pelos parâmetros de cor. Baseado em resultados de trabalhos anteriores (DIAS et al., 2009a; CAMPANHA, 2008, DIAS, 2005), os valores de L^* , na faixa de 16 a 30, e de H^* , variando de 50 a 60, caracterizaram torras de média (C5, C6, G1) a escura (A1 a A6; C1 a C4, T1 a T3, G2 e G3) (Tabela 5.2), na faixa dos valores usuais de cafés comerciais de mercado (NICOLAU-SOUZA et al., 2009).

Tabela 5.2 – Caracterização, por parâmetros de cor, e teores^a de caveol e cafestol das amostras de grãos de café torrados.

		Cultivar/ categoria ^b	Fornecedor ^c	L*	H*	Caveol	Cafestol
<i>Coffea arabica</i>	A1	IAPAR 59	IAPAR	20,8±0,1	55,4±0,4	933,0±25,0	275,0±14,8
	A2	Catuaí	IAPAR	18,8±0,6	53,7±0,3	893,5±24,1	321,9± 6,5
	A3	Mundo Novo	IAPAR	19,1±0,7	58,6±1,2	821,0±17,1	475,6±19,7
	A4	NI	Cia Iguaçu	20,1±0,1	58,7±0,3	744,0±8,0	398,5±46,4
	A5	NI	Cia Iguaçu	16,6±1,0	50,0±0,8	661,0±22,3	360,5±5,9
	A6	NI	Cia Iguaçu	22,9±1,2	55,0±0,7	644,9±181,5	452,4±84,6
<i>C. canephora</i>	C1	Apoatã	IAPAR	20,4±0,1	58,9±0,5	nd	211,1±8,0
	C2	Apoatã	IAPAR	16,3±0,7	55,2±2,0	nd	188,1±6,4
	C3	Apoatã	IAPAR	18,8±1,3	57,3±0,4	nd	254,9±7,6
	C4	NI	Cia Iguaçu	19,9±0,1	57,7±3,1	nd	241,9±5,7
	C5	NI	Cia Iguaçu	21,7±0,3	62,1±1,1	nd	235,0±31,4
	C6	NI	Cia Iguaçu	30,3±0,7	60,2±0,2	nd	325,4±12,4
Comerciais	T1	Tradicional	Mercado	18,2±1,3	54,3±0,4	388,2±0,9	385,0±1,3
	T2	Tradicional	Mercado	17,6±0,7	54,2±0,3	398,9 ± 1,2	422,5±2,4
	T3	Tradicional	Mercado	19,1±0,7	58,6±1,2	480,6 ± 2,4	448,9±2,2
	G1	<i>Gourmet</i>	Mercado	23,9±0,2	60,6±1,3	756,9±34,1	459,8±21,4
	G2	<i>Gourmet</i>	Mercado	21,3±2,0	57,1±0,8	690,6±36,5	432,6±17,0
	G3	<i>Gourmet</i>	Mercado	16,4±1,9	51,7±0,5	789,4±20,2	453,1±10,0

^aMédia (mg/100 g) de duas repetições ± desvio padrão, resultado expresso em b.s.; nd = não detectado.

^bNI: misturas de cultivares de espécies puras, especificações *não informadas* pela empresa.

^cFornecedores: Companhia Iguaçu de Café Solúvel (Cornélio Procópio – PR) e Instituto Agrônômico do Paraná (Londrina – PR).

Da mesma forma que o constatado para os tecidos, as amostras de *C. canephora* não apresentaram quantidade detectável de caveol e mostraram valores consideráveis de cafestol (de 200 a 320 mg/100 g), porém, de um modo geral, menores que os resultados para *C. arabica* (270 a 480 mg de cafestol/100 g). Caveol mostrou maiores valores, de 650 a 950 mg/100 g de *C. arabica*, onde o maior resultado foi obtido para a cv. Iapar-59.

No geral, observou-se conformidade com os valores descritos na literatura, principalmente quanto à concentração de cafestol, para o qual são relatados teores

entre 76 e 300 mg/100 g de café conilon e 100 a 700 mg/100 g de café arábica (RUBAYIZA; MEURENS, 2005; KURZROCK; SPEER, 2001a; FREGA; BOCCI; LERCKER, 1994).

No entanto, cabe destacar pontos de divergência com relação ao caveol. Alguns trabalhos já mencionaram a ausência de caveol em *C. canephora* (DIAS, 2005; NACKUNSTZ; MAIER, 1987), mas outros autores relataram ter encontrado teores inferiores a 13 mg/100 g de café (FREGA; BOCCI; LERCKER, 1994) ou apenas traços (KURZROCK; SPEER, 2001a; RUBAYIZA; MEURENS, 2005). Esse comportamento não encontra respaldo nos resultados do presente trabalho, uma vez que em nenhuma matriz de *C. canephora*, desde os tecidos da planta até as amostras de café torrado de diferentes procedências, detectou-se a presença do composto.

Foram descritos para *C. arabica* teores de caveol em uma ampla faixa, desde 100 até 736 mg /100 g (RUBAYIZA; MEURENS, 2005; KURZROCK; SPEER, 2001a; LAGO, 2001; URGERT et al., 1995; FREGA; BOCCI; LERCKER, 1994), valores no geral inferiores ao observado no presente trabalho. Uma parte dessas diferenças poderia ser atribuída a variabilidade da matéria-prima com relação a origem geográfica e cultivares (KURZROCK; SPEER, 2001a; FREGA; BOCCI; LERCKER, 1994), visto que se verificou que o grau de torra tem pouca influência sobre o teor de caveol (DIAS et al., 2009a). No entanto, é mais provável que as diferenças sejam devidas a diversidade dos procedimentos empregados na quantificação dos diterpenos, uma vez que as maiores diferenças foram observadas para o caveol, que é mais sensível a oxidação no processo de extração (DIAS et al., 2009b). O emprego de extração preliminar para posterior saponificação relatado em diversos trabalhos (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006; RUBAYIZA; MEURENS, 2005) pode ocasionar perdas dos diterpenos na quantificação (DIAS et al., 2009c).

Considerando-se a diferença de composição observada entre espécies, a adição de café conilon ao arábica deveria diminuir a quantidade de diterpenos, tendência mais evidente para o caveol. Essa análise coincide com o que foi verificado para amostras comerciais de denominação *Tradicional*, que podem ser constituídas de até 30 % de *C. canephora*. Estas amostras apresentaram uma quantidade intermediária para caveol e similar para cafestol, comparada às espécies puras. Já para produtos *Gourmet*, que tem obrigatoriedade de empregar apenas

cafés arábica, observou-se similaridade com as amostras de *C. arabica* estudadas (Tabela 5.2, Figura 5.2).

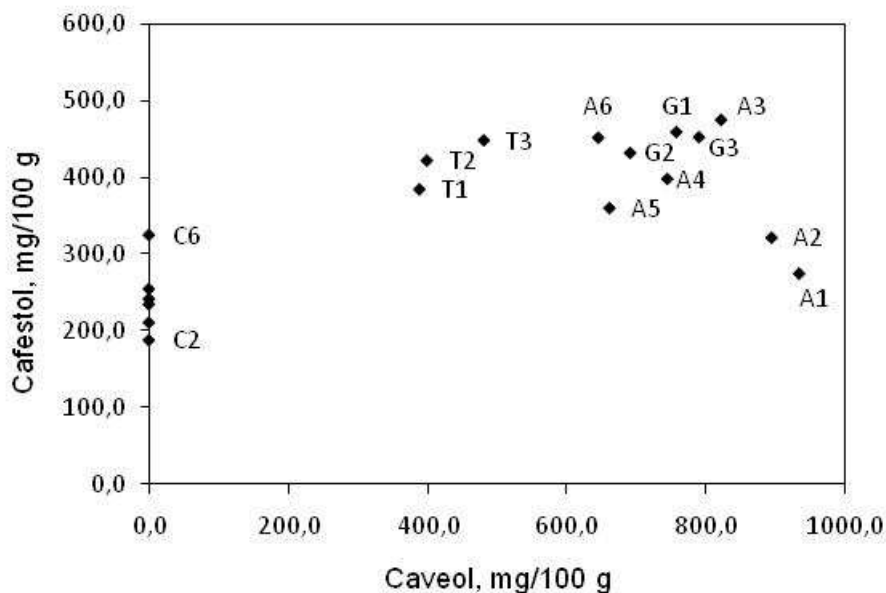


Figura 5.2 – Relação dos teores dos diterpenos para café torrado: C – *C. canephora*, A – *C. arabica*, T – Comercial Tradicional, G – Comercial *Gourmet* (Tabela 5.2).

Na Figura 5.2, onde a relação dos teores de caveol e cafestol pode ser melhor visualizada, é mostrado que os diterpenos apresentam um grande potencial de discriminação das espécies *C. arabica* e *C. canephora* em cafés torrados, considerando torras que seriam mais usuais para os produtos comerciais.

5.5 CONCLUSÕES

A metodologia por CLAE mostrou ampla aplicação, permitindo a quantificação de caveol e cafestol nas diferentes matrizes estudadas. Caveol esteve ausente em botão floral e pericarpo de *Coffea arabica* e em todos os tecidos de *C. canephora* avaliados. Cafestol estava distribuído mais amplamente, não ocorrendo apenas em folhas de *C. canephora*. Perisperma e endosperma mostraram maiores teores de diterpenos comparado aos outros tecidos; observou-se diminuição de caveol e cafestol em perisperma concomitante ao aumento no endosperma durante a maturação nas duas espécies estudadas. Amostras de *C. arabica* mostraram altos teores de caveol e maiores valores de cafestol que *C. canephora*. Os diterpenos

apresentam um grande potencial de discriminação das espécies *C. arabica* e *C. canephora* em cafés torrados.

5.6 COLABORADORES

Fernanda Gonçalves Campanha, Romilaine Mansano Nicolau-Souza

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina

Luiz Gonzaga Esteves Vieira, Lucia Pires Ferreira

Instituto Agrônômico do Paraná, CP 481, 86001-970, Londrina-PR

David Pot, Pierre Marraccini

Cirad, UMR 96 DAP, Avenue d'Agropolis, F-34398 Montpellier Cedex 5, France

5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 03 jul. 2009.

AGUIAR, A. T. E. **Atributos químicos de espécies de café**. 2005. Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ALVES, S. T. **Desenvolvimento de metodologia analítica para diferenciação de café torrado arábica (*Coffea arabica*) e conilon (*Coffea canephora*) e misturas**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

BICCHI, C. P.; BINELLO, A. E.; PELLEGRINO, G. M.; VIANNI, A. C. Characterization of green and roasted coffees through the chlorogenic acid fraction by HPLC-UV and principal component analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, n. 6, p. 1549-1555, 1995.

BOHLMANN, J.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, Washington, v. 95, n. 8, p. 4126-4133, 1998.

BRAGANÇA, S. M.; CARVALHO, C. H. S.; FONSECA, A. F. A.; FERRÃO, R. G. Variedades clonais de café conilon para o estado do Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 765-770, 2001.

BRASIL. Portaria nº 49, de 19 de março de 2008. Submete à consulta pública o Projeto de Instrução Normativa, do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento, que aprovará o “Regulamento Técnico de Identidade e de Qualidade do Café Torrado em Grão e do Café Torrado e Moído”. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 6, 25 mar. 2008. Seção 1. Disponível em:

<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18524>>. Acesso em: 03 jul. 2009.

CAMPA, C.; BALLESTER, J. F.; DOULBEAU, S.; DUSSERT, S.; HAMON, S.; NAIROT, M. Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. **Food Chemistry**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 39-43, 2004.

CAMPANHA, F. G. **Desenvolvimento de metodologia analítica para diferenciação de café torrado arábica (*Coffea arabica*) e conilon (*Coffea canephora*) e misturas**. 2008. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CARVALHO, L. M.; SILVA, E. A. M.; AZEVEDO, A. A.; MOSQUIM, P. R.; CECON, P. R. Aspectos morfofisiológicos dos cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-416, 2001.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café: safra 2009, primeira estimativa**. Brasília: CONAB, 2009. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1_levantamento_2009.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2009.

CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; ALVES, M. R.; FERREIRA, M. A. Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3420-3424, 2000.

CAVIN, C.; HOLZHÄUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W. W.; SCHILTER, B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 8, p.1155-1163, 2002.

DE CASTRO, R. D.; ESTANISLAU, W. T.; MESQUITA, P. R.; PUPIM, T. L.; TIMÓTEO, T. S. Modelo Funcional de Desenvolvimento de Sementes de Cafeeiro (*Coffea arabica*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 28, 2002, Caxambu, **Resumos...**, Caxambu.

DE CASTRO, R. D.; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 175-199, 2006.

DIAS, R. C. E. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) em diferentes graus de torra**. 2005. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

DIAS, R. C. E; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.; BRAGAGNOLO, N.; BENASSI, M. T. Influência da torra sobre o perfil de diterpenos de café torrado. **Química Nova**, São Paulo, 2009a (a ser enviado).

DIAS, R. C. E; CAMPANHA, F. G.; BENASSI, M. T.; VIEIRA, L. G. E.; FERREIRA, L. P.; POT, D.; MARRACCINI, P. Metodologia para avaliação de caveol e cafestol em folhas e tecidos de frutos de cafeeiro e em café torrado. **Química Nova**, São Paulo, 2009b (a ser enviado).

DIAS, R. C. E; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.; BRAGAGNOLO, N.; BENASSI, M. T. Influência do método de preparo de amostra para avaliação de caveol e cafestol em café torrado. **Química Nova**, São Paulo, 2009c (a ser enviado).

FERNANDES, S. M.; PEREIRA, R. G. F. A.; THÉ, P. M. P.; PINTO, N. A. V. D.; CARVALHO, V. D. Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 3, p.197-199, 2001.

FRANK, O.; ZEHENTBAUER, G.; HOFMANN, T. Bioresponse-guided decomposition of roast coffee beverage and identification of key bitter taste compounds. **European Food Research Technology**, Heidelberg, v. 222, n. 5/6, p. 492–508, 2006.

FREGA, N.; BOCCI, F.; LERCKER, G. High resolution gas chromatographic method for determination of robusta coffee in commercial blends. **Journal of High Resolution Chromatography**, Weinheim, v. 17, n. 5, p. 303-307, 1994.

GROLLIER, J. F; PLESSIS, S. (1998) Use of coffee bean oil as a sun filter. US Patent 4,793,990.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 46, n. 2, p. 101-123, 2006.

HIGGINS, L. G.; CAVIN, C.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; HAYES, J. D. Induction of cancer chemopreventive enzymes by coffee is mediated by transcription factor Nrf2. Evidence that the coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol confer protection against acrolein. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 226, n. 3, p. 328-337, 2008.

KEMSLEY, E. K.; RUAULT, S.; WILSON R.H. Discrimination between *Coffea arabica* and *Coffea canephora* variant robusta beans using infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 321-326, 1995.

KIM, H. G.; HWANG, Y. P.; JEONG, H. G. Kahweol blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 187, n. 1, p. 28–34, 2009

KÖLLING-SPEER, I.; SPEER, K. Diterpenes in coffee leaves. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE (ASIC), 17. 1997, Paris, **Proceedings...** Paris. p. 150.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Diterpenes and diterpene esters in coffee. **Food Reviews International**, New York, v. 17, n. 4, p. 433-450, 2001a.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Identification of kahweol fatty acid esters in arabica coffee by means of LC/MS. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v.24, n. 10-11, p.843-848, 2001b.

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

LEE, K. J.; CHOI, J. H.; JEONG, H. G. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 11, p. 2118-2125, 2007.

MARTÍN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. **Talanta**, Amsterdam, v. 46, n. 6, p. 1259-1264, 1998.

MARRACCINI, P.; GEROMEL, C.; FERREIRA, L. P.; PEREIRA, L. F. P.; LEROY, T.; POT, D.; RIBEYRE, F.; GUYOT, B.; SCHOLZ, M. B. S.; ANDROCIOLI-FILHO, A.; VIEIRA, L. G.; MAZZAFERA, P. Soluble sugars, enzymatic activities and gene expression during development of coffee fruit submitted to shade condition. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 21, 2006, Montpellier. **Proceedings...**, Montpellier.

MENDES, L. C. **Otimização do processo de torração do café robusta (*Coffea canephora conillon*) para formulação de blends com café arábica (*Coffea arabica*)**. 1999. 101 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NACKUNSTZ, B.; MAIER, H. G. Diterpenoide im kaffee. III. Cafestol und kahweol. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung**, Berlin, v. 184, n. 6, p. 494-499, 1987.

NKONDJOCK, A. Coffee consumption and the risk of cancer: An overview. **Cancer Letters**, Oxford, v. 277, n. 2, p. 121–125, 2009.

NICOLAU-SOUZA, R. M.; CANUTO, G. A. B.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. **Química Nova**, 2009 (em análise).

REDGWELL, R. J.; VÉRONIQUE, T.; CURTI, D.; FISHER, M. Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arabica coffee beans. **Carbohydrate Research**, London, v. 337, n. 5, p.421-431, 2002.

ROOS, B.; VAN DER WEG, G.; URGERT, R.; VAN DE BOVENKAMP, P.; CHARRIER, A.; KATAN, M. B. Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 45, n. 8, p. 3065-3069, 1997.

RUBAYIZA, A. B.; MEURENS, M. Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by Fourier Transform Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 53, n. 12, p. 4654-4659, 2005.

SÃO PAULO. Resolução SAA (Secretaria de Agricultura e Abastecimento) nº 28, de 1 de junho de 2007. Define norma técnica para fixação de identidade e qualidade de café torrado em grão e café torrado moído. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, v. 117, n. 105, p. 27, 5 jun. 2007. Seção 1. Disponível em: <http://www.abic.com.br/serv_legislacao.html>. Acesso em: 03 jul. 2009.

SCHOLZ, M. B. S. **Tipologia dos cafés paranaense: uma abordagem através da análise fatorial múltipla dos aspectos físico-químicos e sensoriais**. 2008. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SONDAHL, M. R.; BAUMANN, T. W. Agronomy II: Developmental and Cell Biology. In: CLARKE R. J.; VITZTHUM O. G. (Eds). **Coffee: recent developments**. Blackwell Science, Oxford, p. 202-220, 2001.

SOUZA, V. F.; MODESTA, R. C. D.; GONÇALVES, E. B.; FERREIRA, J. C. S.; MATOS, P. B. Influência dos fatores demográfico e geográfico na preferência da bebida de café no estado do Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2004.

TAO, K.; WANG, W.; WANG, L.; CAO, D.; LI, Y.; WU, S.; DOU, K. The multifaceted mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on liver. **Medical Hypotheses**, Kidlington, v. 71, n. 5, p 730-736, 2008.

TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. B. , L. C. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics**, Pittsburgh, v. 158, n. 2, p. 811-832, 2001.

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.

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.

URGERT, R.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUIL, T. G.; VAN DE BOVENKAMP, P.; HOVENIER, R.; KATAN, M.B. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 43, n. 8, p. 2167-2172, 1995.

CAPÍTULO 6

INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO NA ANÁLISE DE CAVEOL E CAFESTOL EM GRÃOS DE CAFÉ TORRADO

6. INFLUÊNCIA DO MÉTODO DA EXTRAÇÃO NA ANÁLISE DE CAVEOL E CAFESTOL EM GRÃOS DE CAFÉ TORRADO

6.1 RESUMO

Considerando a sensibilidade a oxidação dos diterpenos, o método de extração empregado pode interferir nos teores de caveol e cafestol quantificados em café torrado. A técnica de saponificação direta a quente (SDQ) foi comparada com a saponificação direta a frio (SDF) e com separação da fração lipídica, por Bligh Dyer (BD) e Soxhlet (SO) para posterior saponificação. Os teores de caveol e cafestol e de seus derivados dehidro, obtidos por CLAE-DAD-EM/EM, bem como o perfil cromatográfico de um café (*Coffea arabica*) de grau de torra escuro foram comparados pelas quatro técnicas. Considerando os diterpenos identificados principalmente por fragmentos de m/z característicos, de um modo geral, o método por SDQ mostrou melhor eficiência na extração, com separação adequada dos picos cromatográficos e teores de 930,2 ($\pm 36,8$), 113,2 ($\pm 4,66$), 568,6 ($\pm 16,6$) e 87,1 ($\pm 3,74$) mg/100 g observados para caveol, dehidrocaveol, cafestol e dehidrocafestol, respectivamente. No método de SDQ obtiveram-se valores de caveol e cafestol em torno de 15 % superiores a SDF, e de 80 a 90 % superior aos métodos com separação da fração lipídica para posterior saponificação (SO, BD). Atribuiu-se o surgimento dos compostos dehidro ao processo de torra e não às condições de extração.

Palavras-chave: Saponificação direta. Soxhlet. Bligh Dyer. Diterpenos. Dehidroditerpenos.

6.2 INTRODUÇÃO

Para determinação de compostos lipídicos da fração insaponificável, existem na literatura diferentes abordagens quanto aos procedimentos de extração adotados. Algumas metodologias descrevem o emprego de extração preliminar dos lipídios como uma primeira etapa, e, posterior, saponificação, enquanto outras propõem a saponificação direta, sem a pré-separação.

Para extração de lipídios, as metodologias variam quanto à extração a quente, ou a frio. O método por Soxhlet (SO) é considerado clássico para extração de lipídios e consiste no uso de um equipamento extrator onde o solvente quente (próximo a sua temperatura de ebulição) passa pela amostra por um tempo prolongado (de 5 a 8 h) (SOXHLET, 1879). Apesar de ser o método oficial da AOAC (AOAC, 1990), existe o problema da degradação de compostos sensíveis a temperatura de operação principalmente pelo longo período em que ficam expostos. Para a metodologia de Bligh Dyer (BD) (BLIGH; DYER, 1959), extração a frio com uma mistura de clorofórmio-metanol, não é exigido equipamento especial e a análise é mais rápida, porém faz-se uso de solventes de alta toxicidade e voláteis. Em BD e SO é possível obter o extrato e a porcentagem de lipídios para posterior análise de compostos de interesse.

A saponificação direta tem sido descrita como uma alternativa rápida e eficiente na extração de compostos insaponificáveis por evitar a formação de artefatos (SALDANHA et al., 2006), sendo também relatados procedimentos a frio (SDF) e a quente (SDQ). Ao estudar as condições de extração da matéria insaponificável para determinação de colesterol, Bandeira et al. (2008) trabalhando com ração para ruminantes, e Mariutti, Nogueira e Bragagnolo (2008), com carne de frango, observaram melhores resultados para saponificação direta da amostra sem aquecimento. Os autores relataram que esse método apresentou um cromatograma com menor número de interferentes e maior área do pico de colesterol, além de ser de fácil execução e utilizar menor quantidade de solvente.

Para a análise de diterpenos do café, são relatados tanto a utilização de extração preliminar de lipídios seguida de saponificação (ARAÚJO; SANDI, 2006; RUBAYIZA; MEURENS, 2005; KÖLLING-SPEER; STROHSCHNEIDER; SPEER, 1999; LERCKER et al., 1995; FREGA; BOCCI; LERCKER, 1994; PETTITT JR., 1987), quanto o emprego de saponificação direta (DIAS, 2005; ALVES, 2004; ROOS et al., 1997; URGERT et al., 1995).

Em trabalhos anteriores, foram desenvolvidas e validadas metodologias para quantificação de diterpenos em café. Para extração, foi empregada saponificação direta com KOH 2,5 mol.L⁻¹ (80 °C, 1 h), extração com terc-butil metil éter e limpeza com água. Essas técnicas foram utilizadas tanto para análise de caveol em café torrado por Espectrofotometria (DIAS; BENASSI, 2009), quanto na determinação de

caveol e cafestol em cafés torrados e tecidos de café por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (DIAS, et al. 2009a) com adequadas precisão e exatidão. Observou-se, no entanto, teores de cafestol e caveol (DIAS et al., 2009b) coincidentes ou superiores aos valores máximos descritos por outros autores (RUBAYIZA; MEURENS, 2005; LAGO, 2001; KURZROCK; SPEER, 2001; URGERT et al., 1995; FREGA et al., 1994). Apesar da variabilidade na matéria-prima, a qual poderia ser atribuída em parte as diferenças encontradas nos teores de diterpenos, destaca-se a diversidade nos métodos de extração empregados. A literatura relata ainda a ocorrência de produtos de degradação dos diterpenos na análise do café torrado (DIAS et al., 2009b; SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006), mas não se sabe se esses componentes poderiam ser atribuídos unicamente ao processo de torra ou seriam artefatos da extração analítica.

O objetivo do trabalho foi avaliar a influência de diferentes métodos de extração na determinação de caveol e cafestol em café torrado por CLAE-DAD-EM/EM. O método padrão (saponificação direta a quente) foi comparado com saponificação a frio, e extração preliminar de lipídios a quente (SO) e a frio (BD) seguida de saponificação comparando-se a eficiência e vantagens de cada procedimento.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 Preparo de amostra

Uma amostra de café da espécie *Coffea arabica* cv. Iapar-59, obtido junto ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), foi torrado (torrador Rod-Bel) com a temperatura variando de 190 a 230°C e tempo suficiente para atingir 20 % de perda de peso, correspondente ao grau de torra escuro. Após os procedimentos de torra e moagem, a uma granulometria de 0,500 mm (peneira ABNT 35), a amostra apresentou umidade de $2,4 \pm 0,1$ g/100 g e valores de $29,0 \pm 0,4$ para luminosidade e $50,1 \pm 2,1$ para a tonalidade cromática. As medidas de cor foram realizadas em triplicata e as de umidade, em duplicata.

Efetuarão-se 5 replicatas genuínas para cada método de preparo de amostra (SDQ, SDF, SO, BD). Os procedimentos foram comparados quanto ao teor de caveol e cafestol e seus derivados dehidro obtidos por CLAE-DAD-EM/EM, bem como o perfil cromatográfico (resolução e separação dos picos) e a aplicabilidade de

cada método, considerando-se a facilidade e rapidez na extração da matéria insaponificável, utilização de menor quantidade de solvente e grau de periculosidade para o analista.

6.3.1.1 Saponificação Direta a Quente (SDQ)

O método por SDQ foi desenvolvido previamente por Alves, Scholz e Benassi (2003) e Dias e Benassi (2009). Foi pesado 0,200 g de café arábica torrado em tubo de vidro. Adicionou-se 2 mL de KOH (Merck; Darmstadt, Germany) $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (em etanol 96 %) para saponificação direta da amostra. Após banho por uma hora a 80°C , fez-se a extração da matéria insaponificável com terc-butil metil éter (Merck; Darmstadt, Germany) e limpeza com água. A amostra diluída foi injetada no equipamento de CLAE para quantificação dos analitos (Figura 6.1).

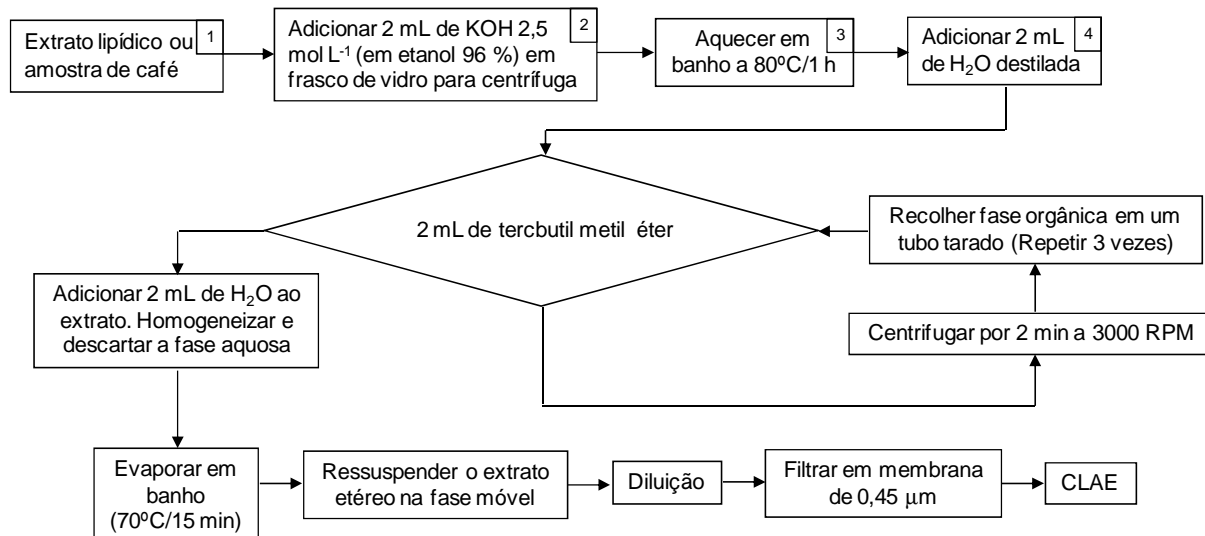


Figura 6.1 – Fluxograma para extração da matéria insaponificável dos extratos lipídicos de café obtidos pelos métodos de Bligh Dyer e Soxhlet ou diretamente da amostra de café torrado por Saponificação Direta a Quente (início na etapa 1) e extração da matéria insaponificável pelo método de Saponificação Direta a Frio (início na etapa 4).

6.3.1.2 Saponificação Direta a Frio (SDF)

O método foi baseado nas condições de extração da SDQ e nos trabalhos desenvolvidos por Bandeira et al. (2008) e Mariutti, Nogueira e Bragagnolo (2008),

que estudaram a extração da matéria insaponificável para determinação de colesterol. Adicionou-se 2 mL de solução de KOH $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (em etanol 96 %) em 0,200 g da amostra de café torrado e moído acondicionada em erlenmeyer (25 mL) devidamente vedado. Fez-se a agitação por 20 h (agitador Orbital, MA-140/CFT) a 168 RPM, com temperatura controlada a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Após a saponificação por este período, conduziu-se o procedimento de extração da matéria insaponificável, seguindo diretamente para a etapa 4 do fluxograma da Figura 6.1.

6.3.1.3 Extração de lipídios a quente por Soxhlet (SO)

O procedimento foi definido como método oficial da AOAC (1990) e foi o sugerido por Kölling-Speer, Strohschneider e Speer (1999), que utilizaram extração lipídica por Soxhlet de café (frutos frescos e torrados) para análise posterior de diterpenos. Foram pesados 5 g de amostra de café torrado em cartucho de extração, que foi colocado em um balão de fundo chato (250 mL) com massa previamente padronizada. A extração foi conduzida em conjunto extrator de Soxhlet por 6 h de refluxo com 150 mL de terc-butil metil éter, com a temperatura mantida na faixa de ebulição do solvente ($55\text{-}60 \text{ }^\circ\text{C}$). Após evaporação do solvente em evaporador rotativo (Büchi R-114), a massa do extrato lipídico foi calculada gravimetricamente. Uma parte do extrato foi direcionada a saponificação com KOH. Para isto, adicionou-se ao balão uma quantidade conhecida de terc-butil metil éter (10 mL), solvente extrator da matéria insaponificável, para obtenção de solução com concentração conhecida. Um mililitro desta solução foi transferido para o tudo de ensaio. O solvente foi evaporado a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min e iniciou-se o processo de saponificação e extração da matéria insaponificável que contém os diterpenos (Figura 6.1).

6.3.1.4 Extração de lipídios por Bligh Dyer (BD)

O método estabelece que, para amostras com umidade diferente de 80 %, é necessária a correção de umidade (Bligh Dyer, 1959). Considerando a umidade da amostra avaliada (2,4 %, item 6.3.1), a proporção utilizada de solventes foi de 10:10:20:8 para amostra:clorofórmio:metanol:água. Desta forma, foi pesado 5 g de amostra de café torrado. Em um erlenmeyer (250 mL) adicionou-se 5 mL de clorofórmio, 10 mL de metanol (ambos da Merck - Darmstadt, Germany) e 4 mL de

água destilada. O frasco tampado foi agitado por 10 min, a 168 RPM, em mesa agitadora (Orbital, MA-140/CFT). Em seguida, adicionou-se mais 5 mL de clorofórmio e 5 mL de sulfato de sódio (Synth, São Paulo) 1,5 % (agente dessecante) com agitação por mais 30 min. A solução foi transferida para um tubo para centrífuga, com a utilização de 5 mL de clorofórmio. Após centrifugação (3 min a 2880 RPM), a fase inferior com clorofórmio e que contém a fração lipídica, foi retirada, filtrada em papel de filtro com 1 g de sulfato de sódio anidro para retirada da umidade residual. O filtrado, coletado em balão volumétrico com peso padronizado, foi concentrado em evaporador rotativo a vácuo (Büchi R-114) até 40 °C e pesado após 24 h em dessecador, calculando-se a quantidade de lipídios em 100 g de amostra. Esse extrato foi destinado ao processo de extração padrão.

Foi necessário transferir do balão uma quantidade conhecida de extrato lipídico para o tubo de ensaio, onde se faz a adição do KOH. Adicionou-se terc-butil metil éter (10 mL) e transferiu-se 1 mL de solução com concentração conhecida para tubo de ensaio, onde o solvente foi evaporado (50 °C por 15 min), e iniciou-se o procedimento de saponificação (Figura 6.1).

6.3.2 Condições cromatográficas

Os teores de caveol e cafestol foram obtidos em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência constituído de conjunto de bombeamento quaternário de solvente (Waters, modelo 600), detector de arranjo de diodos (Waters, modelo 996), injetor Rheodyne (“loop” de 20 µL), degaseificador “on-line” (Waters) e sistema de aquisição e processamento de dados Millennium (Waters). Os espectros foram adquiridos entre 190 e 400 nm e processados no comprimento de onda máximo de cada diterpeno ou pico de interesse. Uma coluna analítica Spherisorb ODS-1 (Waters, Milford, EUA) de 250 x 4,6 mm, partículas esféricas de 5 µm, 7 % de substituição, não capeada, foi utilizada. A fase móvel (acetonitrila:água 55:45, v/v; 0,9 mL/min) foi filtrada em sistema Millipore de filtração a vácuo em membranas de nylon e celulose de 0,45 µm, conforme metodologia padronizada e validada (DIAS et al., 2009a). Foi necessário estender o tempo de corrida (35 min) além do tempo de retenção (t_R) do último diterpeno de interesse (cafestol, $t_R \sim 15,5$ min) para verificação de compostos que poderiam ser eluídos, considerando-se os diferentes procedimentos de extração e preparo de amostra testados.

Foram utilizados padrões de caveol e cafestol (Axxora, San Diego, EUA) certificados por Alexis Biochemicals com pureza de 98 % (Lausen, Suíça), para identificação dos picos correspondentes nos cromatogramas, empregando-se co-cromatografia. A quantificação foi feita por padronização externa, por meio de curvas de calibração com 6 pontos em triplicata ($R^2 \geq 0,999$, $p < 0,001$). A quantificação de caveol e dehidrocaveol foi feita a 290 nm, e a de cafestol e dehidrocafestol, a 230 nm. Considerou-se que os derivados dehidro apresentavam absorvidade igual ao do álcool diterpeno correspondente (caveol ou cafestol) conforme descrito por DIAS et al. (2009b).

A confirmação da identidade e pureza dos picos por Espectrometria de Massas (EM) foi efetuada em um cromatógrafo a líquido Shimadzu (Kyoto, Japão) de quatro bombas de solvente, modelo LC20AD, com degaseificador (DGU20A5) e válvula de injeção Rheodyne (Rheodyne LCC, Rohnert Park, EUA) com "loop" de 20 μ L. Apresenta conexão em série de detector espectrofotômetro com arranjo de diodos (DAD) da marca Shimadzu, modelo SPD-M20A, e espectrômetro de massas com sistema por captura de íons com quadrupolo (armadilha de íons ou Q-trap). A fonte de ionização utilizada foi APCI marca Bruker Daltonics, modelo Esquire 4000 (Bremem, Alemanha). As condições de análise no espectrômetro de massas foram as mesmas de trabalho anterior (DIAS et al., 2009b), que otimizou os parâmetros de ionização e análise de diterpenos e outros compostos eluídos da coluna para café torrado em diferente graus. Utilizou-se APCI em Modo Positivo, corrente de descarga da corona de 4,0 μ A, temperatura de vaporização de 400 °C, fluxo de gás de nebulização (N_2) de 4 L/min, nebulizador a 60 psi, temperatura de gás secante (N_2) de 350 °C; voltagem do capilar, otimizada, de 4000 V. A energia da 2ª fragmentação (EM/EM) foi de 1,4 V. Adquiriu-se o espectro de massas em uma faixa de m/z entre 100 e 700 (modo "scan"). Para os principais picos do espectro de massas foi realizada a 2ª fragmentação para confirmação da estrutura.

6.3.3. Análise estatística

Os dados de concentração dos compostos em estudo foram submetidos à análise de variância (ANOVA, teste de Tukey para $p \leq 0,05$), considerando-se o método de extração como causa de variação, utilizando-se o programa Statistica 6.0 (STATSOFT, 2001).

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis cromatográficos para todos os métodos foram semelhantes (Figura 6.2). Para melhor visualização, exemplificou-se com a detecção a 230 nm, onde podem ser observados todos os compostos de interesse. Ressalta-se que não devem ser comparadas as intensidades dos picos entre os procedimentos da Figura 6.2, visto que os extratos foram analisados em diferentes diluições devido aos procedimentos serem diferentes.

Caveol (tempo de retenção, $t_R \sim 14,5$ min, pico 1) e cafestol ($t_R \sim 15,5$ min, pico 2) (Figura 6.2) resultaram picos agudos e bem definidos e com separação satisfatória, considerando a grande similaridade entre as estruturas destes compostos. Entre os picos 3 e 4 (Figura 6.2), identificados como dehidroderivados (Tabela 6.1), foi verificada uma pior separação para o método de SO, dificultando tanto a quantificação quanto a fragmentação na análise por EM.

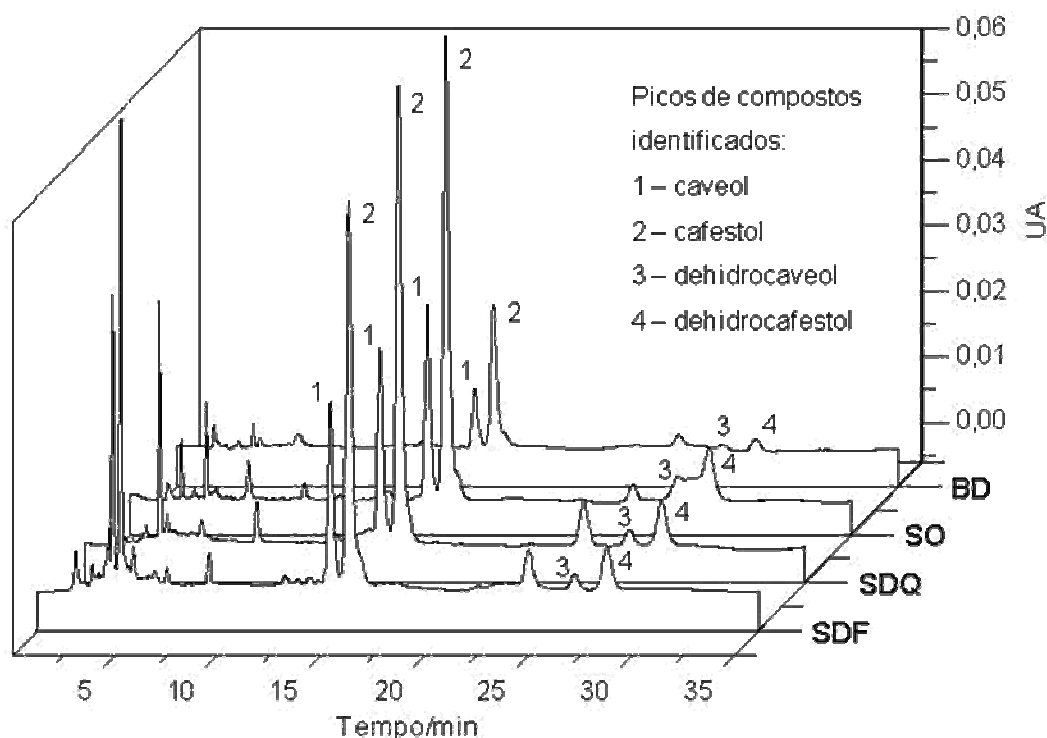


Figura 6.2 – Cromatogramas típicos (230 nm) de amostras preparadas por saponificação a quente de extratos obtidos por Soxhlet (SO), Bligh Dyer (BD), e amostras preparadas por Saponificação Direta a Quente (SDQ) e Saponificação Direta a Frio (SDF).

Para as extrações dos lipídios, foi observada uma aparente superestimativa da quantidade extraída pelo método por SO, que resultou em 18,6 ($\pm 0,01$, bs) g de lipídios/100 g de amostra. Por BD, foi obtido 13,5 ($\pm 0,56$, bs) g de lipídios/100 g. Na literatura, os maiores valores reportados para os teores de lipídios totais para café arábica de torra escura chegam a 15,4 % (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006; LERCKER et al., 1996; LAGO, 2001). O solvente utilizado no SO carregava compostos de cor, provavelmente pigmentos com maior solubilidade no solvente orgânico utilizado (terc-butil metil éter) e principalmente pelo tempo e repetições do refluxo do solvente. É possível esta ser a razão para terem sido observados compostos de difícil separação e identificação eluídos entre os picos 3 e 4, mesmo após derivatização, extração e limpeza (Figura 6.2). Considerando-se a facilidade de execução e tempo de análise, sugere-se que o método por Bligh Dyer é mais indicado para determinação de lipídios em amostras de café torrado e moído.

A análise por Espectrometria de Massas auxiliou na identificação das estruturas dos picos enumerados nos cromatogramas da Figura 6.2 (Tabela 6.1). Tanto para a primeira fragmentação (EM) quanto para a segunda (EM/EM), os resultados foram semelhantes comparando-se os diferentes métodos de extração, considerando o mesmo pico. Apenas houve dificuldade em se obter os espectros de massas do pico 3 de BD, pela quantidade insuficiente para uma fragmentação eficiente, e dos picos 3 e 4 para SO, devido à dificuldade de separação e pureza insuficiente. De um modo geral, os picos com mesmo t_R , comparando-se as avaliações dos diferente extratos, apresentaram espectros semelhantes no UV-Vis e no massas, o que mostrou que os métodos avaliados têm uma eficiência comparável de extração qualitativa.

Foram observados nos espectros de massas íons típicos de caveol e cafestol. Para cafestol, picos característicos de m/z 317 $[M+H]^+$, m/z 299 $[M+H-H_2O]^+$, 281 $[M+H-2H_2O]^+$ e m/z 147 $[M+H-C_{10}H_5O_2]^+$, foram detectados, considerando EM e EM/EM. Caveol, por apresentar uma dupla ligação a mais no anel de caureno, produziu íons semelhantes, porém com 2 u a menos (Tabela 6.1).

Os picos 3 e 4 foram identificados como dehidrocaveol e dehidrocafestol, respectivamente. O espectro UV-Vis mostrou perfis semelhantes na comparação do composto 3 com o caveol e do 4 com o cafestol. Além disto, os dehidroderivados

produziram picos da molécula protonada com 18 u a menos que os seus correspondentes caveol e cafestol.

Os picos não identificados não apresentaram fragmentos com m/z que indicassem um mecanismo de fragmentação a partir dos diterpenos ou uma estrutura conveniente, sendo considerados interferentes da análise.

Tabela 6.1 – Resultados obtidos por CLAE-DAD-EM/EM para amostra de grãos de café torrados.

Pico ^a	$\sim t_R$ (min)	λ_{max} (DAD)	EM (m/z)	EM/EM ^b [M+H] ⁺ (m/z)	Composto	MM ^c (g/mol)
1	14,7	288 nm	315 [M+H] ⁺ , 297, 279	297, 279, 145, 133	Caveol	314
2	15,5	225 nm	317 [M+H] ⁺ , 299, 281	299, 281, 147, 131	Cafestol	316
3	26,5	291 nm	297 [M+H] ⁺ , 279, 145, 133	279, 145, 133	Dehidro caveol	296
4	27,5	223 nm	299 [M+H] ⁺ , 281, 147, 131	281, 147, 131	Dehidro cafestol	298

^a Numeração de acordo com a Figura 6.2.

^b Segunda fragmentação para o pico da molécula protonada.

^c Massa molar do composto identificado.

Ao se avaliar os teores obtidos de caveol e cafestol e seus dehidroderivados para as diferentes extrações, foi possível verificar que a saponificação direta é mais efetiva que as metodologias que fazem a pré-separação dos lipídios da amostra para então se iniciar o processo de saponificação (Tabela 6.2).

Tanto BD quanto SO mostraram-se pouco eficientes na extração dos quatro compostos identificados, resultando em teores muito menores que aqueles obtidos pelos procedimentos de saponificação direta (Tabela 6.2). Isto indicou que a diferença de polaridade que existe entre os solventes utilizados (tercbutil metil éter e metanol/clorofórmio para SO e BD, respectivamente) não foi determinante para a eficiência de extração.

Para o SO seriam a princípio esperados maiores problemas, uma vez que a literatura já relatou que o refluxo do solvente aquecido por muitas horas favorece as reações de peroxidação e hidrólise, podendo comprometer resultados analíticos posteriores (BRUM, 2004). É descrito também que o caveol poderia sofrer degradação e produzir dehidroderivados, mas quando submetido a uma alta

temperatura por longo tempo, em situações, por exemplo, onde o café é torrado a uma alta intensidade (DIAS et al., 2009b; SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006). Observou-se, no entanto, que tanto a extração a quente (SO), quanto a frio (BD) dos lipídios para posterior saponificação apresentaram resultados inadequados, assim a degradação nesse caso não poderia ser atribuída ao uso da temperatura, indicando que a saponificação direta é necessária para garantir boa estabilidade dos diterpenos. Verificou-se, também, que o cafestol e até mesmo o caveol, que apresenta uma estrutura mais susceptível a oxidação, não são afetados pela temperatura de extração e o tempo em que são expostos (80 °C, 1 h) aplicados na SDQ (Tabela 6.2).

Tabela 6.2 – Teores* dos compostos diterpênicos em amostra de grãos de café torrados para diferentes extrações e preparo de amostra**.

Compostos	Método de extração	Média*	± DP	CV (%)
Caveol	SDQ	930,2 ^a	36,8	3,96
	SDF	789,8 ^b	14,5	1,83
	SO	192,4 ^c	8,31	4,32
	BD	101,6 ^d	4,20	4,13
Dehidrocaveol	SDQ	113,2 ^a	4,66	4,11
	SDF	111,5 ^a	1,76	1,58
	SO	22,7 ^b	1,42	6,27
	BD	14,1 ^c	0,13	0,99
Cafestol	SDQ	568,6 ^a	16,6	2,91
	SDF	483,1 ^b	15,0	3,10
	SO	126,3 ^c	10,3	8,13
	BD	68,6 ^d	0,78	1,15
Dehidrocafestol	SDQ	87,1 ^a	3,74	4,29
	SDF	86,2 ^a	1,77	2,06
	SO	21,8 ^b	7,40	33,9
	BD	11,1 ^c	0,26	2,40

*Média da concentração (mg/100 g de amostra, bs) de 5 repetições de extração. Letras distintas na coluna indicam diferença significativa entre as médias, para cada composto.

**Saponificação direta a quente (SDQ), saponificação direta a frio (SDF), extração por Soxhlet com saponificação a quente (SO) e extração por Bigh Dyer com saponificação a quente (BD).

Comparando-se apenas os métodos por saponificação direta, observou-se mesma eficiência para a extração dos dehidroditerpenos, porém, a técnica por aquecimento (SDQ) demonstrou melhor desempenho para o caveol e cafestol. Teor médio de 930 mg de caveol/100 g de amostra foi encontrado por SDQ, em torno de 15 % superior ao obtido por SDF, de 790 mg/100 g de amostra. Para o cafestol, a relação da diferença foi semelhante: 568 (SDQ) e 483 mg/100 g de amostra (SDF) (Tabela 6.2).

Os compostos da matéria insaponificável apresentam estabilidade diferenciada quanto à temperatura de saponificação. Bandeira et al. (2008) testaram diversos procedimentos de extração para avaliação de colesterol por CLAE: saponificação direta com aquecimento; extração de lipídios por Folch (variação do BD, com digestão ácida de amostras ricas em proteínas) seguida de saponificação com aquecimento; hidrólise ácida e extração dos lipídios com éter etílico utilizando equipamento de Soxhlet, seguida de saponificação com aquecimento; hidrólise enzimática e extração dos lipídios com hexano, seguida de saponificação com aquecimento; saponificação direta da amostra sem aquecimento. O método por saponificação direta, porém sem aquecimento, foi o que apresentou um cromatograma com menor número de interferentes e maior área do pico de colesterol, além de ser de fácil execução e utilizar menor quantidade de solvente. Neste caso, a temperatura elevada nos processos a quente provavelmente promovia a degradação do colesterol.

Para diterpenos, outros trabalhos também relataram bons resultados com SDQ. Urgert et al. (1995) e Roos et al. (1997) utilizaram solução etanólica de hidróxido de sódio por uma hora a 80 °C para saponificação direta dos lipídios de grãos verdes de café. Em seguida, fez-se a extração da matéria insaponificável com diisopropil éter e limpeza com água, obtendo-se valores adequados para teores de caveol e cafestol em frutos frescos de *C. canephora*, *C. liberica*, *C. canephora*, *C. congensis*, e *C. arabica*, determinados por CG. Para 38 amostras de café torrado e moído de mercado, Nicolau-Souza et al. (2009) encontraram até 800 mg de caveol/100 g de amostra, e até 550 mg de cafestol/100 g, valores determinados por saponificação direta a quente. Para o café arábica torrado, foram descritos teores de caveol com máximo de 870 mg/100 g e máximo de 700 mg/100 g para cafestol (CAMPANHA, 2008; ARAÚJO; SANDI, 2006; RUBAYIZA; MEURENS, 2005; KURZROCK; SPEER, 2001; LERCKER et al., 1995; URGERT et al., 1995; FREGA; BOCCI; LERCKER,

1994), concordando com os resultados descritos neste trabalho para extração por SDQ (Tabela 6.2).

Por estas avaliações, o método por saponificação direta a quente (SDQ), com a adição direta de solução saponificante (KOH em etanol) na amostra e aquecimento por uma hora a 80 °C, foi considerado o mais adequado por mostrar melhor eficiência na extração dos diterpenos de um modo geral, com a vantagem de também despende aproximadamente seis vezes menos tempo para sua prática. É necessário quase 24 h para preparar a amostra para injeção no cromatógrafo utilizando SDF, enquanto que por SDQ é possível em no máximo 4 horas de trabalho laboratorial ser obtidos os teores dos compostos.

6.5 CONCLUSÕES

Considerando-se os métodos de extração lipídica, sugeriu-se que o método por Bligh Dyer seria mais adequado que por Soxhlet, por apresentar melhor perfil cromatográfico, valores mais adequados a relatos da literatura e maior praticidade. O método por saponificação direta a quente (SDQ) demonstrou melhor eficiência na extração de diterpenos de café torrado, avaliados com sucesso por CLAE-DAD-EM/EM, além de requisitar menor tempo de análise. Na SDQ observaram-se teores de cafeol e cafestol em torno de 15 % maiores que na SDF, e de 80 a 90 % superiores aos obtidos por SO e BD. Os compostos cafeol e dehidrocafeol, cafestol e dehidrocafestol foram identificados e quantificados. A presença dos derivados diterpênicos foi atribuída ao processo de torra e não às condições de extração e análise.

6.6 COLABORADORES

Adelia Ferreira de Faria, Adriana Zerlotti Mercadante, Neura Bragagnolo

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. T. **Desenvolvimento de metodologia analítica para diferenciação de café torrado arábica (*Coffea arabica*) e conilon (*Coffea canephora*) e misturas.**

2004. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ALVES, S. T.; SCHOLZ, M. B. D. S.; BENASSI, M. T. Desenvolvimento de metodologia espectrofotométrica para diferenciação de café torrado, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. In: VIII ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 8., 2003. Curitiba. **Anais...**, 2003. p. 343-348.

AOAC. **Methods of the association of official analytical chemists**. Method No. 920.85. 15 ed. v. 2. Virginia: Arlington, 1990. p.780.

ARAÚJO, J. M. A; SANDI, D. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, Oxford, v.101, n. 3, p. 1087-1094, 2006.

BANDEIRA, C. M.; FERREIRA, J. M.; BRAGAGNOLO, N.; MARIUTTI, L. R. B. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de colesterol em ração para ruminantes através de planejamento experimental fatorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p.1422-1426, 2008.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p 911-917, 1959.

BRUM, A. A. S. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica**. 2004. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Piracicaba.

CAMPANHA, F. G. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) pela composição de diterpenos**. 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

DIAS, R. C. E. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) em diferentes graus de torra**. 2005. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

DIAS, R. C. E; BENASSI, M. T. Validação de metodologia por espectrofotometria para determinação de cafeol em café torrado e moído. **Química Nova**, São Paulo, 2009 (a ser enviado).

DIAS, R. C. E; CAMPANHA, F. G.; BENASSI, M. T.; VIEIRA, L. G. E.; FERREIRA, L. P.; POT, D.; MARRACCINI, P. Metodologia para avaliação de cafeol e cafestol em folhas e tecidos de frutos de cafeeiro e em café torrado. **Química Nova**, São Paulo, 2009a (a ser enviado).

DIAS, R. C. E; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.; BRAGAGNOLO, N.; BENASSI, M. T. Influência da torra sobre o perfil de diterpenos de café torrado. **Química Nova**, São Paulo, 2009b (a ser enviado).

FREGA, N.; BOCCI, F.; LERCKER, G. High resolution gas chromatographic method for determination of robusta coffee in commercial blends. **Journal of High Resolution Chromatography**, Weinheim, v. 17, n. 5, p. 303-307, 1994.

KÖLLING-SPEER, I.; STROHSCHNEIDER, S.; SPEER, K. Determination of free diterpenes in green and roasted coffees. **Journal of High Resolution Chromatography**, Weinheim v. 22, n. 1, p. 43-46, 1999.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Diterpenes and diterpene esters in coffee. **Food Reviews International**, New York, v. 17, n. 4, p. 433-450, 2001.

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

LERCKER, G.; CABONI, M. F.; BERTACCO, G.; TURCHETTO, E.; LUCCI, A.; BORTOLOMEAZZI, R.; PAGANI, E.; FREGA, N.; BOCCI, F. La frazione lipidica del caffè. Nota 1: Influenza della torrefazione e della decaffeinizzazione. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v. 35, n. 10, p.1057-1065, 1996.

LERCKER, G.; FREGA, N.; BOCCI, F.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. High resolution gas chromatographic determination of diterpenic alcohols and sterols in coffee lipids. **Chromatographia**, Wiesbaden, v.41, n.1/2, p.29-33, 1995.

MARIUTTI, L. R. B.; NOGUEIRA, G. C.; BRAGAGNOLO, N. Optimization and Validation of Analytical Conditions for Cholesterol and Cholesterol Oxides Extraction in Chicken Meat Using Response Surface Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 9, p. 2913–2918, 2008.

NICOLAU-SOUZA, R. M.; CANUTO, G. A. B.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. **Química Nova**, 2009 (em análise).

PETTITT JR, B. C. Identification of the diterpene esters in arabica and canephora coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.35, n. 4, p. 549-551. 1987.

ROOS, B.; VAN DER WEG, G.; URGERT, R.; VAN DE BOVENKAMP, P.; CHARRIER, A.; KATAN, M. B. Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.45, n. 8, p. 3065-3069. 1997.

RUBAYIZA, A. B.; MEURENS, M. Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by Fourier Transform Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 53, n.12, p. 4654-4659, 2005.

SALDANHA, T.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N; BRAGAGNOLO, N. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, n. 12, 4107-4113, 2006.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. **Polytechnisches Journal**, Erlangen, v. 232, n. 5, p. 461-465, 1879.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 201-216, 2006.

STATSOFT. **STATISTICA for Windows**: computer program manual. Versão 6.0. Tulsa: Software Inc., 2001.

URGERT, R.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUIL, T. G.; VAN DE BOVENKAMP, P.; HOVENIER, R.; KATAN, M.B. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 43, n.8, p. 2167-2172, 1995.

CAPÍTULO 7

INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE DO PROCESSO DE TORRA SOBRE O PERFIL DE DITERPENOS EM GRÃOS DE CAFÉ TORRADOS

7. INFLUÊNCIA DA INTENSIDADE DO PROCESSO DE TORRA SOBRE O PERFIL DE DITERPENOS EM GRÃOS DE CAFÉ TORRADOS

7.1 RESUMO

Caveol e cafestol, principais diterpenos do café, destacam-se tanto pela ação hipercolesterolêmica quanto pela atividade anticarcinogênica e antioxidante. Além disso, são potenciais identificadores de espécies, permitindo avaliar a adição intencional ou fraudulenta de *Coffea canephora* (conilon) a *Coffea arabica* (arábica), este de maior valor comercial e com maior concentração dos diterpenos. Com a o processo de torra, no entanto, esses compostos podem ser degradados formando prováveis isômeros de função e dehidroderivados. Caveol e cafestol foram quantificados em cafés arábica e conilon com diferentes graus de torra. As amostras foram preparadas por saponificação direta a quente e extração com terc-butil metil éter. Quantificou-se por CLAE-DAD, com coluna Spherisorb ODS 1, fase móvel acetonitrila:água (55:45 v/v) e detecção no UV. Para confirmação das estruturas dos diterpenos e possíveis compostos de degradação avaliaram-se seus espectros de massas utilizando APCI em Modo Positivo e aquisição entre m/z 100 e 700. Picos característicos para fragmentação de caveol e cafestol foram encontrados. Em algumas torras, foram produzidos dehidroderivados, também identificados. O processo de torra influenciou os teores de diterpenos de forma semelhante nas matrizes de *C. arabica* e *C. canephora*, mas o efeito foi dependente da intensidade do processo. Após torra correspondente às comerciais, ocorreu degradação dos diterpenos com simultânea formação de dehidrocaveol e dehidrocafestol, indicando instabilidade de cafestol e, notadamente, caveol a processos térmicos mais agressivos. No entanto, devido ao aumento da concentração dos lipídios (base seca) durante o processo de torra, os teores de caveol e cafestol mantiveram-se estáveis, reforçando o potencial desses diterpenos como indicadores de adição de café conilon ao arábica em produtos com diferentes graus de torra.

Palavras-chave: Caveol. Cafestol. Dehidrocaveol. Dehidrocafestol. Grau de torra. CLAE-DAD-EM/EM. Lipídios. Parâmetros de cor.

7.2 INTRODUÇÃO

O café, por ser um dos produtos de maior influência na economia mundial, tem sido alvo de muitos estudos para avaliação da sua composição. Atualmente, os principais objetivos da cafeicultura nacional são tornar o produto brasileiro competitivo internacionalmente e aumentar o mercado interno; assim campanhas têm sido conduzidas baseando-se na melhora de qualidade do produto e nos benefícios à saúde com o consumo de café (ABIC, 2009; ASSAD et al., 2002; LOPES, 2000). O estudo de compostos que sejam importantes tanto do ponto de vista de saúde quanto da garantia de qualidade da bebida torna-se relevante havendo ainda a necessidade de se desenvolver técnicas analíticas eficientes e viáveis para avaliação da composição de café.

Dois compostos de interesse, caveol e cafestol, alcoóis diterpenos presentes na fração insaponificável do café, mostraram potencial de discriminação de espécies por estarem presentes em diferentes quantidades em cafés arábica e conilon (CAMPANHA, 2008; DIAS, 2005). São, ainda, objetos de estudos por apresentarem ação fisiológica positiva, como efeito hepatoprotetor e antioxidante, mas o efeito hipercolesterolêmico foi atribuído ao cafestol (HIGDON; FREI, 2006; BOEKSCHOTEN et al., 2003; CAVIN et al., 2002).

O acoplamento de um cromatógrafo com um espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da Espectrometria de Massas - EM (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento da seletividade) (MORRISON; BOYD, 2008; VÉKEY, 2001). Para avaliação de compostos diterpênicos do café, poucos trabalhos relataram o uso de espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo a líquido (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006; KURZROCK; SPEER, 2001b); a maioria dos autores utilizou Cromatografia a Gás (CG) (GUERRERO; SUÁREZ; MORENO, 2005; CASTILLO; HERRAIZ; BLANCH, 1999; ROOS et al., 1997; URGERT et al., 1995; LERCKER et al., 1995; PETTITT JR., 1987). Speer e Kölling-Speer (2006), em uma revisão sobre a fração lipídica, questionam resultados da literatura de detecção de dehidroderivados de diterpenos em grãos verdes, considerando-os artefatos formados na análise por CG-EM, ressaltando o risco de degradação térmica. Assim, a análise de caveol e cafestol e derivados utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, CLAE, associada à EM, seria mais eficiente, prática e segura.

Dos trabalhos com aplicação de EM e que citam uso de cromatografia a líquido, Pettitt Jr. (1987) utilizou a técnica de CLAE com detecção em 280 nm para isolamento dos ésteres de diterpenos em cafés arábica e conilon verdes, mas empregou CG-EM para confirmação das estruturas. Somente Speer e Kölling-Speer (2006) indicaram a utilização de CLAE-EM para identificação de compostos diterpênicos. Empregaram fonte de Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) à temperatura de 350 °C; temperatura do gás (nitrogênio) de 330 °C; pressão de 60 psi para o gás do nebulizador; vazão do gás de 4 L/min, voltagem do CID (dissociação induzida por colisão) de 20 V e 50 V, como condições do espectrômetro de massas.

O processo de torra é uma das etapas mais influentes na composição química do café, responsável pelo sabor e aroma característicos, sendo produzidos mais de 1000 compostos voláteis nesta etapa de processo (TRUGO apud CABALLERO, 2003). Existem na literatura trabalhos tanto afirmando a estabilidade de cafeol e cafestol a temperatura (CAMPANHA, 2008; DIAS, 2005; URGERT, et al., 1995) quanto descrevendo esses componentes como termolábeis. Foi citado que o cafestol e o cafeol podem sofrer desidratação durante o processo de torra, gerando dehidroderivados, ou formar produtos como o caveol e cafestal (isômeros de função) e ainda isocafeol, um isômero de posição (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006; LAGO, 2001). Não há, no entanto, relato de monitoramento dos teores desses compostos durante o processo de torra.

O objetivo do trabalho foi, após definição de metodologia por CLAE-DAD-EM/EM para identificação e quantificação destes compostos, verificar a influência do grau de torra nos teores de cafeol e cafestol e possíveis produtos de degradação em diferentes matrizes de cafés (arábica e conilon).

7.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados cafés *Coffea arabica* e *C. canephora* torrados em 5 níveis, com 2 repetições de processo de torra para cada espécie. Utilizou-se torrador Rod Bel, tipo piloto, capacidade de 3,6 kg/h, e as amostras foram processadas pelos tempos de 2, 4, 6, 8 e 10 min, a uma temperatura máxima de 230 °C. Os cafés foram moídos em moedor acoplado ao torrador até granulometria de 0,59 mm (peneira ABNT 30). As amostras, fornecidas e processadas pela Companhia Iguaçu de Café

Solúvel (Cornélio Procópio, PR), foram caracterizadas quanto aos teores de umidade e lipídios e parâmetros de cor.

A umidade foi determinada em analisador de umidade de halogênio modelo HB43-S (Mettler Toledo, Reino Unido) utilizando 105 °C em tempos variando de 2,3 a 12,5 min. As avaliações, em duplicata, mostraram coeficiente de variação menor que 4 %.

O teor de lipídios foi determinado por método de Bligh Dyer, como descrito por DIAS et al. (2009a), em trabalho anterior em que se comparou procedimentos de extração de diterpenos para café torrado.

Para análise de cor, foi empregado um colorímetro Color-guide (BYK-Gardner, EUA), com geometria 45/0, iluminante D65, e região circular de leitura de 11 mm de diâmetro (BYK-GARDNER COLOR, 2008). O colorímetro forneceu diretamente os valores de L* (luminosidade), a* (componente vermelho-verde) e b* (componente amarelo-azul), e calculou-se o parâmetro tonalidade cromática ($H^* = \arctg b^*/a^*$).

O preparo das amostras (0,200 g) para análise dos compostos diterpênicos foi realizado por saponificação direta a quente (80 °C, 1 h) com solução etanólica de KOH (2,5 mol.L⁻¹) seguida de extração com terc-butil metil éter e limpeza com água (DIAS et al., 2009a). A separação dos compostos diterpênicos foi realizada utilizando a metodologia por CLAE, validada anteriormente para amostras de café arábica e conilon (DIAS et al., 2009b). Foi utilizada uma coluna Spherisorb ODS-1 (Waters, Milford, EUA) 5 µm, 7 % de substituição, não capeada; fase móvel (acetonitrila:água 55:45, v/v; 0,9 mL/min) filtrada em membranas de nylon e celulose de 0,45 µm; controle de temperatura da coluna de 25 °C.

As condições para a análise por Espectrometria de Massas foram definidas a partir de informações da literatura (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006; KURZROCK; SPEER, 2001b; LERCKER et al., 1995; PETTITT JR., 1987) e testes preliminares. Inicialmente foram testados padrões de cafestol e caveol (Axxora, San Diego, EUA) certificados por Alexis Biochemicals com pureza de 98 % (Lausen, Suíça) em concentrações que variaram de 0,04 a 0,2 mg/mL, injetado diretamente no espectrômetro. Em seguida, extratos de amostras de *Coffea arabica* e *C. canephora* de torra média/escuro (8 min) foram aplicadas para a fundamentação das condições da metodologia.

As análises das amostras foram efetuadas em um cromatógrafo a líquido Shimadzu (Kyoto, Japão) de bombeamento quaternário de solvente, modelo

LC20AD, com degaseificador (DGU20A5) e válvula de injeção Rheodyne (Rheodyne LCC, Rohnert Park, EUA) com “loop” de 20 µL. Apresenta conexão em série de detector espectrofotômetro com arranjo de diodos (DAD) da marca Shimadzu, modelo SPD-M20A, e Espectrômetro de Massas com sistema por captura de íons com quadrupolo (armadilha de íons ou Q-trap). A fonte de ionização utilizada foi APCI marca Bruker Daltonics, modelo Esquire 4000 (Bremem, Alemanha). Os cromatogramas foram processados a 230 ou 290 nm, comprimentos de onda de maior absorção de cafestol e caveol, respectivamente. Utilizou-se APCI em Modo Positivo, corrente de descarga da corona de 4,0 µA, temperatura de vaporização de 400 °C, vazão de gás de nebulização (N₂) de 4 L/min, nebulizador a 60 psi, temperatura de gás secante (N₂) de 350 °C; voltagem do capilar, otimizada, de 4000 V. Adquiriu-se o espectro de massas em uma faixa de *m/z* entre 100 e 700 (modo “scan”). Para os principais picos do espectro foi requisitada a 2^a fragmentação (EM/EM) para confirmação da estrutura, aplicando-se energia de 1,4 V.

A quantificação foi feita em um cromatógrafo constituído de conjunto de bombeamento quaternário de solvente (Waters, modelo 600), detector de arranjo de diodos (Waters, modelo 996), injetor Rheodyne (“loop” de 20 µL), degaseificador “on-line” (Waters) e sistema de aquisição e processamento de dados Millennium (Waters). Os espectros foram adquiridos entre 190 e 400 nm e processados no comprimento de onda máximo de cada diterpeno ou pico de interesse. Utilizaram-se padrões de caveol e cafestol (Axxora, San Diego, EUA) certificados por Alexis Biochemicals com pureza de 98 % (Lausen, Suíça), para identificação dos picos correspondentes nos cromatogramas por co-cromatografia. A quantificação foi feita por padronização externa, por meio de curvas de calibração com 6 pontos em triplicata ($R^2 \geq 0,999$, $p < 0,001$, $n=18$). A quantificação de caveol e dehidrocaveol foi feita a 290 nm, e a de cafestol e dehidrocafestol, a 230 nm. Considerou-se que os dehidroderivados apresentavam absorvidade igual ao do álcool diterpeno correspondente (caveol ou cafestol), tendo em vista os espectros no UV dos compostos (Figura 7.5).

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.4.1 Caracterização das amostras

Avaliaram-se os teores de umidade, lipídios (Figura 7.1) e parâmetros de cor (Figura 7.2) de todas as amostras.

A umidade dos cafés variou de 5,8 a 2,3 % para a espécie arábica e de 6,1 a 1,9 % para o conilon, sendo reduzida com o processo de torra.

De uma maneira geral, o aumento da intensidade de torra provocou a concentração relativa de lipídios em ambas as espécies, tendo em vista a resistência térmica desta classe de compostos principalmente comparada a carboidratos e proteínas (LAGO, 2001). A exposição da amostra a alta temperatura, dependendo do tempo, pode romper a matriz da parede celular, resultando na solubilização de polissacarídeos, além de promover reações que degradariam simultaneamente açúcares e proteínas, como a reação de pirólise e Maillard (OOSTERVELD; VORAGEN; SCHOLS, 2003; REDGWELL et al., 2002). O aumento no teor de lipídios ocorreu principalmente após 6 min de torra. O café arábica demonstrou que sua matriz é mais susceptível termicamente, visto a elevação mais pronunciada da concentração de lipídios (Figura 7.1).

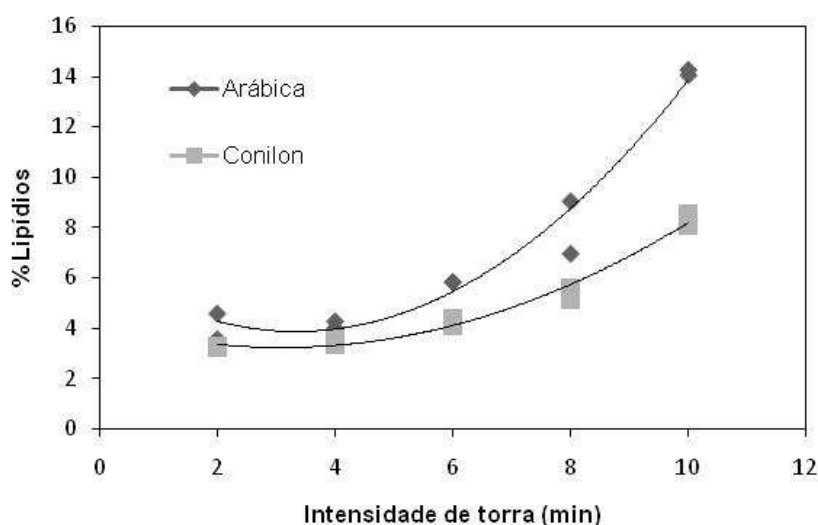


Figura 7.1 – Variação dos teores de lipídios de cafés arábica e conilon ao longo do processo de torra (em base seca).

As concentrações variaram de 4,1 a 14,1 % (em base seca, bs) de lipídios para o café arábica e de 3,2 a 8,3 % (bs) para café conilon, próximo aos valores descritos na literatura. Rubayiza e Meurens (2005) relataram para cafés verdes (86 amostras de 25 regiões geográficas), teores médios de lipídios de 13,9 % para arábica e 9,3

%, para conilon. Nos torrados (82 amostras), os autores observaram valores médios de 16,8 a 11,5 % (bs) de lipídios para cafés arábica e conilon.

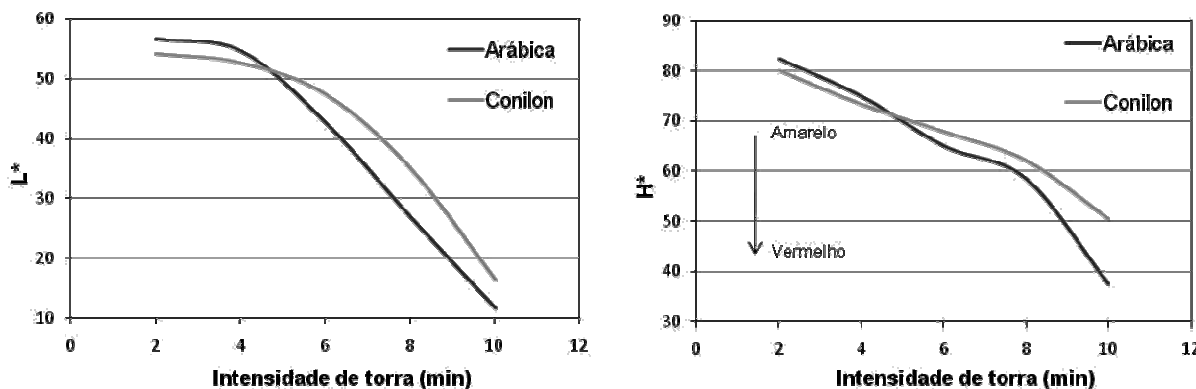


Figura 7.2 – Comportamento dos parâmetros de cor, luminosidade (L^*) e tonalidade cromática (H^*), com a intensidade do processo de torra em diferentes espécies de café.

As amostras de café conilon e arábica comportaram-se semelhantemente quanto à cor durante o processo de torra. A partir de 4 min de torra, para as duas espécies, observou-se redução de L^* , sendo essa mais suave para o conilon. O aumento no tempo de processo produziu amostras com maior intensidade de vermelho e menor de amarelo (redução de H^*), comportamento mais evidente entre as torras de 8 e 10 min para o café arábica (Figura 7.2). Neste trabalho foi utilizada ampla faixa de intensidade de torra, quando comparado a outros estudos. Com o aumento da intensidade, os valores de L^* variaram de 56,6 a 11,6 para o café arábica e de 54,2 a 16,7 para conilon. O parâmetro H^* variou de 82,3 a 37,5 para arábica e de 80,1 a 50,4 para o conilon. Duarte et al. (2005), descreveram para café de torras denominadas clara, média e escura, L^* entre 37 e 29 e H^* entre 34 e 7,3. Dias (2005), trabalhando com 3 graus de torra (clara, média e escura) relatou o mesmo comportamento (diminuição de L^* e H^*) com aumento de intensidade do processo. Os valores de L^* foram de 28 a 13 para arábica e de 37 a 17 para conilon; H^* variou de 57 a 41 para arábica e de 62 a 48 para conilon.

Para caracterização de amostras comerciais, Nicolau-Souza et al. (2009) não observaram diferença de cor entre 38 cafés de mercado brasileiros, e relataram L^* próximo de 20 e H^* de 55, independentemente das informações diferenciadas, quanto ao grau de torra, na embalagem dos produtos. Considerando apenas os

parâmetros de cor, os cafés de mercado seriam de grau de torra médio/escuro, similar às amostras torradas a 8 min (230 °C) neste trabalho. Observa-se que as medidas de cor são uma importante forma de se caracterizar e padronizar as amostras torradas, juntamente com a porcentagem de perda de peso. Porém, os diferentes critérios de caracterização do grau de torra representam a maior dificuldade para a comparação.

7.4.2 Identificação dos compostos e análise qualitativa

Os picos cromatográficos que mostraram boa definição e indicaram ser de compostos característicos das amostras (Figura 7.3) foram avaliados. Para a identificação e elucidação das estruturas de caveol e cafestol e dos possíveis produtos de degradação, um conjunto de avaliações foi utilizado: (a) ordem de eluição na coluna cromatográfica, (b) tempo de retenção (t_R), (c) co-cromatografia, (d) espectro de absorção no UV-Vis e (e) espectro de massas. O uso do detector de arranjo de diodos (DAD) seriado com o espectrômetro de massas permitiu a obtenção “on line” dos espectros de absorção e massas, evidenciando a pureza dos picos cromatográficos.

O espectro UV-Vis dos padrões de caveol e cafestol indicou o comprimento de onda (λ) de maior absorção: 290 e 230 nm, respectivamente (Figura 7.5).

Na Figura 7.3, estão enumerados os picos característicos de cromatogramas de amostras de café arábica no comprimento de onda de detecção de 230 nm, onde podem ser observados todos os compostos de interesse.

O café arábica com maior intensidade de torra (10 min) apresentou o maior número de picos entre as amostras estudadas. Em torras de menor intensidade, apenas o pico 4 foi detectado após o tempo de retenção de 20 min (Figura 7.3). Comparativamente, nos cromatogramas a 290 nm para a mesma espécie de café, o pico 1 apareceu em maior intensidade, o pico 5 esteve presente apenas na amostra mais torrada, e os demais picos não foram observados.

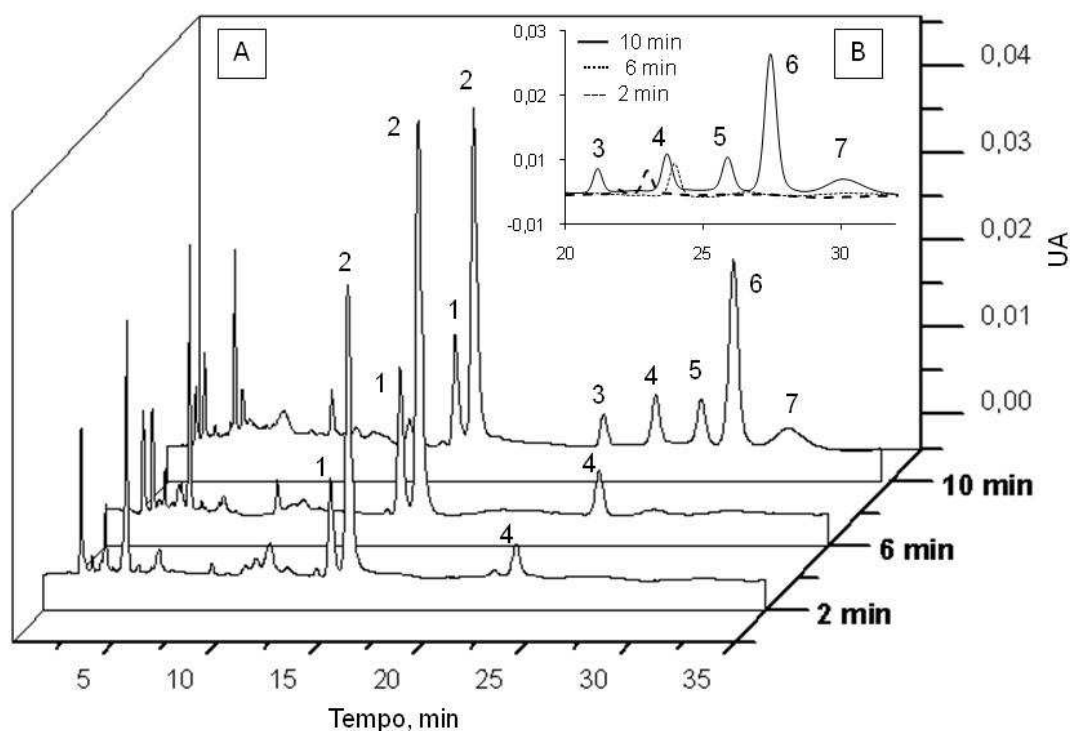


Figura 7.3 – (A) Cromatogramas típicos de amostras de café arábica de diferentes graus de torra (2, 6 e 10 min) a 230 nm. (B) Detalhe dos compostos eluídos após 20 min. Identificação: 1 - caveol, 2 – cafestol, 5 – dehidrocaveol, 6 – dehidrocafestol, 3, 4 e 7 – interferentes.

Para café conilon, na detecção a 290 nm, o cromatograma não apresentou picos característicos. A 230 nm, observou-se presença dos picos 2, 4 e 6, os dois últimos com maior intensidade na torra por 10 min.

Dessa forma os picos 1, 5 e 7 foram peculiares das amostras de arábica, os dois últimos sendo observado apenas na torra 10 min.

A avaliação dos resultados indicaram que os picos 1 e 2 do cromatograma (Figura 7.3) eram caveol e cafestol, com pesos moleculares (M) de 314 e 316 g/mol, respectivamente, concordando com outros relatos (DIAS et al., 2009b; RUBAYIZA; MEURENS, 2005; KURZROCK; SPEER, 2001b; ROOS et al., 1997). Íons típicos destes compostos foram observados nos espectros de massas. Para caveol, os picos mais intensos foram m/z 297, m/z 315 (molécula protonada, $[M+H]^+$) e m/z 279. Avaliando-se a segunda fragmentação de cada um desses picos, observou-se a formação de um fragmento típico e intenso, o m/z 145. Cafestol apresentou íons semelhantes, porém com 2 u a mais, m/z 299, 317, 281 e 147, devido à pequena diferença estrutural, uma ligação dupla no anel de caureno (Figuras 7.4 e 7.6). Estes

resultados concordaram com trabalho que cita os mesmos picos para confirmação de estrutura de ésteres de diterpenos (KURZROCK; SPEER, 2001b) e com o primeiro relato do 16-*O*-metilcafestol, de estrutura semelhante ao cafestol, onde os picos m/z 299 e 147 foram encontrados (PETTITT JR., 1987). Este composto seria detectado apenas em variedades do *C. canephora*, mas não foram observadas características de sua presença nas amostras deste trabalho.

No Material Suplementar (item 7.8) estão os espectros de massas dos picos de interesse e as 2^{as} fragmentações mais importantes.

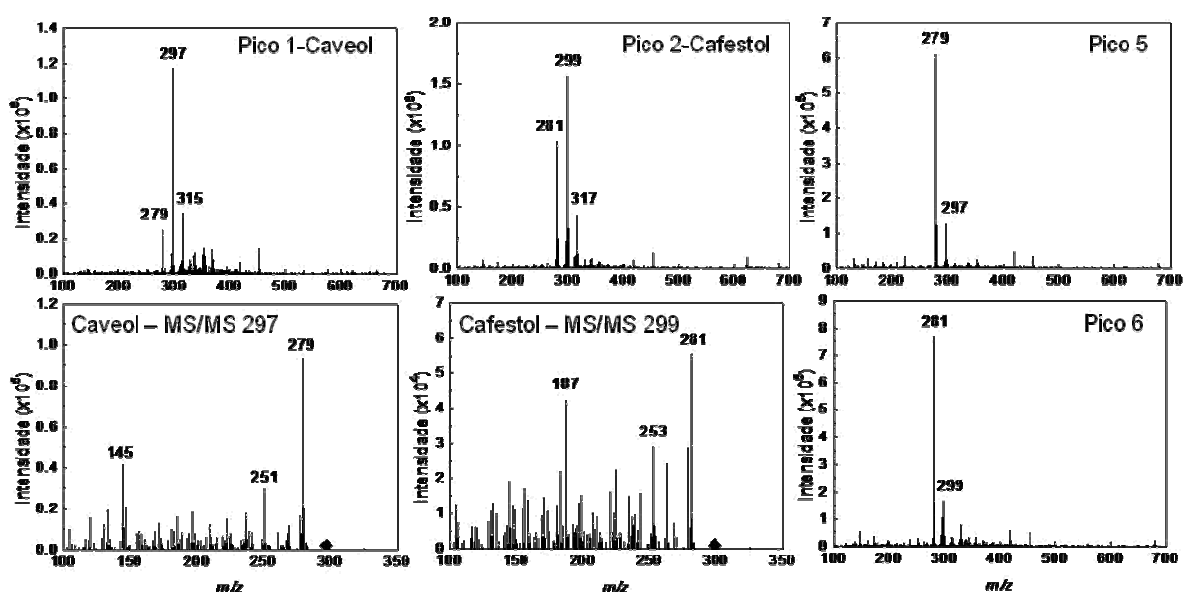


Figura 7.4 – Espectros de massas para os compostos de 1, 2, 5 e 6 da Figura 7.3.

O espectro UV-Vis mostrou que os picos 3, 4 e 7 do cromatograma (Figura 7.3) não apresentaram perfis característicos quando comparados aos espectros do caveol ou cafestol, como apresentaram os picos 5 e 6 (Figura 7.5). No espectro de massas, os compostos 3, 4 e 7 produziram resultados semelhantes, com dois fragmentos característicos, m/z 453 e 149. Não foi possível construir por um mecanismo viável, fragmentos provenientes de diterpenos que gerassem esses picos ou uma estrutura química que pudesse indicar novos compostos diterpênicos, o que mostrou que os picos 3, 4 e 7 eram interferentes da análise, podendo ter sido gerados na degradação térmica, no processo de torra, de outros compostos da matéria insaponificável do café.

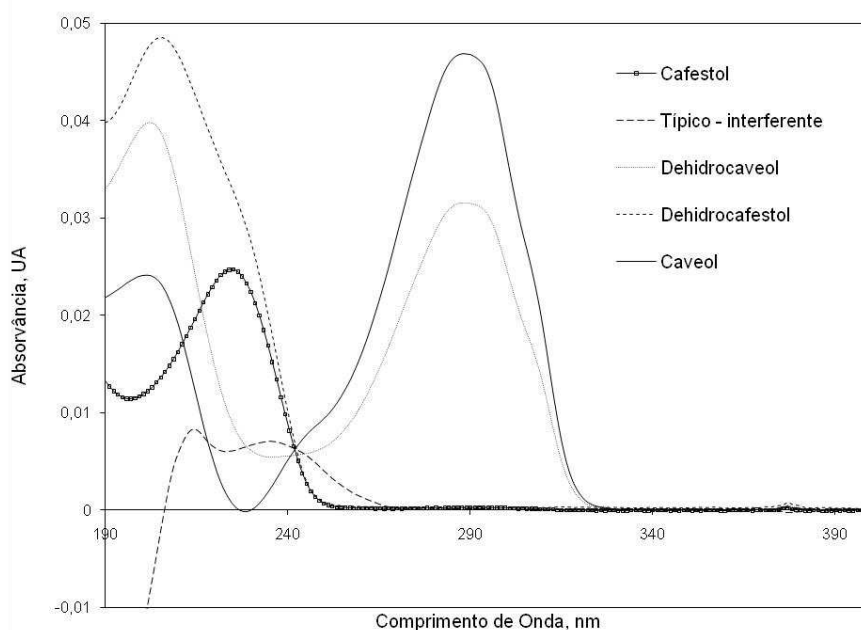


Figura 7.5 - Espectros UV-Vis típicos dos compostos enumerados na Figura 7.3.

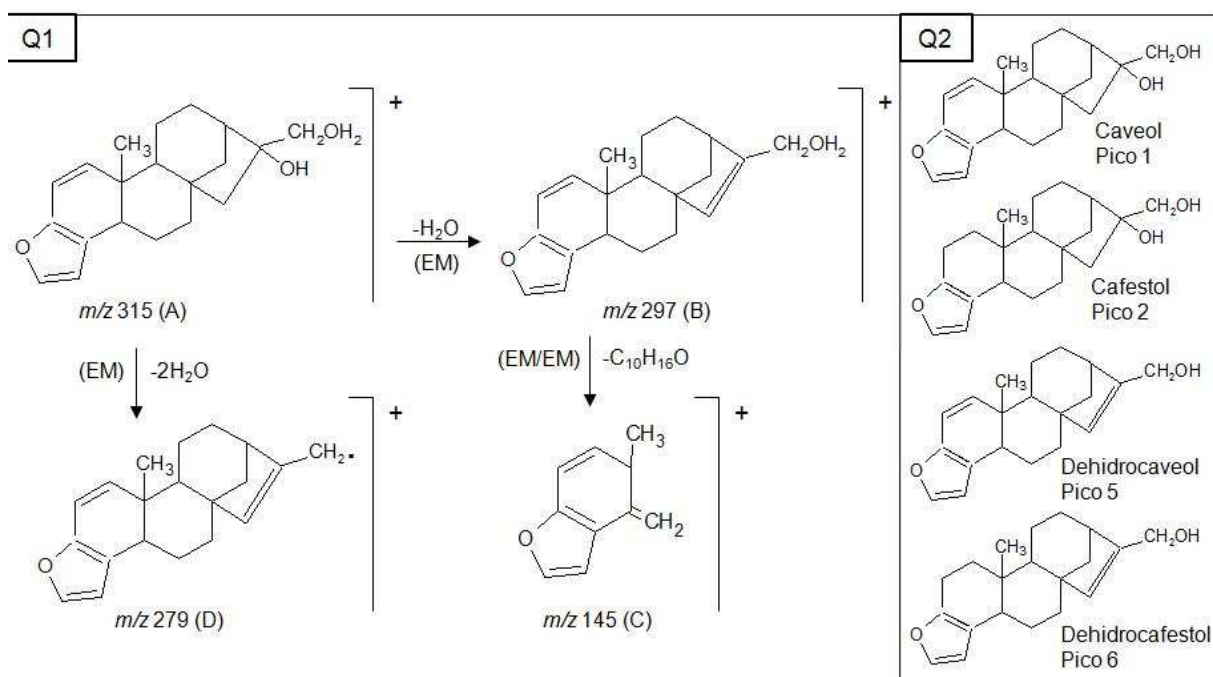


Figura 7.6 – (Q1) Fragmentos gerados pelo espectrômetro de massas para o pico 1 (caveol) da Figura 7.3 (café arábica): (A) pico da molécula protonada, (B) pico base, (C) fragmento típico da EM/EM para o pico de m/z 297 e (D) fragmento presente na EM e EM/EM citadas. (Q2) Estruturas para os compostos dos picos identificados.

Os resultados em conjunto confirmaram a estrutura de caveol (pico 1), cafestol (pico 2), dehidrocaveol (pico 5) e dehidrocafestol (pico 6) (Figura 7.3). Os

dehidroditerpenos mostraram picos do íon molecular de m/z 297, para o dehidrocaveol (perda de uma molécula de água no processo de torra) e m/z 299 (analogamente para cafestol), além dos picos base m/z 279 e 281 (perda de uma molécula de água na fragmentação para o dehidrocaveol e dehidrocafestol, respectivamente).

Speer e Kölling-Speer (2006) mencionaram para amostras de cafés torrado e moído comerciais avaliadas por CLAE-EM, além dos compostos identificados neste trabalho (com mesma ordem de eluição), outros derivados de diterpenos que tiveram suas estruturas químicas elucidadas (isômeros), mas não foram quantificados. Nas amostras avaliadas no presente trabalho, porém, o perfil cromatográfico observado não permitiu a quantificação de tais compostos, visto o tamanho muito reduzido dos picos. Mesmo a avaliação qualitativa pelo detector por EM exige quantidades maiores dos compostos e melhor definição para gerar uma pureza de fragmentação suficiente para viabilizar a interpretação dos resultados com segurança. Guerrero, Suárez e Moreno (2005) relataram a presença de dehidroditerpenos e iso-componentes em grãos verdes, mas empregando CG com temperatura de injetor de 280°C. Provavelmente os derivados diterpênicos citados seriam artefatos da metodologia aplicada, concordando com o questionamento de Speer e Kölling-Speer (2006) sobre avaliações de amostras de café por CG.

7.4.3 Variação, com o grau de torra, dos teores de caveol, cafestol e dehidroderivados

A quantificação dos compostos diterpênicos, realizada por CLAE-DAD, permitiu verificar que durante a ampla faixa de intensidade de torra aplicada às amostras, houve variação dos teores de caveol e cafestol.

Inicialmente, para avaliar o comportamento dos compostos desconsiderando o efeito do aumento do teor de lipídios durante o processo de torra (item 7.4.1), expressou-se a concentração dos diterpenos em base lipídica (Figura 7.7). Observou-se uma tendência de degradação, mais intensa após 8 min, principalmente para café arábica onde caveol e cafestol variaram em 75 % (tempos de 2 a 10 min), enquanto que a variação foi de 58 % para cafestol em conilon.

Verifica-se assim que, comparativamente, a perda de diterpenos é mais intensa na matriz de arábica. A degradação de caveol e cafestol não implicou na formação

proporcional dos dehidroderivados, sendo os degradados produzidos apenas após 8 min de torra. Possivelmente outros produtos de degradação foram formados (Figura 7.7). Speer e Kölling-Speer (2006) também relataram que após certo grau de torra, é possível que ocorra a formação de dehidroderivados, diminuindo o teor de caveol e cafestol, como discutido anteriormente.

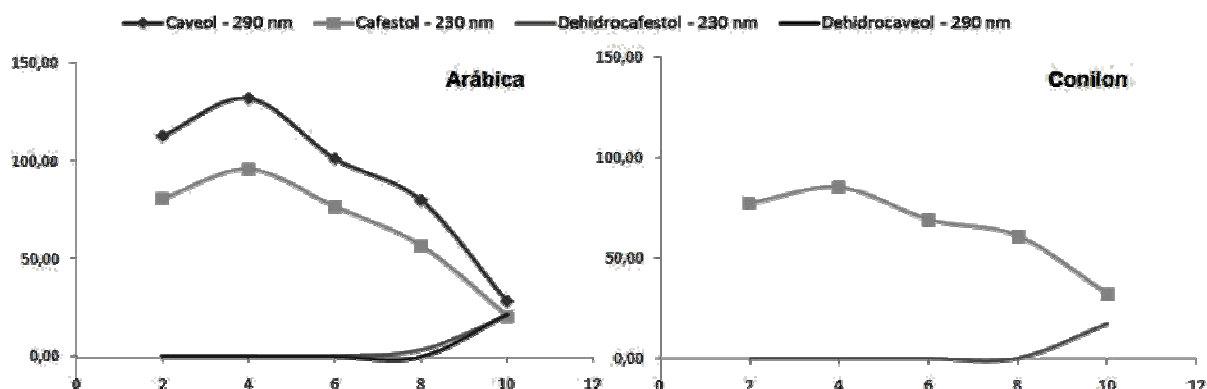


Figura 7.7 – Variação do teor dos compostos diterpênicos (mg/g de lipídios) com a intensidade do processo de torra (tempo em min), expresso *em base lipídica*.

Apesar de caveol e cafestol terem mostrado instabilidade ao tratamento térmico aplicado no processo de torra (Figura 7.7), para processamentos menos agressivos seus teores não diminuíram quando expressos considerando toda a matriz (mg/100 g de amostra em bs). Foi verificado que, até 8 min de torra, a tendência geral foi a manutenção ou pequena elevação da concentração desses diterpenos (Figura 7.8). Importante enfatizar que as amostras com tempo de 8 minutos são as que mais correspondem, em cor, ao grau de torra empregado no mercado brasileiro (item 7.4.1), sendo assim esse ponto o mais representativo para os cafés comerciais.

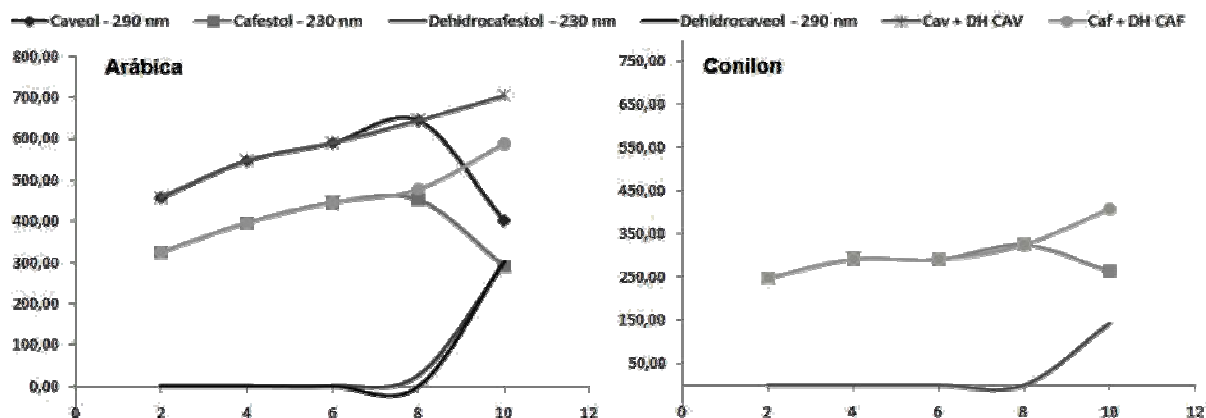


Figura 7.8 – Variação do teor dos compostos diterpênicos (mg/100 g de amostra em bs) com o grau de torra (tempo em min).

O aumento da concentração dos diterpenos com o grau de torra acompanhou de forma geral a elevação do teor de lipídios (Figura 7.1). A soma de cada diterpeno com seu respectivo dehidroderivado mostrou que após 8 min de torra, caveol se degrada, em grande parte, em dehidrocaveol (o mesmo para cafestol e dehidrocafestol) (Figura 7.8).

O teor de caveol variou de 457 (\pm 67) mg/100 g de café arábica de 2 min de torra, chegando a um máximo de 644 (\pm 152) mg/100 g e sendo reduzido até 10 min de torra (401 \pm 97 mg/100 g). A partir de 8 minutos, simultaneamente à degradação de caveol, o dehidrocaveol foi formado, chegando a 303 (\pm 31) mg/100 g na torra mais intensa (Figura 7.8).

O cafestol, presente em ambas as espécies, apresentou comportamento semelhante ao caveol (Figura 7.8). Avaliando-se o café arábica, os teores variaram de 326 (\pm 45) mg de cafestol/100 g de amostra (2 min) até 452 (\pm 67) (8 min), reduzindo-se para 292 (\pm 77) mg/100 g (amostra 10 min). O teor de dehidrocafestol nesta espécie de café chegou a 295 (\pm 174) mg/100 g de amostra de torra 10 min. No *C. canephora*, o cafestol teve seu máximo de 325 (\pm 14) (8 min), diminuindo para 264 (\pm 93) mg/100 g de amostra (10 min), com formação de dehidrocafestol (143 \pm 39 mg/100 g de amostra) (Figura 7.8).

Uma vez que o método apresentou boa precisão (CV inferior a 5 % para ensaios de repetibilidade) (DIAS et al., 2009b), os desvios-padrão altos (média dos CV de 20 %) observados neste trabalho para avaliações de amostras com repetição de processo de torra podem ser atribuídos à dificuldade em se reproduzir uma

mesma intensidade de torra, mesmo padronizando-se as condições (tempo e temperatura) de processo.

Os valores de caveol e cafestol encontrados estão na faixa descrita na literatura. Para o café arábica, foi reportado entre 100 e 930 mg de caveol e entre 100 e 700 mg de cafestol por 100 g de amostra. Para o conilon, foram verificados desde a ausência de caveol até sua presença em quantidades traço (< 13 mg/100 g), e de 75 a 370 mg de cafestol/100 g de amostra (DIAS et al., 2009b; RUBAYIZA; MEURENS, 2005; KURZROCK; SPEER, 2001a, LAGO, 2001; URGERT et al., 1995; FREGA; BOCCI; LERCKER, 1994; PETTITT JR., 1987).

Não foram encontrados dados na literatura sobre o teor de dehidroderivados. Speer e Kölling-Speer (2006) relataram que a razão cafestol/dehidrocafestol seria um bom indicativo do grau de torra do café, e que valores abaixo de 15 corresponderiam a cafés muito torrados. Observou-se para café arábica com 8 min, relação de aproximadamente 18, e para cafés arábica e conilon com 10 min a relação ficou entre 1 e 2, indicando torra de grau muito intensa.

Quanto à manutenção dos teores no processo, Urgert et al. (1995) também citaram que uma torra de grau intenso não reduziu a concentração de diterpenos no café arábica, que é de 1300 mg/100 g de amostra para a soma de caveol e cafestol. Os valores se mantiveram após o processo de torra dos grãos: 560 mg de cafestol/100 g e 730 mg de caveol/100 g.

Uma vez que a intensidade de torra contribui, relativamente, pouco para alterações nos teores de diterpenos, ainda que se considere a diversidade na origem geográfica das amostras, há uma indicação que a principal justificativa para a discrepância de valores de concentração de caveol e cafestol encontrados na literatura é a variação analítica, conforme proposto por DIAS et al. (2009a).

Tendo em vista que, independentemente do grau de torra, os teores de cafestol e, principalmente, caveol se mantêm relativamente constantes e diferenciados entre cafés arábica e conilon, evidencia-se que esses diterpenos apresentam bom potencial para uso como discriminadores das espécies em cafés com diferentes graus de torra.

7.5 CONCLUSÕES

O grau de torra influenciou os teores de caveol e cafestol de forma semelhante nas matrizes de *C. arabica* e *C. canephora*, mas o efeito foi dependente da intensidade do processo. Após torra de intensidade semelhante à empregada para produtos comerciais, ocorreu degradação dos diterpenos com simultânea formação de dehidrocaveol e dehidrocafestol, indicando instabilidade de cafestol e, notadamente, caveol a processos térmicos mais agressivos. No entanto, tendo em vista a concentração relativa dos lipídios durante o processo de torra, os teores de caveol e cafestol mantiveram-se estáveis, reforçando o potencial desses diterpenos como indicadores de adição de café conilon ao arábica em produtos com diferentes graus de torra.

7.6 COLABORADORES

Adelia Ferreira de Faria, Adriana Zerlotti Mercadante, Neura Bragagnolo

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

7.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 02 jul. 2009.

ASSAD, E. D.; SANO, E. E.; CUNHA, S. A. R.; CORREA, T. B. S.; RODRIGUES, H. R. Identificação de impurezas e misturas em pó de café por meio de comportamento espectral e análise de imagens digitais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 211-216, 2002.

BOEKSCHOTEN, M. V.; ENGBERINK, M. F.; KATAN, M. B.; SCHOUTEN, E. G. Reproducibility of the serum lipid response to coffee oil in healthy volunteers. **Nutrition Journal**, London, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2003.

CAMPANHA, F. G. **Desenvolvimento de metodologia analítica para diferenciação de café torrado arábica (*Coffea arabica*) e conilon (*Coffea canephora*) e misturas**. 2008. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CASTILLO, M. L. R.; HERRAIZ, M.; BLANCH, G. P. Rapid analysis of cholesterol-elevating compounds in coffee brews by off-line high performance liquid

chromatography / high resolution gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.47, n. 4, p. 1525-1529. 1999.

CAVIN, C.; HOLZHÄUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W. W.; SCHILTER, B. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 8, p.1155-1163, 2002.

DIAS, R. C. E. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) em diferentes graus de torra**. 2005. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

DIAS, R. C. E; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.; BRAGAGNOLO, N.; BENASSI, M. T. Influência do método de preparo de amostra para avaliação de caveol e cafestol em café torrado. **Química Nova**, São Paulo, 2009a (a ser enviado).

DIAS, R. C. E; CAMPANHA, F. G.; VIEIRA, L. G. E.; FERREIRA, L. P.; POT, D.; MARRACCINI, P.; BENASSI, M. T. Metodologia para avaliação de caveol e cafestol em folhas e tecidos de frutos de cafeeiro e em café torrado. **Química Nova**, São Paulo, 2009b (a ser enviado).

DUARTE, S. M. S.; ABREU, C. M. P.; MENEZES, H. C.; SANTOS, M. H.; GOUVÊA, C. M. C. P. 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.

FREGA, N.; BOCCI, F.; LERCKER, G. High resolution gas chromatographic method for determination of robusta coffee in commercial blends. **Journal of High Resolution Chromatography**, Weinheim, v. 17, n. 5, p. 303-307, 1994.

GUERRERO, G.; SUÁREZ, M.; MORENO, G. Chemosystematic study of diterpenoids in green coffee beans. In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC COLLOQUIUM ON COFFEE (ASIC), 20, 2005, Paris. **Proceedings...** Paris, 2005. p. 292-296.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 46, n. 2, p. 101-123, 2006.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Diterpenes and diterpene esters in coffee. **Food Reviews International**, New York, v. 17, n. 4, p. 433-450, 2001a.

KURZROCK, T.; SPEER, K. Identification of kahweol fatty acid esters in arabica coffee by means of LC/MS. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v.24, n. 10-11, p.843-848, 2001b.

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

LERCKER, G.; FREGA, N.; BOCCI, F.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. High resolution gas chromatographic determination of diterpenic alcohols and sterols in coffee lipids. **Chromatographia**, Oxford, v. 41, n. 1-2, p. 29-33, 1995.

LOPES, L. M. V. **Avaliação da qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2000. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MORRISON, Robert T., BOYD, Robert N. **Organic Chemistry**. 7. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2008.

NICOLAU-SOUZA, R. M.; CANUTO, G. A. B.; DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. T. Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. **Química Nova**, 2009 (em análise).

PETTITT JUNIOR, B. C. Identification of the diterpene esters in arabica and canephora coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 35, n. 4, p. 549-551, 1987.

OOSTERVELD, A.; VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H. A. Effect of roasting on the carbohydrate composition of *Coffea arabica* beans. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 54, n. 2, p. 183-192, 2003.

REDGWELL, R. J.; TROVATO, V.; CURTI, D.; FISCHER, M. Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in arabica coffee beans. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 337, n. 5, p. 421-431, 2002.

ROOS, B.; VAN DER WEG, G.; URGERT, R.; VAN DE BOVENKAMP, P.; CHARRIER, A.; KATAN, M. B. Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant *Coffea*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 45, n. 8, p. 3065-3069, 1997.

RUBAYIZA, A. B.; MEURENS, M. Chemical discrimination of arabica and robusta coffees by Fourier Transform Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 53, n. 12, p. 4654-4659, 2005.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 201-216, 2006.

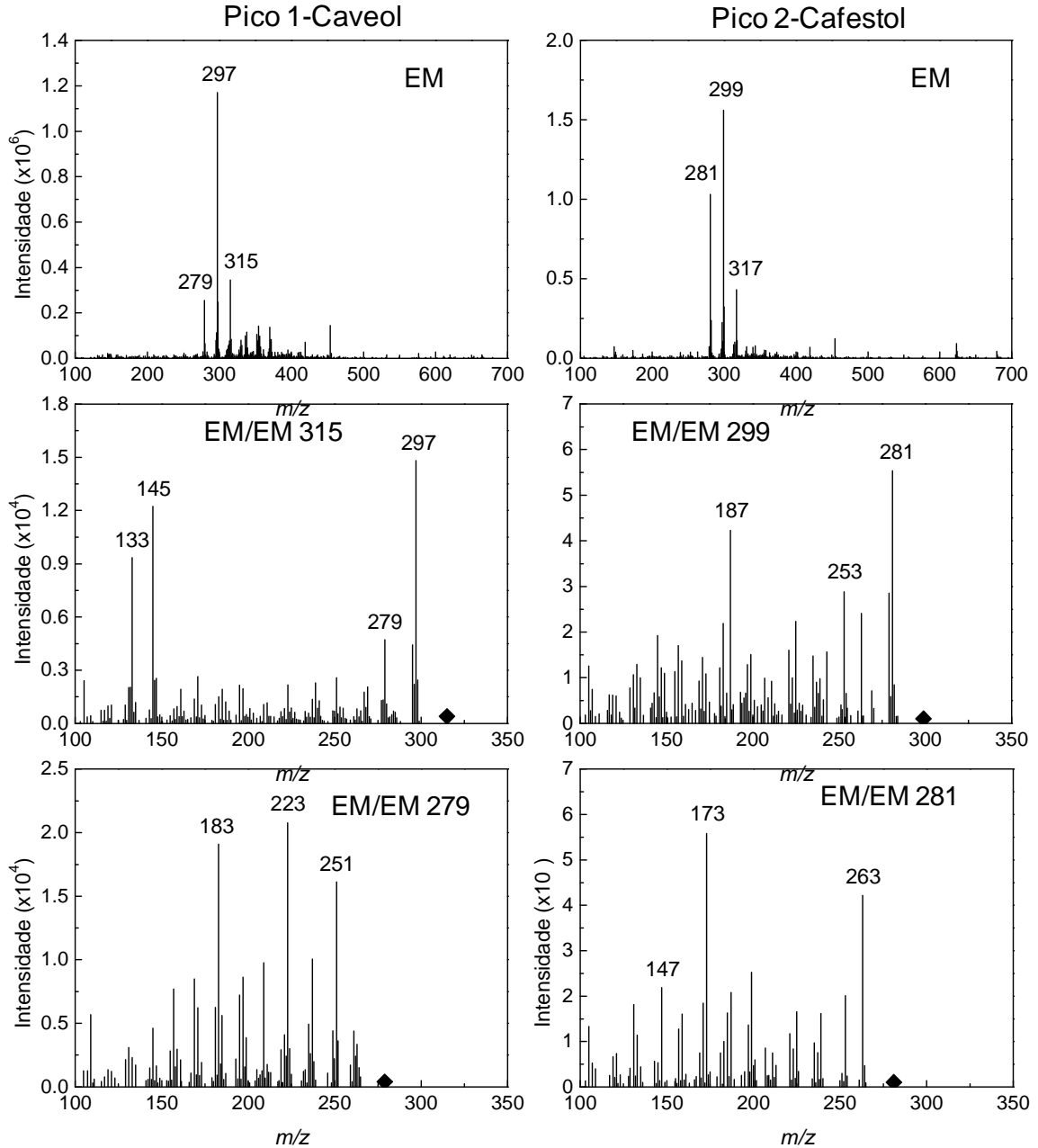
TRUGO, Luiz C. Analysis of coffee products In: CABALLERO, Benjamin (Org). **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. 2 ed. Londres: Academic Press, v.3, 2003, p. 1498-1506.

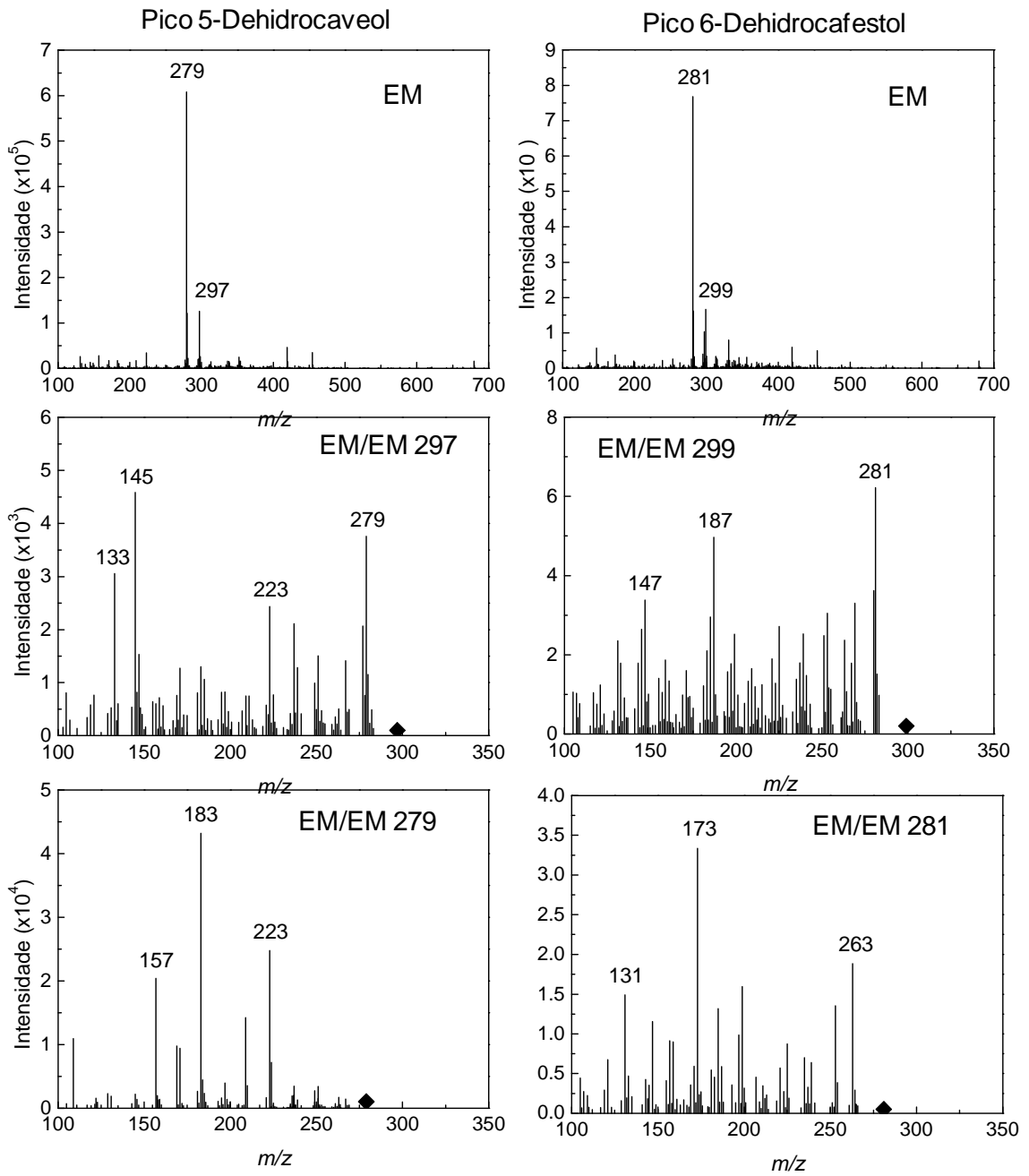
URGERT, R.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUIJL, T. G.; VAN DE BOVENKAMP, P.; HOVENIER, R.; KATAN, M.B. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 43, n. 8, p. 2167-2172, 1995.

VÉKEY, K.; Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, n. 2, p. 227-236, 2001.

7.8 MATERIAL SUPLEMENTAR

Espectros de massas para a primeira fragmentação (EM) do pico cromatográfico de interesse (Figura 7.3) e segunda fragmentação (EM/EM) para os principais picos encontrados na primeira.





CONCLUSÃO GERAL

CONCLUSÃO

A metodologia cromatográfica foi validada e mostrou-se eficiente para análise de caveol e cafestol em tecidos do cafeeiro, frutos frescos e café torrado das espécies *C. arabica* e *C. canephora*. As melhores condições foram obtidas utilizando-se coluna de fase reversa Spherisorb ODS-1, fase móvel acetonitrila/H₂O e detecção no UV. O método por saponificação direta a quente demonstrou melhor desempenho para a extração de diterpenos comparado aos métodos de Bligh Dyer, Soxhlet e saponificação direta a frio. Uma metodologia alternativa, por Espectrofotometria, mais rápida e simples, foi validada para quantificação de caveol, podendo ser aplicada como triagem na identificação de espécies em amostras torradas.

A metodologia por CLAE mostrou ampla aplicação permitindo a quantificação de caveol e cafestol nas diferentes matrizes estudadas. Caveol esteve ausente em botão floral e pericarpo de *C. arabica* e em todos os tecidos de *C. canephora* avaliados. Cafestol, distribuído mais amplamente, não ocorreu apenas em folhas *C. canephora*. Perisperma e endosperma mostraram maiores teores de diterpenos; observou-se diminuição de caveol e cafestol em perisperma correspondente ao aumento no endosperma, comportamento atribuído a interconversão dos tecidos durante a maturação. Para *C. arabica*, constatou-se altas concentrações de caveol e maiores teores de cafestol que para *C. canephora*.

O grau de torra influenciou os teores de caveol e cafestol de forma semelhante nas espécies *C. arabica* e *C. canephora*. Ocorreu degradação dos diterpenos com simultânea formação de dehidrocaveol e dehidrocafestol em amostras com torras mais intensas às dos produtos comerciais. Entretanto, tendo em vista a estabilidade dos lipídios e a perda de outros componentes não lipídicos durante o processo de torra, os teores de caveol e cafestol mantiveram-se estáveis.

A diferença na composição das espécies e a manutenção do teor dos diterpenos com o processo de torra evidencia a eficiência da utilização de caveol e cafestol como ferramenta para a avaliação da adição de café conilon ao arábica em produtos torrados.