



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Elisa Franco Ribeiro

Efeito do extrato de cascas de café (*Coffea arabica* L.) na
estabilidade oxidativa do óleo de soja

São José do Rio Preto
2016

Elisa Franco Ribeiro

Efeito do extrato de cascas de café (*Coffea arabica* L.) na
estabilidade oxidativa do óleo de soja

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração - Ciência e Tecnologia de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Neuza Jorge

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Débora Maria
Moreno Luzia

São José do Rio Preto
2016

Ribeiro, Elisa Franco.

Efeito do extrato de cascas de café (*Coffea arabica* L.) na estabilidade oxidativa do óleo de soja / Elisa Franco Ribeiro. -- São José do Rio Preto, 2016

100 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Neuza Jorge

Coorientador: Débora Maria Moreno Luzia

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Óleos vegetais - Análise. 3. Café - Subprodutos. 4. Antioxidantes. 5. Fenóis. 6. Óleo de soja.
I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 664.34

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Elisa Franco Ribeiro

Efeito do extrato de cascas de café (*Coffea arabica* L.) na
estabilidade oxidativa do óleo de soja

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração - Ciência e Tecnologia de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Neuza Jorge
UNESP - São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. David Ariovaldo Banzatto
UNESP - Jaboticabal

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina da Silva
UFTM - Uberaba

São José do Rio Preto
13 de outubro de 2016

“Projetistas fazem canais,
arqueiros airam flechas,
artífices modelam a madeira e o barro,
o homem sábio modela-se a si mesmo.”

(Buda)

Aos meus pais Maurício e Leila,
ao meu irmão Christiano e ao meu
namorado Tiago,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sua presença constante, por me amparar nas dificuldades e me guiar nas horas incertas.

À orientadora Prof^a Dr^a Neuza Jorge e coorientadora Prof^a Dr^a Débora Maria Moreno Luzia, pela contribuição em minha formação acadêmica.

Ao técnico do Laboratório de Óleos e Gorduras, Luiz Carlos Camolezi, pelo apoio, paciência e pelos momentos de descontração.

Aos colegas Yara, Milena, Luciene, Wellington, Liara, Mara, Irene, Marília, Carol, Jenifer, Raul e Mirian, pelo companheirismo, conselhos e suporte.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da comissão examinadora, pelas críticas e sugestões.

Ao Tiago, pela paciência e compreensão nos momentos difíceis, pelos momentos de alegria e pelo incentivo para seguir em frente.

Aos meus pais Maurício e Leila, meu irmão Christiano, pelo incentivo, apoio, dedicação e carinho, por estarem sempre ao meu lado.

A todos que me apoiaram e que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O Brasil é o maior produtor e exportador de café, sendo responsável por 32% da produção agrícola mundial. Este vasto cultivo do café, concentrado principalmente na região sudeste do país, implica na geração de alta quantidade de resíduos provenientes do processo de remoção da casca. A casca do café pode ser removida do grão a partir de dois principais processamentos: via seca e via úmida. Como medida de redução do impacto ambiental e promoção das características tecnológicas dos resíduos, o objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades antioxidantes de extratos hidroalcoólicos obtidos para as diferentes cascas de café, buscando as melhores condições de extrato a ser aplicado ao óleo de soja a fim de obter informações sobre o potencial redutor da oxidação. A produção do extrato seguiu um delineamento central composto rotacional, variando a proporção de etanol (de 41 a 98%) e o tempo de aplicação do ultrassom (11 a 68 min) no meio. Como resposta ao planejamento experimental, obteve-se o rendimento de volume de extrato, o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP. Melhores resultados foram encontrados para extratos de cascas obtidas por via seca utilizando solventes hidroalcoólicos com proporções entre 40 e 50% de etanol por 40 a 60 minutos de aplicação de ultrassom. O óleo de soja foi adicionado de extrato de cascas de café obtido com melhores condições de extração, na concentração de 200 mg/kg de compostos fenólicos, e também adicionado de antioxidantes sintéticos BHA e TBHQ na mesma concentração. Os tratamentos foram submetidos ao aquecimento acelerado em estufa a 60°C por 20 dias e avaliados quanto à estabilidade oxidativa. Embora o antioxidante TBHQ tenha apresentado melhor eficiência na inibição da oxidação, o extrato de cascas de café apresentou efeito sinérgico quando utilizado com o sintético, retardando o aparecimento de produtos da degradação, possibilitando, assim, a redução na concentração do antioxidante sintético a ser aplicado ao óleo.

Palavras-chave: Óleos vegetais. Atividade antioxidante. Estabilidade oxidativa. Subprodutos. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

Brazil is the largest coffee producer and exporter, accounting for 32% of world agricultural production. This vast coffee cultivation, mainly placed in the southeast of country, generates high amounts of waste from the husks removal process. Coffee husks can be removed from the grain by two main processes: wet and dry procedures. In order to reduce the environmental impact and promote the technological characteristics of the residues, the aim of this study was to evaluate the antioxidant properties of hydroalcoholic extracts obtained from the different coffee husks, looking for the best conditions to produce an extract to be applied in soybean oil in order to get some information about the oxidation power reducer. The extract production followed a central composite rotational design, varying the proportion of ethanol (41 to 98%) and the ultrasound application time (11 to 68 min). In response to experimental design, it was obtained the yield of extract volume, the total phenolic compounds, the antioxidant activity by DPPH and FRAP methods. Best results were obtained for husks extracts from dry process using solvent in a proportion between 40 and 50% of ethanol treated during 40 to 60 min with ultrasound. Soybean oil was added by coffee husks extract obtained from best conditions, at the concentration of 200 mg/kg of phenolic compounds, as well as added by synthetic antioxidants at the same concentration. Treatments were subjected to acceleration heating in an oven at 60°C for 20 days and evaluated for oxidative stability, the peroxide value, conjugated dienes, tocopherols retention and weight gain. Although TBHQ antioxidant has shown improved efficiency in inhibiting oxidation, coffee husks extracts showed a synergistic effect when used with synthetic, delaying the onset of degradation products, thus enabling the reduction in the concentration of synthetic antioxidant to be applied into the oil.

Keywords: *Vegetables oil. Antioxidant activity. Oxidative stability. By-products. Phenolic compounds.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos triacilgliceróis.	21
Figura 2 - Mecanismo de ação da oxidação lipídica.	23
Figura 3 - Mecanismo de ação dos antioxidantes primários.	28
Figura 4 - Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos.	29
Figura 5 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoico (a) e hidroxicinâmico (b).	33
Figura 6 - Estrutura química do radical DPPH e sua reação com um antioxidante.	35
Figura 7 - Cafeeiro pertencente à família botânica Rubiaceae.	38
Figura 8 - Composição da estrutura do grão (a, c) e casca (b) do café.	42
Figura 9 - Cascas obtidas dos processamentos via seca (a) e úmida (b). ...	43
Figura 10 - Modelo do ultra-turrax utilizado na obtenção dos extratos.	45
Figura 11 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para rendimento de extrato de cascas de café obtidas pelo processamento via seca.	54
Figura 12 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para rendimento de extrato de cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.	56
Figura 13 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para FT para cascas de café obtidas pelo processamento via seca.	58
Figura 14 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para FT para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.	61

Figura 15 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para atividade antioxidante pelo método DPPH para cascas de café obtidas pelo processamento via seca.	65
Figura 16 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para atividade antioxidante representada pelo método DPPH para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.	67
Figura 17 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para atividade antioxidante pelo método FRAP para cascas de café obtidas pelo processamento via seca.	69
Figura 18 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para atividade antioxidante pelo método FRAP para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.	71
Figura 19 - Relação entre a análise do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) para os extratos de cascas de café obtidas pelo processamento via seca.	73
Figura 20 - Relação entre a análise do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) para os extratos de cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.	73
Figura 21 - Taxa de oxidação em termos de ganho de massa das amostras submetidas à estocagem acelerada em estufa.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis utilizados para codificação das variáveis estudadas.	44
Tabela 2 - Planejamento experimental realizado para ambas as cascas baseado em um DCCR.	46
Tabela 3 - Respostas obtidas para os diferentes ensaios realizados para as cascas obtidas pelos processamentos via seca e via úmida, para Rendimento (%), FT (meq AG/g), DPPH (meq trolox/g) e FRAP (meq trolox/g).	52
Tabela 4 - Efeitos estimados para rendimento de extratos de cascas de café obtidas pelo processamento via seca.	53
Tabela 5 - Efeitos estimados para rendimento de extratos de cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.	53
Tabela 6 - Efeitos estimados para teor de compostos fenólicos totais para cascas de café obtidas pelo processamento via seca.	57
Tabela 7 - Efeitos estimados para teor de compostos fenólicos totais para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.	59
Tabela 8 - Perfil de compostos fenólicos (mg/kg) nos extratos vias seca e úmida.	62
Tabela 9 - Efeitos estimados para atividade antioxidante representada pelo método DPPH para cascas de café obtidas pelo processamento via seca. ...	64
Tabela 10 - Efeitos estimados para atividade antioxidante representada pelo método DPPH para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida. .	64
Tabela 11 - Efeitos estimados para atividade antioxidante representada pelo método FRAP para cascas de café obtidas pelo processamento via seca.	68
Tabela 12 - Efeitos estimados para atividade antioxidante representada pelo método FRAP para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida. ..	70

Tabela 13 - Médias de estabilidade oxidativa (h) das amostras submetidas à estocagem acelerada em estufa.	74
Tabela 14 - Médias de índice de peróxidos (meq/kg) das amostras submetidas à estocagem acelerada em estufa.	76
Tabela 15 - Médias de dienos conjugados (%) das amostras submetidas à estocagem acelerada em estufa.	79
Tabela 16 - Médias dos teores de tocoferóis (mg/kg) presentes nas amostras submetidas à estocagem acelerada em estufa.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A [•]	Radical inerte
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácido gálico
AH	Antioxidante com um átomo de hidrogênio
ANOVA	Análise de variância
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
C	Ponto central
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DCCR	Delineamento Central Composto Rotacional
DPPH	Radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EC	Extrato de casca de café
F _{calc}	Valor F calculado
Fe ²⁺	Complexo ferroso
Fe ³⁺	Complexo férrico
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
FT	Fenólicos totais
F _{tab}	Valor F tabelado
G.L.	Graus de liberdade
GP	Galato de propila
IP	Índice de peróxidos
KI	Iodeto de potássio
L	Linear
¹ O ₂	Oxigênio singlete
p	Probabilidade de significância
Q	Quadrática
r	Coefficiente de correlação de Pearson
R [•]	Radical livre
R ²	Coefficiente de determinação
Rend.	Rendimento de volume

RH	Ácido graxo insaturado
ROO [·]	Radical peróxido
ROOH	Hidroperóxido
ROOR	Produto estável de degradação
RR	Produto estável de degradação
t	Tempo de ultrassom (min)
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
TPTZ	2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina
UV	Ultravioleta
X	Proporção de etanol (%)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 ÓLEOS E GORDURAS	20
3.2 ÓLEOS VEGETAIS	20
3.3 OXIDAÇÃO LIPÍDICA	22
3.3.1 Iniciação	23
3.3.2 Propagação	24
3.3.3 Terminação	24
3.4 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA	25
3.5 ANTIOXIDANTES	27
3.5.1 Antioxidantes sintéticos	29
3.5.2 Antioxidantes naturais	30
3.5.3 Avaliação da atividade antioxidante	34
3.6 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	35
3.6.1 Tipo de solvente	36
3.6.2 Ultrassom	36
3.7 CAFÉ	38
3.7.1 Tipos de processamento	39
3.7.2 Subprodutos	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	43

4.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA	43
4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO VEGETAL E ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS	44
4.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	44
4.4 ESTOCAGEM ACELERADA EM ESTUFA	46
4.5 MÉTODOS	47
4.5.1 Análises nos extratos	47
4.5.2 Análises nos óleos	48
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Análises nos extratos	51
5.2 Análises nos óleos	72
6 CONCLUSÕES	84
7 REFERÊNCIAS	86
APÊNDICES	94

1 INTRODUÇÃO

A oxidação lipídica é uma das principais causas da deterioração de óleos e gorduras, ocasionada pela quebra das duplas ligações com a formação de radicais livres, responsáveis por modificações nos odores e sabores. A qualidade sensorial, bem como nutricional e funcional são afetadas pela autooxidação, principalmente pela perda de ácidos graxos essenciais, carotenoides, tocoferóis e fitoesteróis, e pela formação de substâncias tóxicas.

A deterioração lipídica pode ser minimizada através da prevenção ao acesso de oxigênio, uso de baixas temperaturas, inativação de enzimas que catalisam a reação de oxidação e utilização de embalagens adequadas. Além disso, outra maneira de proteção de óleos e gorduras é a utilização de antioxidantes, sintéticos ou naturais, os quais são capazes de retardar ou inibir a oxidação lipídica quando submetidos a altas temperaturas. Entre os tipos sintéticos, os mais frequentemente usados para preservar alimentos são butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), galato de propila (GP) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ). Porém, estudos têm demonstrado que o uso contínuo destes compostos pode acarretar efeito tóxico e também carcinogênico ao organismo. Devido a este fato, pesquisadores têm buscado cada vez mais extrair antioxidantes naturais de fontes vegetais para substituir os sintéticos e preservar a saúde do consumidor.

Diversas plantas têm sido estudadas como fontes de compostos antioxidantes naturais potencialmente seguros para a indústria alimentar, sendo os polifenóis os mais encontrados. Sendo assim, a utilização de muitos vegetais tem sido proposta para a proteção contra a oxidação lipídica. Entretanto, é possível obter esses compostos não somente a partir de alimentos *in natura*. Países como o Brasil, que possuem a economia fortemente baseada no agronegócio, geram grandes quantidades de resíduos agroindustriais, os quais, embora sejam considerados problemas ambientais, são fontes ricas de compostos bioativos, incluindo as substâncias antioxidantes.

A indústria cafeeira tem grande importância no mercado mundial, sendo o Brasil o maior produtor de café, concentrando a maior parte da sua produção nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e São Paulo. Anualmente são

geradas milhões de toneladas de resíduos sólidos em nível mundial, representados pelas cascas e polpas provenientes do beneficiamento. Estes subprodutos da cultura cafeeira estão sendo alvo de pesquisas por conterem substâncias antioxidantes, entre os principais, os ácidos cafeico, tânico, vanílico, clorogênico e gálico.

Tendo em vista a alta geração de resíduos contendo compostos bioativos e o interesse em substituir antioxidantes sintéticos por naturais, faz-se necessário o estudo do potencial antioxidante do extrato de cascas de café quando adicionado em óleo de soja submetido à estocagem acelerada em estufa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito dos extratos de cascas de café (*Coffea arabica* L.) na estabilidade oxidativa de óleo de soja sob estocagem acelerada em estufa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos das cascas de café provenientes do beneficiamento por vias seca e úmida, variando a composição do solvente e o tempo de aplicação de ultrassom.
- Medir a atividade antioxidante dos extratos por meio dos métodos DPPH e FRAP, bem como o teor de fenólicos totais por meio do reagente de Folin-Ciocalteu.
- Analisar o óleo de soja adicionado de extrato durante estocagem acelerada em estufa por meio das medidas de estabilidade oxidativa, índice de peróxidos, dienos conjugados, retenção de tocoferóis e ganho de massa.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ÓLEOS E GORDURAS

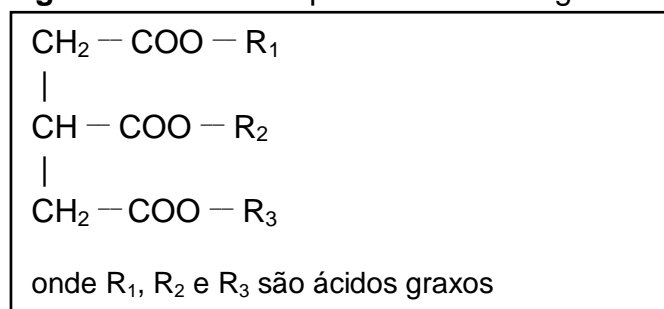
Óleos e gorduras são os principais constituintes dos lipídios, os quais, juntamente com as proteínas e carboidratos, compõem as três maiores classes dos alimentos. São caracterizados como insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Além disso, a principal propriedade que os diferencia é o estado físico em que se encontram à temperatura ambiente, ou seja, os óleos são líquidos e as gorduras, sólidas (BELITZ et al., 2009).

Como componentes essenciais das estruturas biológicas, os lipídios desempenham importantes funções na fisiologia humana, atuando como isolante térmico e promovendo proteção dos órgãos e da pele, além de serem precursores na síntese de compostos como hormônios e lipoproteínas (TURATTI; GOMES; ATHIÉ, 2002; JORGE, 2009).

Nos alimentos, os óleos e gorduras contribuem para as propriedades sensoriais em geral, como sabor, cor e textura, e atuam como meio de transferência de calor em frituras e processos de forneamento, promovendo qualidade e características desejáveis. Conferem valor nutritivo, uma vez que são fontes de energia e ácidos graxos essenciais como os ácidos linoleico e linolênico, além de atuarem como carreadores de vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) (DERGAL, 2006).

3.2 ÓLEOS VEGETAIS

Os óleos vegetais são constituídos predominantemente por triacilgliceróis (Figura 1), produtos da esterificação de ácidos graxos com glicerol. Os ácidos graxos representam uma grande porcentagem da composição dos óleos e são responsáveis pelas diferenças de estabilidade à oxidação, plasticidade, estado físico, padrão de cristalização, índice de iodo, e de temperaturas de solidificação e de fusão (JORGE, 2009).

Figura 1 - Estrutura química dos triacilgliceróis.

Fonte: Belitz; Grosh; Schieberle (2009)

De acordo com Silva, Borges e Ferreira (1999) e Allen e Hamilton (1994), os óleos vegetais que possuem níveis mais elevados de ésteres de ácidos graxos insaturados como por exemplo o oleico (18:1), linoleico (18:2) e linolênico (18:3) são encontrados na soja, amendoim, milho, canola, cártamo, trigo e arroz. Óleo de peixe e de outros animais marinhos são fontes dos maiores teores de ácidos graxos insaturados. Por outro lado, as gorduras de animais terrestres apresentam níveis mais altos de glicerídeos de ácidos graxos saturados como os ácidos palmítico (16:0) e esteárico (18:0).

O óleo de soja surgiu como subproduto do processamento do farelo de soja, e atualmente domina o mercado mundial de óleos. No Brasil, o consumo de óleo de soja corresponde a 95% do consumo total de óleos vegetais, sendo utilizado, dentre muitas aplicações, no preparo de assados, margarinas, maioneses e, preferencialmente, como base para frituras. Sua composição, do total de lipídios presentes, é representada por cerca de 85% de ácidos graxos insaturados, e destes, 60% são constituídos pelos ácidos graxos essenciais como o linoleico e linolênico. Os ácidos graxos saturados, como os ácidos palmítico e esteárico, representam 16,6%. Os tocoferóis constituem os componentes minoritários e são de grande importância devido a seu caráter vitamínico e antioxidante (JORGE, 2009).

Em comparação a outros óleos vegetais, o óleo de soja apresenta algumas vantagens: alto nível de insaturação; quando submetido à oscilação de temperatura relativamente ampla, o óleo se mantém líquido; capacidade de ser hidrogenado parcialmente; facilidade de remoção de fosfatos, restos de metais e sabões que permanecem após a extração; e presença de antioxidante natural - os tocoferóis. Por outro lado, há também as desvantagens como a presença de alta quantidade de

fosfatos, assim como os níveis elevados de ácido linolênico responsável pela reversão de seu sabor e odor (JORGE, 2009).

3.3 OXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os lipídios estão sujeitos a uma série de reações que podem levar a modificações de suas estruturas, afetando o valor nutricional e também os padrões de qualidade, como cor, odor, sabor e textura dos alimentos (DONNELLY; ROBINSON, 1995; SOARES, 2002). A oxidação lipídica é uma das principais reações deteriorativas que ocorre durante o processamento, distribuição, armazenamento e preparo final dos alimentos. É responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis nos alimentos, tornando-os impróprios para o consumo. Além disso, também provoca outras alterações que irão afetar a qualidade nutricional, a integridade e a segurança dos alimentos, através da formação de compostos potencialmente tóxicos (FRANKEL, 1980; NAWAR, 1985; ARUOMA, 1993; KUBOW, 1993).

Nos processos biológicos, a oxidação ocorre devido à formação de radicais livres no organismo, os quais agem diretamente sobre alguns componentes celulares. Os ácidos graxos da membrana lipoprotéica são susceptíveis à reação de oxidação desencadeada pelos radicais livres, o que afeta a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade. Além disso, estas moléculas podem reagir com aminoácidos constituintes da cadeia polipeptídica, proporcionando sua fragmentação, *cross linking*, agregação e, em certos casos, ativação ou inativação de algumas enzimas, resultando em alterações nas moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) e acarretando certas aberrações cromossômicas (ERENEL; ERBAŞ; ARICIOĞLU, 1993).

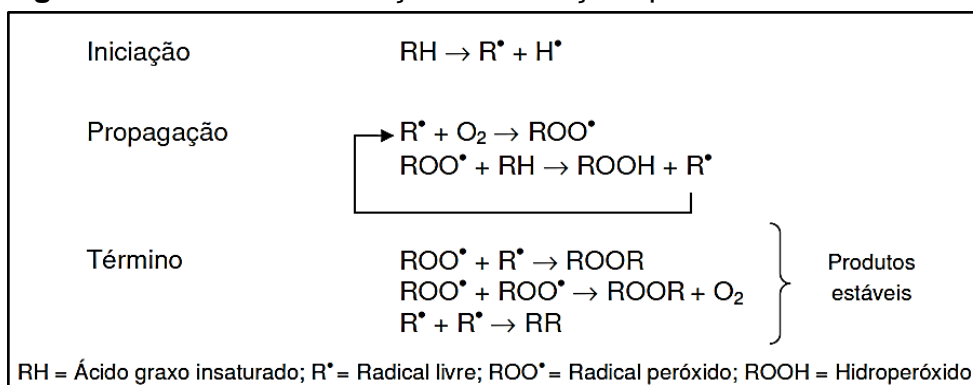
Nos alimentos, a degradação oxidativa dos ácidos graxos insaturados pode ocorrer por várias vias, em função do meio e dos agentes catalisadores. As reações hidrolíticas são catalisadas pelas enzimas lipases, presentes nas sementes oleaginosas, ou pela ação de calor e umidade, com formação de ácidos graxos livres, os quais aumentam a rancidez do óleo e, em menor quantidade, a formação

de metilcetonas e lactonas, podendo produzir aromas desagradáveis (O'BRIEN, 2008).

A fotoxidação de gorduras insaturadas é um mecanismo promovido essencialmente pela radiação UV em presença de sensibilizadores, como por exemplo, a clorofila e mioglobina, e envolve a participação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) como intermediário reativo. Este processo envolve reações com radicais livres, cujo resultado é a formação de hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência da luz e de sensibilizadores, e que, por degradação posterior, originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A autoxidação é um processo dinâmico de reação em cadeia induzido por radicais livres. Trata-se de um fenômeno puramente químico e bastante complexo, envolvendo reações capazes de auto propagação, e que dependem do tipo de ação catalítica (temperatura, íons metálicos, radicais livres, pH). O decurso da sequência reacional é classicamente dividido em iniciação, propagação e terminação, como demonstrado na Figura 2.

Figura 2 - Mecanismo de ação da oxidação lipídica.



Fonte: Belitz, Grosh; Schieberle (2009).

3.3.1 Iniciação

A primeira fase da autoxidação é caracterizada pela formação de radicais livres (R^\bullet). A presença de catalisadores, tais como luz visível, radiação ultravioleta, metais ou metaloproteínas proporciona a perda de um átomo de hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo insaturado (RH), ocasionando na

formação de átomos constituídos por elétrons não pareados nos orbitais externos. A presença de radicais livres torna a molécula altamente reativa e capaz de reagir com qualquer composto situado próximo a sua órbita externa, apresentando uma função oxidante ou redutora de elétrons. Esta fase é lenta e produz compostos inodoros (JORGE, 2009).

3.3.2 Propagação

Os radicais livres formados, susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico (O_2), originam o radical peroxila (ROO^\bullet), o qual, ao receber um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo insaturado (RH) produz hidroperóxidos (ROOH) e outro radical livre, contribuindo para a reação em cadeia. A sequência de reação é usualmente acompanhada pela mudança da posição da dupla ligação, dando origem aos isômeros de hidroperóxidos que frequentemente contêm grupos dienos conjugados. Os produtos primários da oxidação lipídica (peróxidos e hidroperóxidos) são de natureza instável e, com o decorrer da reação, se decompõem em compostos responsáveis pelo odor característico de ranço, como aldeídos, cetonas e ácidos (TOLEDO; ESTEVES; HARTMANN, 1985; MELO; GUERRA, 2002).

3.3.3 Terminação

Na última fase da autoxidação, devido à redução da quantidade de ácidos graxos insaturados presentes no sistema, as moléculas de radicais livres combinam-se originando produtos estáveis ($ROOR$ ou RR), os quais são conhecidos como produtos secundários da oxidação, como os epóxidos, compostos voláteis e não voláteis (TOLEDO; ESTEVES; HARTMANN, 1985; MELO; GUERRA, 2002). Nesta fase, as alterações são mais fortes, podendo resultar em mudanças na cor e na viscosidade do lipídio (JORGE, 2009).

Para evitar a oxidação lipídica, torna-se necessário minimizar a incidência de fatores que a favorecem, como os níveis de energia, temperatura e luz, que são responsáveis pela formação de radicais livres, e presença de traços metálicos, impedindo ao máximo o contato com oxigênio. Entretanto, além do controle de

interferentes, a formação dos radicais livres pode ser bloqueada através do uso de antioxidantes, os quais possuem a capacidade de diminuir a velocidade de reação ou prolongar o período de indução, retardando ou até mesmo inibindo a reação de oxidação (JORGE; GONÇALVES, 1998).

3.4 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A avaliação do estado de oxidação de óleos e gorduras é uma determinação importante a nível industrial, a fim de controlar e garantir a qualidade dos produtos comercializados. São vários os métodos utilizados para avaliar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. Cada método fornece informações sobre um estado particular do processo oxidativo, o qual varia em função das condições aplicadas e dos substratos lipídicos utilizados. Desta maneira, nenhum método correlaciona-se de modo perfeito com as modificações sensoriais produzidas no decurso das reações de oxidação (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

O parâmetro utilizado como indicador da reação oxidativa é o período de indução, ou seja, o tempo necessário para se atingir o nível de rancidez detectável (ANTONIASSI, 2001). A determinação não deve ser restrita a um determinado momento, sendo necessária ser efetuada ao longo do tempo, de forma a ser representativa da duração de vida do produto.

Para estimar a susceptibilidade à oxidação, o óleo (ou gordura) é submetido a uma oxidação acelerada, sob condições padronizadas, de modo que possam ser observados os sinais de deterioração. Desta maneira, podem ser utilizados a elevação de temperatura, a adição de metais, o aumento da pressão de oxigênio, a estocagem sob luz e agitação. Porém, o aquecimento é o meio mais utilizado e eficiente (FRANKEL, 1993; WAN, 1995).

No teste acelerado em estufa (*Schaal Oven Test*), os óleos são mantidos à temperatura de 60°C ou mais e analisados periodicamente mediante índice de peróxidos, análise sensorial, determinação de dienos conjugados, estabilidade oxidativa, entre outros (DROZDOWSKI; SZUKALSKA, 1987). Em estudo sobre a estabilidade de óleo de canola durante a vida de prateleira, Malcolmson et al. (1994) constataram que as alterações sensoriais sofridas em um dia de estocagem

acelerada em estufa equivalem às ocorridas em um mês de estocagem sob temperatura ambiente. Desta maneira, este teste possibilita conhecer a vida de prateleira do óleo, visto que os resultados fornecidos apresentam uma boa correlação com avaliação efetuada em condições ambientais de armazenamento (ANTONIASSI, 2001; GÓMEZ-ALONSO et al., 2007).

A estabilidade oxidativa do óleo se baseia na quantidade de ácidos de baixo peso molecular que são formados no final da fase de iniciação da oxidação dos triacilgliceróis, ou seja, da decomposição dos produtos primários (BELITZ; GROSH; SCHIEBERLE, 2009). Este método avalia o teor de ácidos voláteis, por condutimetria, utilizando o equipamento denominado Rancimat. A análise baseia-se no registro das variações da condutividade da água, na qual se faz a coleta dos ácidos de baixo peso molecular (BROINIZI et al., 2007). Neste método, um fluxo de ar passa pela amostra de óleo, mantida sob aquecimento em temperatura entre 100 e 140°C, borbulha em água deionizada e arrasta os ácidos carboxílicos voláteis formados pelo processo de oxidação. A solubilização destes ácidos, principalmente do ácido fórmico, faz com que ocorra aumento da condutividade elétrica da água, gerando uma curva de condutividade elétrica *versus* tempo. O período de indução é determinado pelo tempo necessário para provocar um aumento exponencial da condutividade da água (TALBOT, 2016).

A determinação da concentração de peróxidos refere-se a todas as substâncias que oxidam o iodeto de potássio. O índice de peróxidos (IP), pelo método iodométrico, mede o iodo produzido a partir da decomposição do iodeto de potássio pelos peróxidos, e exprime-se em miliequivalentes de oxigênio por quilograma de matéria graxa (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Os dienos conjugados, assim como os peróxidos, são produtos primários da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados formados pelo deslocamento de duplas ligações. Os dienos conjugados absorvem a 232 nm enquanto os produtos secundários da sua oxidação, em particular as α -dicetonas ou as cetonas insaturadas, apresentam um máximo de absorção a 272 nm. Desta maneira, os estados de evolução oxidativa diferem-se com base na relação $A_{272} \text{ nm}/A_{232} \text{ nm}$: quanto maior o valor da absorbância a 232 nm, mais elevado será o conteúdo de

peróxidos, correspondendo, portanto, ao início do processo de oxidação (FRANKEL et al., 1994; HUANG; FRANKEL; GERMAN, 1994).

A oxidação também pode ser avaliada através da medida do índice de acidez da fração lipídica, a qual corresponde à quantidade de mg de KOH necessária para neutralizar os ácidos graxos livres em 1g de amostra. Visto que a quantidade de ácidos graxos livres é formada de acordo com a incidência dos processos oxidativos, maior é o valor do índice de acidez (SOARES et al., 2012). Esta variável, não só relaciona os aspectos de qualidade da matéria-prima como também do processamento e do armazenamento do alimento.

Além das determinações dos produtos primários, o processo oxidativo pode ser avaliado através da formação dos produtos secundários, por meio dos testes do ácido tiobarbitúrico e *p*-anisidina. A medida da rancidez é realizada pelo teste de ácido tiobarbitúrico (TBA), que se baseia na reação do ácido-2-tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos formados durante a oxidação lipídica (SOARES et al., 2012). O índice de *p*-anisidina (IpA) é utilizado para avaliar a reação do reagente *p*-anisidina com os aldeídos formados na decomposição, resultando, em meio acético, na formação de um complexo de cor amarela (JORGE, 2009; SOARES et al., 2012).

3.5 ANTIOXIDANTES

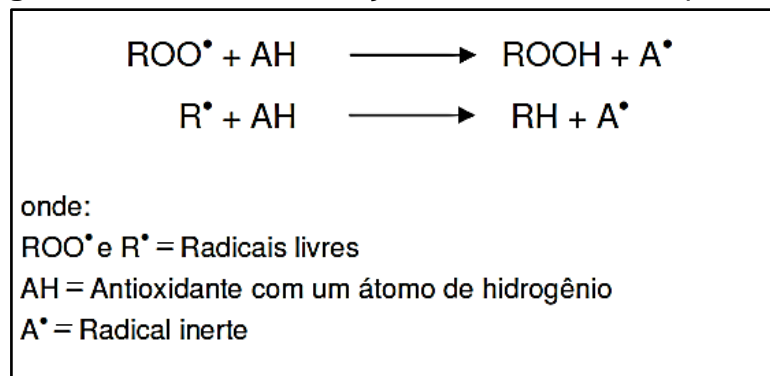
Durante a oxidação lipídica, os antioxidantes atuam de várias maneiras, como na formação de ligações com íons metálicos, bem como no sequestro de radicais livres e na decomposição dos peróxidos, impedindo o desencadeamento das reações oxidativas (MOURE et al., 2001).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos. Neste sentido, de acordo com seu mecanismo de ação, são classificados como primários e secundários (SOARES, 2002).

Os primários, representados pelos compostos fenólicos, atuam interrompendo a reação em cadeia através da transferência de hidrogênio ou elétrons aos radicais livres, transformando-os em produtos mais estáveis (A^{\bullet}) e inativos (ROOH e RH)

para a propagação das reações (ARAÚJO, 2006). A Figura 3 representa o mecanismo de transferência de hidrogênio dos antioxidantes primários.

Figura 3 - Mecanismo de ação dos antioxidantes primários.



Fonte: Jorge (2009).

Os antioxidantes secundários retardam a reação oxidativa por meio da complexação com metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos com consequente formação de compostos mais estáveis. O ácido cítrico é um agente quelante, o qual possui a capacidade de sequestrar íons metálicos como cobre e ferro que catalisam a oxidação lipídica. Já os removedores de oxigênio, como o ácido ascórbico, são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio através de reações químicas, tornando-o indisponível para propagar a autoxidação (GORDON, 1990).

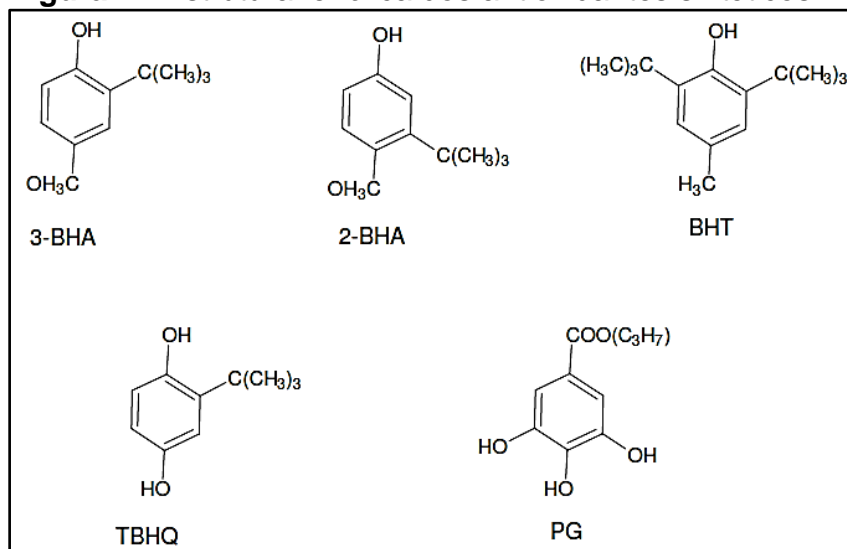
Dentro da classe dos antioxidantes secundários estão os sinergistas. Eles apresentam pouca ou nenhuma atividade antioxidante, contudo, são capazes de aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada. Ácidos cítrico, ascórbico e tartárico, e lecitina são bons exemplos de sinergistas (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002; RAMALHO; JORGE, 2006;).

Para ser empregado em alimentos, o antioxidante, além de ser efetivo em baixa concentração relativamente ao substrato a ser oxidado, deve apresentar afinidade com o substrato, não conferir odor ou sabor ao produto, ser estável ao processo de aquecimento e período de estocagem do produto alimentício e ser facilmente incorporado ao alimento (MELO; GUERRA, 2002).

3.5.1 Antioxidantes sintéticos

Nos alimentos, os antioxidantes adicionados podem ser sintéticos ou naturais. Os antioxidantes sintéticos mais utilizados são o BHA, BHT, TBHQ e GP. Estes apresentam estrutura fenólica (Figura 4), a qual permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula do acilglicerol e interrompendo a propagação da reação de oxidação. Embora não possuam cor, sabor e odor, a maioria deles perdem sua atividade antioxidante em temperaturas elevadas, tais como de fritura (ZHANG; WU; WENG, 2004).

Figura 4 - Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos.



Fonte: Dergal (2006).

Em gorduras animais e em óleos vegetais, o BHA é um antioxidante mais efetivo na inibição da oxidação, porém, apresenta pouca estabilidade frente a elevadas temperaturas (JORGE, 2009). Essas características são semelhantes para o antioxidante BHT, o qual apresenta boa solubilidade em gorduras animais e óleos vegetais e pouca resistência a temperaturas altas, proporcionando odor desagradável.

O TBHQ, antioxidante difenólico, é considerado o mais eficaz em óleos vegetais e, em relação a gordura animal, é tão efetivo quanto o BHA e mais efetivo que o BHT ou o GP (ORDOÑEZ, 2005). Apresenta boa estabilidade térmica e é

menos volátil que o BHT e BHA. Ácido cítrico e TBHQ apresentam excelente sinergismo em óleos vegetais (RAMALHO; JORGE, 2006).

O GP, embora seja eficiente em gorduras animais e óleos vegetais, apresenta baixa estabilidade térmica e, em níveis elevados, pode atuar como pró-oxidante (RAMALHO; JORGE, 2006).

Além de serem utilizados em alimentos, os antioxidantes também são usados em indústrias de produção de borracha, látex e plástico. A América do Norte, Europa e Ásia são responsáveis por 90% do consumo total de antioxidantes, entretanto, apenas 8% são usados em produtos alimentícios (FAN; ESKIN, 2015). No Canadá e na Comunidade Econômica Européia, o uso de TBHQ não é permitido (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002). Já a legislação brasileira limita as concentrações máximas de 200 mg/kg tanto para BHA quanto para TBHQ e de 100 mg/kg para BHT (BRASIL, 2005).

A crescente demanda social por produtos que contribuam com a melhoria da qualidade de vida, provenientes especialmente de fontes naturais, tem impulsionado pesquisas na busca por substâncias bioativas, como os compostos fenólicos, com potencial poder antioxidante, visando a substituição dos antioxidantes sintéticos ou até mesmo a associação a eles, possibilitando atividade sinérgica.

3.5.2 Antioxidantes naturais

Muitos vegetais contêm compostos com atividade antioxidante e têm sido estudados como fontes de antioxidantes naturais potencialmente seguros para a indústria alimentícia. Dos vários compostos já isolados, muitos são polifenóis de baixo e alto peso molecular, sendo assim propostos para proteção contra a oxidação de lipídios (HAGERMAN et al., 1998).

Os antioxidantes naturais podem ser encontrados e isolados de uma variedade de plantas. Entre as fontes de antioxidantes naturais estão incluídos grãos e sementes de oleaginosas, de cereais, sementes de frutas cítricas, castanhas e nozes, frutos, legumes e especiarias (JORGE, 2009).

A proteção que frutos e vegetais proporcionam contra diversas doenças tem sido atribuída aos diversos antioxidantes, como a vitamina C, vitamina E, o α -

tocoferol, β -caroteno e compostos polifenólicos. A vitamina E foi o primeiro antioxidante biológico estudado. Dentre os mais importantes antioxidantes fenólicos de fonte natural destacam-se os tocoferóis, os flavonoides e os ácidos fenólicos (DUGAN, 1980).

Subprodutos agroindustriais também estão sendo estudados como fontes atrativas de antioxidantes naturais como, por exemplo, as cascas de batata, cascas e sementes de uva e cascas de café. A borra de café obtida de indústrias de café é utilizada como antioxidante na preservação de alimentos e sua atividade se deve ao ácidos carboxílico 5-hidroxitriptamina. Outros compostos como proteínas, proteínas hidrolisáveis e peptídeos, bem como os produtos da reação de Maillard também foram relatados como agentes antioxidantes (MOURE et al., 2001).

Dois tipos de metabólitos estão presentes nos vegetais, são eles os primários e os secundários. Os metabólitos primários respondem pela sobrevivência do vegetal, exercendo função ativa nos processos de fotossíntese, respiração e assimilação de nutrientes, já os metabólitos secundários estão intimamente associados às estratégias de defesa das plantas, apresentando atividade biológica contra herbívoros, microrganismos e defesa contra situações de estresse e outros tipos de estímulos (SILVA et al., 2010; QUIÑONES; MIQUEL; ALEIXANDRE, 2012).

Os principais metabólitos secundários são distribuídos em três grupos de acordo com sua biossíntese, sendo eles os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos contendo nitrogênio (SILVA et al., 2010).

Dessa forma, os vegetais compreendem uma grande fonte de fitoquímicos que apresentam significativa atividade antioxidante. Dentre estes, os compostos fenólicos são amplamente utilizados na indústria de alimentos pela sua eficácia na prevenção da oxidação lipídica. Além de serem utilizados na conservação de alimentos aumentando a vida útil do produto entre 15 e 200%, os alimentos ricos nestes componentes possuem relação com baixa incidência de mortalidade por câncer (ACHKAR et al., 2013).

Devido a esses efeitos, os compostos fenólicos têm recebido grande atenção e interesse de estudos nos últimos anos. Eles são capazes de inibir a peroxidação lipídica, atuando na neutralização ou sequestro de radicais livres e na quelação de metais, agindo nas etapas de iniciação e propagação da peroxidação lipídica,

evitando, assim, a oxidação. Os produtos da ação dos compostos fenólicos são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático existente na estrutura, e, devido a sua capacidade redutora, permite a estes compostos obter uma alta atividade antioxidante (ACHKAR et al., 2013).

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza. Mais de 8.000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas, e esse grande e complexo grupo faz parte dos constituintes de uma diversidade de vegetais, frutos e produtos industrializados (SILVA et al., 2010). Esta variedade de compostos pode ser justificada pelas diferentes combinações de ligações a grupos hidroxilas, metoxilas ou conjugados com açúcares. Este fato dificulta a diferenciação dos compostos e sua determinação nos tecidos das plantas. Dessa forma, associa-se uma determinada família de polifenóis como sendo a mais importante encontrada em cada espécie vegetal, com teores podendo variar ao longo do desenvolvimento vegetativo da planta (LAGE, 2009).

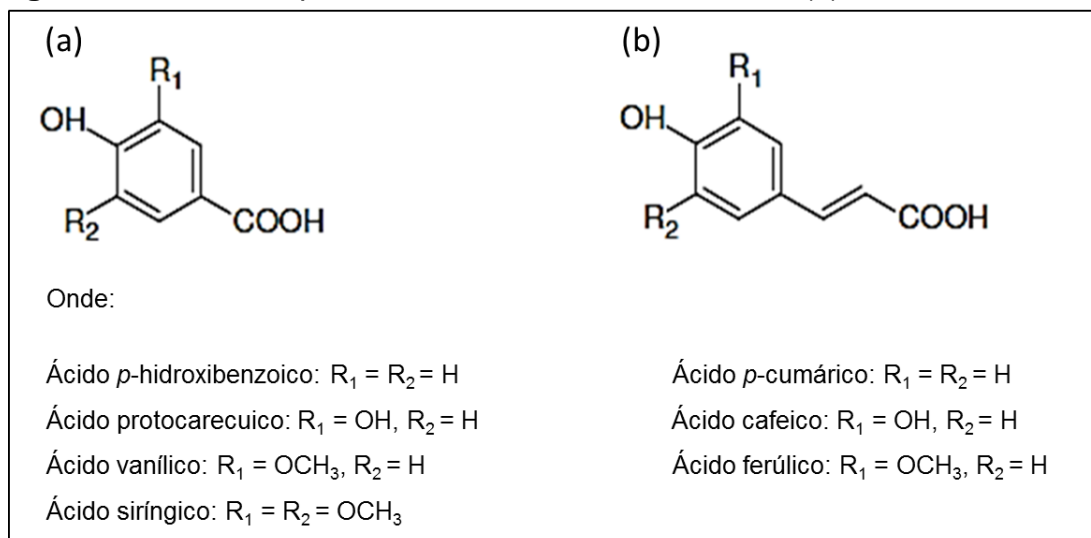
Os compostos fenólicos estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas, podendo englobar desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (LAGE, 2009). São caracterizados por apresentarem um núcleo benzênico, agrupado a um ou vários grupos hidroxilas (VIEIRA, 2010).

Como apresentam uma grande diversidade, os compostos fenólicos se dividem em flavonoides e não-flavonoides (SILVA et al., 2010; ACHKAR et al., 2013). Os flavonoides compreendem um grupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos nos frutos e nos vegetais. Sua estrutura química consiste em dois anéis aromáticos unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, podendo apresentar-se sob muitas variações como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas. São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C6–C3–C6. Suas principais fontes são: café, cebola, maçã, uva, cerveja, vinho tinto e chá, que contêm, sobretudo, catequinas em sua composição (SILVA et al., 2010).

Na classe dos ácidos fenólicos, os não-flavonoides, estão os derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzoico (Figura 5), e sua atividade antioxidante está relacionada com a posição dos grupos hidroxilas e com a proximidade do grupo

–COOH em relação ao grupo fenila. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenila, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta (SILVA et al., 2010).

Figura 5 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoico (a) e hidroxicinâmico (b).



Fonte: Dergal (2006).

Os ácidos hidroxibenzoicos incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum, C6–C1 (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006); enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6–C3), sendo os mais comuns os ácidos cafeico, ferúlico, e *p*-cumárico (BRAVO, 1998).

Os cogumelos têm recebido atenção especial por serem descritos como fonte rica de ácidos fenólicos, compostos importantes entre os principais contribuintes para as suas propriedades medicinais (SILVA; JORGE, 2011)

O café representa outro alimento cuja composição de fenólicos é relevante. Os compostos fenólicos, especificamente os ácidos clorogênicos, aparecem em concentrações que variam de 6 a 10% do peso seco dos grãos (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; SAURA-CALIXTO, 2005). Segundo Soccol (2002), a polpa de café apresenta 4,2 mg/g de ácido clorogênico e teores de 10 a 20 mg/g de ácido ferúlico. Ao estudar diferentes técnicas de extração de compostos fenólicos

de casca e borra de café, Andrade et al. (2012) obtiveram teores médios de fenólicos totais de 98,33 e 141,51 meq AG/g, respectivamente.

3.5.3 Avaliação da atividade antioxidante

- Teor de compostos fenólicos totais

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos pode ser realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin Ciocalteu (RFC) figura entre as mais extensivamente utilizadas (ANGELO; JORGE, 2007; ANTOLOVICH et al., 2002; TSAO; DENG, 2004). O reagente consiste em um complexo de ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico. A química associada ao RFC é suportada na transferência de elétrons em meio alcalino dos compostos fenólicos e outras espécies redutoras para o molibdênio, formando complexos azuis que podem ser monitorados espectrofotometricamente a 750-765 nm (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Os compostos fenólicos reagem com o RFC apenas em condições alcalinas (conseguidas pela adição de uma solução de carbonato de sódio, que eleva o valor de pH até próximo de 10) (MACDONALD-WICKS; WOOD; GARG, 2006). Singleton e Rossi (1965) aplicaram este ensaio à análise de fenólicos totais em vinho e, desde então, outras matrizes têm sido estudadas (HUANG; OU; PRIOR, 2005)

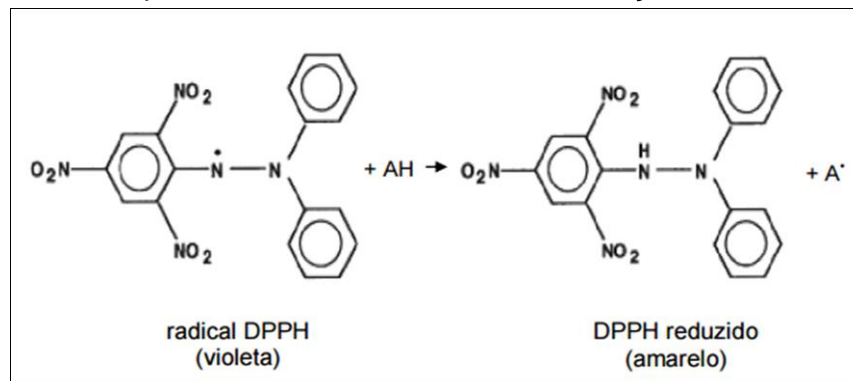
- Atividade antioxidante pela captura do radical DPPH•

O método DPPH é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes. O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico. É um dos métodos mais utilizados por ser considerado prático, rápido e estável (ESPÍN et al., 2000).

O ensaio fundamenta-se na propriedade do DPPH apresentar uma forte absorção no espectro visível, na faixa de 515 a 520 nm, caracterizado por uma coloração violácea intensa, devido à presença de radicais livres (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995). Quando o DPPH é colocado em presença de substâncias capazes de sequestrar radicais livres, a absorção é inibida, resultando em uma descoloração de acordo com o número de elétrons capturados, ou seja,

quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio no DPPH recebe um átomo de hidrogênio, proveniente do composto antioxidante, ocorre a mudança de cor (Figura 6).

Figura 6 - Estrutura química do radical DPPH e sua reação com um antioxidante.



Fonte: Molyneux (2004).

- Atividade antioxidante pelo método da redução do ferro – FRAP

O método FRAP (*ferric reducing antioxidant power*) foi descoberto por Benzie e Strain (1996) e baseia-se na redução do complexo férrico (Fe^{3+}) ao complexo ferroso (Fe^{2+}) em condições de baixo pH. Esta redução é monitorada pela mudança na absorvância a 593 nm. Os resultados do poder antioxidante de redução do ferro podem ser expressos como equivalente em μmol de Trolox/g de amostra ou equivalente em mmol de Fe^{2+} /kg de amostra (SERPEN et al., 2008). Este método é econômico, o preparo dos reagentes é simples, os resultados são altamente reprodutíveis e o procedimento é direto e rápido.

3.6 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

O potencial antioxidante de compostos bioativos em alimentos de origem vegetal depende de sua estrutura e de sua concentração no alimento. Além do grau de maturação e variedade da planta, os fatores genéticos e ambientais são condições que influenciam amplamente na quantidade destas substâncias em vegetais. No entanto, a capacidade antioxidante é influenciada pelo substrato utilizado no ensaio, pelo solvente e pela técnica utilizada, bem como pelo tempo e

temperatura de extração (NACZK; SHAHIDI, 2004). Estudos têm sido realizados a fim de encontrar melhores condições para obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos. A extração convencional utilizando solventes de diferentes polaridades vem sendo otimizada quando submetida à aplicação de ultrassom.

3.6.1 Tipo de solvente

Existem diversas metodologias para a extração dos compostos antioxidantes dos alimentos. Os métodos tradicionais de extração utilizam solventes de diferentes polaridades, como água, etanol, metanol, acetona, éter e hexano (REHMAN; HABIB; SHAH, 2004). Entretanto, de acordo com Naczk e Shahidi (2004), é muito difícil desenvolver um procedimento de extração apropriado para todos os fenólicos, pois a solubilidade é afetada pela polaridade dos solventes utilizados. Os autores ressaltam que os extratos fenólicos de materiais vegetais são constituídos de uma mistura diversificada de compostos solúveis no sistema solvente utilizado, portanto, o tipo de solvente e a polaridade podem afetar a transferência de elétron e a transferência de átomos de hidrogênio, que são aspectos chaves na medida da capacidade antioxidante.

Menezes et al. (2013), em seus experimentos, abordaram que a água pura não é eficiente para extrair substâncias fenólicas e que misturas de solventes alcoólicos com água são mais eficientes para recuperar fenóis, ressaltando que a mistura de água e solventes alcoólicos proporciona um aumento da polaridade do solvente extrator, possibilitando a obtenção de maiores teores de compostos fenólicos. A presença de outros compostos nas soluções testadas também pode afetar os resultados (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2006). Além disso, o solvente utilizado bem como o método aplicado influencia no rendimento da extração (MOURE et al., 2001).

3.6.2 Ultrassom

O ultrassom de alta intensidade, ou de potência, é uma tecnologia emergente que vem sendo utilizada para modificar um processo específico ou um produto.

Essas alterações são possíveis graças aos efeitos produzidos pelas altas quantidades de energia transferidas para o meio. Estes efeitos, por sua vez, podem ser considerados de natureza física, química ou mecânica (CARRIÓN, 2003) e permitem a aplicação do ultrassom para melhorar diversos processos como limpeza, secagem, filtração, inativação de microrganismos e enzimas e a própria extração.

Dentre os vários mecanismos de atuação do ultrassom, a cavitação é a forma mais conhecida. Quando as ondas ultrassônicas são propagadas através de um meio, uma série de compressões e descompressões é induzida por meio de deslocamento molecular. Nos ciclos de compressão, altas pressões são promovidas no líquido fazendo com que as moléculas se aproximem. Já nos ciclos de descompressão, zonas de baixa pressão são geradas provocando o afastamento das moléculas. Se a intensidade do ultrassom é suficientemente alta, é criado um vácuo durante estes ciclos que supera as forças atrativas das moléculas do líquido, como a tensão superficial, formando então bolhas de cavitação (MASON; CORDEMANS, 1996).

O colapso e rompimento das bolhas de cavitação liberam quantidade de energia suficiente para produzir diversos efeitos químicos e mecânicos. Ao se chocarem, temperaturas de 4.000 K e pressões de 100 MPa podem ser alcançadas devido a uma densidade de colisão de 1,5 kgf/cm² e gradientes de pressão de 2 TPa/cm. Por outro lado, estes pontos quentes duram aproximadamente 0,1 µs e os índices de resfriamento são de 10¹⁰ K/s (MASON; CORDEMANS, 1996).

Outro mecanismo pode ser verificado quando o ultrassom atinge as proximidades de uma superfície sólida, onde microcorrentes de líquido são formadas no sentido da bolha, atravessando e atingindo a superfície do sólido similarmente a uma corrente de alta pressão. Isso permite incrementar os processos de transferência de massa e energia entre o líquido e o sólido (CARRIÓN, 2003).

No caso da aplicação em sistemas ricos em sólidos, os ciclos sucessivos de zonas de compressão e descompressão produzem uma rápida compressão e relaxação dos materiais. Este efeito é análogo ao que é observado por uma esponja que é apertada e solta repetidamente. O denominado “efeito esponja” influencia operações interessantes como a transferência de matéria em sistemas sólido-gás,

como secagem, ou em sistemas sólido-líquido, como por exemplo, desidratação osmótica e extração de compostos bioativos (GALLEGO-JUÁREZ, 1999).

3.7 CAFÉ

O café destaca-se como o produto agrícola de maior relevância para o Brasil e, principalmente para o estado de Minas Gerais. A safra de café beneficiado no país em 2015 fechou com uma produção de 43,24 milhões de sacas de 60 quilos, representando uma redução de 5,3% quando comparado com a produção de 45,64 milhões de sacas obtidas na safra 2014. Tal redução é justificada pelo ano de bialidade negativa, aliado às condições climáticas durante o ciclo da cultura (CONAB, 2015)

O cafeeiro (Figura 7) pertence à família botânica Rubiaceae, que inclui cerca de 80 espécies. Duas espécies principais de café são cultivadas para consumo. *Coffea arabica*, conhecido como café arábica, corresponde por aproximadamente 75% da produção global de café e *C. canephora*, conhecido como café robusta, é responsável por aproximadamente 24% da produção mundial de café (NARITA; INOUE, 2014).

Figura 7 - Cafeeiro pertencente à família botânica Rubiaceae.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O fruto do cafeeiro atinge o auge da maturação no estado “cereja”, quando apresenta o máximo desenvolvimento de todos os seus componentes (casca, mucilagem, pergaminho e sementes), quando a composição química dos grãos oferece condições para que no processo de torra ocorram todas as reações físico-químicas necessárias para a obtenção de características sensoriais desejáveis, com destaque para aroma, sabor, acidez, amargor, corpo e doçura, satisfazendo as exigências para produção de cafés de alta qualidade de bebida. Por isso, o estado cereja é o momento em que o fruto expressa o seu potencial máximo de qualidade, representando o ponto ideal para colheita (GIOMO, 2012).

As operações realizadas após a colheita incluem o processamento, a secagem e o beneficiamento, deixando-o em condições de ser consumido ou armazenado.

3.7.1 Tipos de processamento

- Via seca

É a forma de preparo predominante no Brasil. Os frutos inteiros (casca, pergaminho, mucilagem e grãos) são secados em terreiros ou em secadores mecânicos, obtendo-se o café natural, também chamado de café em coco. Dependendo do tipo de colheita e das condições do processamento, os frutos podem ser separados das impurezas e também separados por estágio de maturação em lavadores-separadores. Esse procedimento é necessário para que a secagem ocorra de maneira uniforme, contribuindo para a melhoria da qualidade do café. Trata-se do processo que menos afeta a condição natural do café, pois todas as suas partes constituídas são mantidas. Além disso, é o processo que menos agride o meio ambiente, pois produz poucos resíduos sólidos e líquidos, não havendo produção de efluentes com elevado teor de matéria orgânica como acontece na “via úmida” (BORÉM, 2008).

Em algumas regiões é comum levar o café da lavoura direto para o terreiro, sem qualquer tipo de separação dos frutos. No entanto, Giomo (2012) ressalta que isso não é recomendado, pois aumenta o risco de perda de qualidade.

- Via úmida

Nesse tipo de preparo a casca do fruto é removida mecanicamente, obtendo-se café em pergaminho. Inicialmente o café da lavoura é encaminhado para separação hidráulica. A separação é feita por diferença de densidade. A fração mais leve, constituída pela mistura de frutos secos e chochos, é separada e vai direto para o terreiro de secagem. A fração mais pesada, constituída pela mistura de frutos cerejas e verdes, segue para o descascador-separador, onde ocorre a separação mecânica de frutos verdes. Por possuírem casca mais resistente, os frutos verdes não se rompem sob a ação do descascador e são encaminhados para saídas laterais do equipamento, enquanto os maduros se rompem, atravessam a peneira que reveste o eixo do descascador e são encaminhados para o descascador complementar, onde ocorre a separação das cascas (GIOMO, 2012).

De acordo com Giomo (2012), a via úmida pode ser conduzida em três formas distintas, originando diferentes grãos de café:

- ✓ Café descascado: chamado de cereja descascado, onde somente a casca do fruto é removida, ou seja, o café é submetido à secagem com a mucilagem aderida ao pergaminho;
- ✓ Café desmucilado: corresponde ao café em que a mucilagem remanescente no pergaminho, após o descascamento, é removida por atrito em desmucilador mecânico;
- ✓ Café despulpado: a mucilagem é removida por ação microbiana (degomagem biológica). O café é colocado em tanques por períodos de 16 a 36 horas para que haja fermentação e degradação da mucilagem. Em seguida é feita a lavagem para remoção dos resíduos de mucilagem.

O descascamento dos frutos e a eliminação da mucilagem diminuem a incidência de microrganismos e aceleram a secagem, reduzindo custos e impedindo a ocorrência de fermentações que poderiam afetar negativamente a qualidade do café. Além disso, há diminuição de até 50% do volume de café a ser manuseado, melhorando o uso de terreiros, secadores e armazéns (GIOMO, 2012). Entretanto,

durante o descascamento, grande quantidade de água é usada, resultando em um efluente com elevado potencial poluidor (BORÉM, 2008).

Associada à colheita de frutos maduros, o preparo do café por via úmida confere maior potencial para o aprimoramento da qualidade, sendo predominante nos principais países produtores de café arábica da América Central, África e Indonésia (GIOMO, 2012).

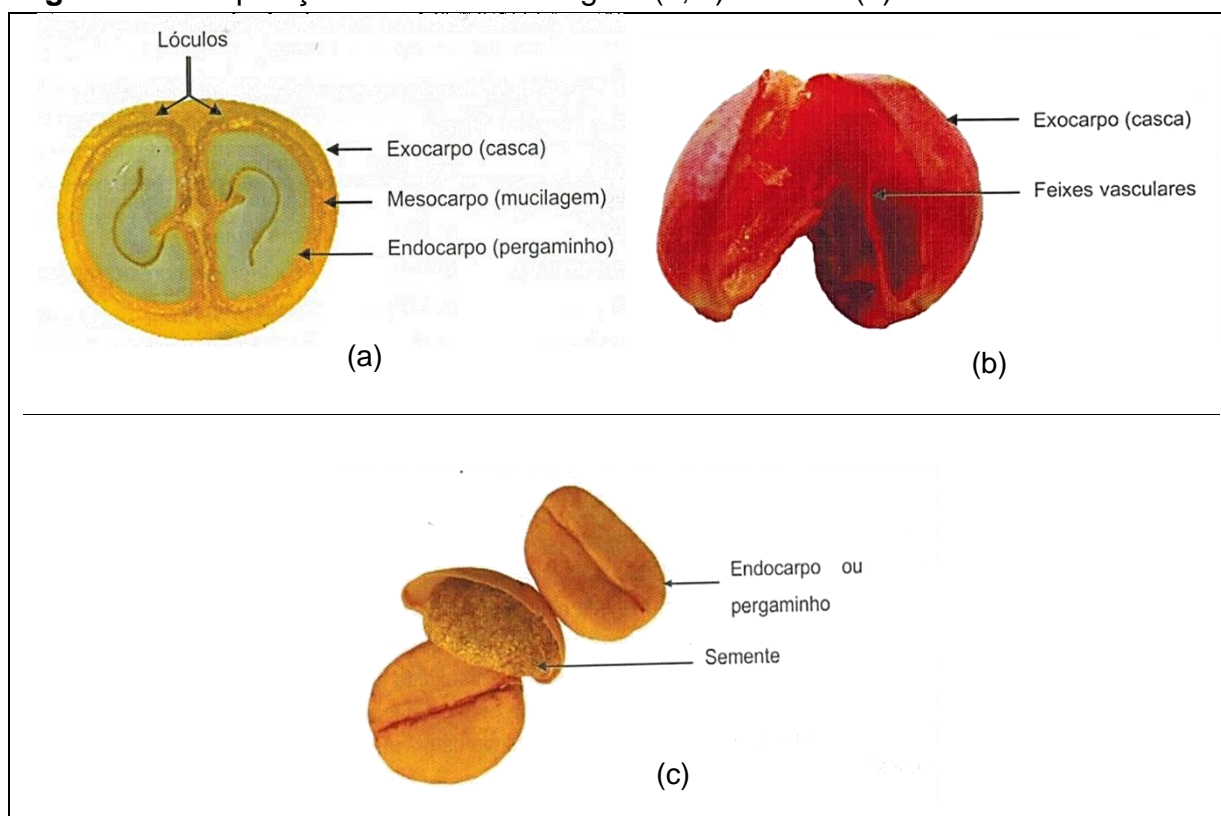
A indústria cafeeira, sendo a segunda *commodity* do mundo, é responsável por gerar grandes quantidades de resíduos, os quais têm sido objeto de estudo devido à sua composição química.

3.7.2 Subprodutos

O fruto do cafeeiro é formado pelo grão (endosperma + embrião) que é envolvido pelo pergaminho ou endocarpo, pela mucilagem ou mesocarpo e, finalmente, pela casca ou exocarpo (Figura 8a). A polpa é o resíduo da despolpa úmida do café cereja, composta de exocarpo, parte do mesocarpo e feixes vasculares (Figura 8b). Já a casca obtida seca difere da polpa devido à presença do pergaminho (Figura 8c), uma vez que este, no processamento via úmida, fica envolto no grão de café como forma de proteção (BARCELOS et al., 2002). A polpa contém de 6 a 8% de mucilagem (PEÑALOZA et al., 1985). No café arábica representa entre 39 e 49% do peso fresco no estágio de maturação cereja; na variedade robusta, representa 38% desse peso (ROLZ et al., 1971). Estima-se que, anualmente, são geradas 9,9 milhões de toneladas de resíduos sólidos em nível mundial (DIAS et. al., 2014). Além de serem utilizados como fertilizantes e fonte energética, estes subprodutos têm sido estudados para fins de extração de cafeína e polifenóis (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

Os componentes orgânicos presentes na polpa de café incluem taninos, que correspondem por 1,80-8,56%, substâncias pécticas no total de 6,5%, 12,4% de açúcares redutores, 2,0% de açúcares não redutores, 1,3% de cafeína, 2,6% de ácido clorogênico e 1,6% de ácido cafeico (MURTHY; NAIDU, 2012). Este resíduo é constituído ainda por fibra bruta (15,10%), proteína (8,25%) e cinzas (8,12%) (BORÉM, 2008).

Figura 8 - Composição da estrutura do grão (a, c) e casca (b) do café.



Fonte: Borém (2008).

A polpa do fruto do cafeeiro é rica em potássio, nitrogênio e outros nutrientes e, por isso, o aproveitamento agrícola como adubação orgânica *in natura* ou após compostagem constitui alternativa interessante, tanto no que se refere a aspectos econômicos como ambientais. Ressalta-se que, devido ao alto poder calorífico, as polpas do fruto do cafeeiro podem ser utilizadas com fins energéticos, inclusive para o fornecimento de energia a uma instalação de secagem de grãos de café. Além disso, é um excelente substrato para o crescimento de fungos e bactérias e outros organismos, razão pela qual, quando presente, possibilita a deterioração dos grãos de café (MATOS, 2003).

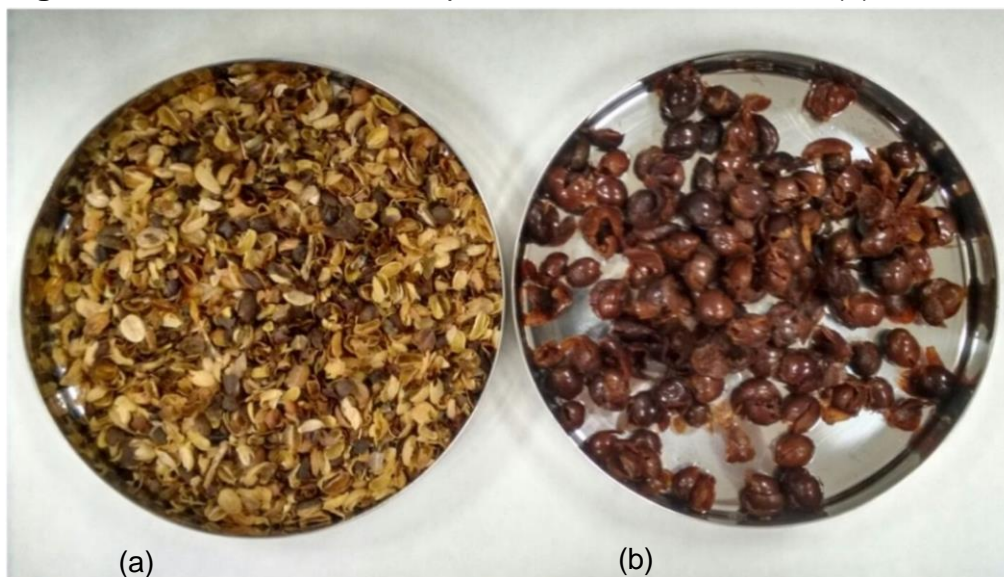
De acordo com Matos (2003), estudos realizados na distribuição dos macro componentes do fruto do cafeeiro, desde o início do processamento pós-colheita até a sua infusão, permitem constatar que somente 6% da massa do fruto são aproveitados na preparação da bebida. Os 94% restantes, constituídos por água e subprodutos do processo, na maioria dos casos não são recuperados e podem ser fonte de contaminação do meio ambiente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

As cascas de café arábica (*Coffea arábica* L.) provenientes de processamentos via seca e via úmida (Figura 9) foram obtidas de produtores locais da região de Poços de Caldas (Minas Gerais), latitude 21°44'19" S e longitude 46°26'23" O, durante a safra de 2015. O material, aproximadamente 3 kg de cada tipo de cascas, foi encaminhado ao Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA) da UNESP/IBILCE de São José do Rio Preto e armazenado a -18°C.

Figura 9 - Cascas obtidas dos processamentos vias seca (a) e úmida (b).



Fonte: Elaborada pelo autor.

As cascas congeladas foram liofilizadas para atingirem o mesmo grau de umidade, evitando assim a interferência dos teores de água. Para isto, foi utilizado um liofilizador (modelo L-101, Liotop, São Carlos-SP, Brasil) a uma pressão aproximada de 200 μ mHg e temperatura de -50°C.

As cascas liofilizadas foram então trituradas com auxílio de um mixer doméstico e armazenadas em recipientes hermeticamente fechados e protegidos com papel alumínio, em temperatura ambiente, até seu uso.

4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO VEGETAL E ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

Para a realização deste trabalho, foram utilizados óleo de soja refinado, sem adição de antioxidantes (TBHQ e ácido cítrico), e os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHA. O óleo, em embalagens de 900 mL, e os antioxidantes, na forma de pó, foram adquiridos diretamente da empresa Triângulo Alimentos, na cidade de Itápolis-SP.

4.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Para preparação dos extratos, as amostras de cascas trituradas foram pesadas em uma balança analítica (modelo AS200, Ohaus, Florham Park, NJ, EUA) e colocadas em recipientes de vidro hermeticamente fechados. Para obtenção dos extratos, seguiu-se uma proporção de 1:5 (m/v) dos solventes hidroalcoólicos utilizados conforme Tabela 1.

Tabela 1 - Níveis utilizados para codificação das variáveis estudadas.

Variáveis	Níveis				
	-1,4142	-1	0	1	1,4142
Proporção de etanol em água (%)	41,71	50	70	90	98,28
Tempo de ultrassom (min)	11,71	20	40	60	68,28

Após a adição da solução hidroalcoólica às cascas trituradas, o material foi agitado a 14.000 rpm por 2 minutos em um ultra-turrax (modelo T25, Ika, Alemanha) com auxílio de uma sonda modelo S25N (Figura 10). Em seguida, o material foi inserido em ultrassom (modelo 740D, Ultrasonic Cleaner, Ribeirão Preto-SP, Brasil) em banho de gelo por diferentes tempos de aplicação conforme Tabela 1.

Posteriormente à aplicação do ultrassom, o material foi submetido em uma centrífuga (modelo 206 MP, Excelsa[®] II, São Paulo, Brasil) a 3.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante (extrato) foi filtrado em papel filtro Whatman nº 4 para remoção de quaisquer impurezas. O volume do material filtrado foi medido em uma proveta para avaliar o rendimento de extrato produzido de acordo com a Equação 1

e, em seguida, o extrato foi analisado imediatamente e armazenado em frascos âmbar a -18°C.

Figura 10 - Modelo do ultra-turrax utilizado na obtenção dos extratos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{volume de extrato}}{\text{volume inicial de solução hidroalcoólica}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

O procedimento de extração de compostos antioxidantes foi realizado com base em um delineamento central composto rotacional 2^2 (DCCR), variando os fatores: tempo de ultrassom (t) e proporção de etanol (X). Foi realizado um planejamento experimental para cada tipo de cascas, onde cada fator variou em 2 níveis (-1;1) com três repetições no ponto central (C), totalizando 11 ensaios (Tabela 2).

Para cada ensaio realizado, obteve-se como resposta: teor de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante determinada pelos métodos DPPH e FRAP, e rendimento de extrato obtido após centrifugação.

Estabelecidas as melhores condições (tempo de ultrassom e proporção de etanol) de obtenção dos compostos antioxidantes, o extrato constituído pelo maior teor de compostos fenólicos totais foi rotaevaporado a baixa pressão a 40°C e liofilizado para remoção de todo o solvente. O extrato concentrado foi aplicado ao

óleo de soja, na concentração de 200 mg/kg, baseando-se no teor de compostos fenólicos totais presentes.

Tabela 2 - Planejamento experimental realizado para ambas as cascas baseado em um DCCR.

Ensaio	Proporção de etanol	Tempo de ultrassom
1	50 (-1)	20 (-1)
2	50 (-1)	60 (1)
3	90 (1)	20 (-1)
4	90 (1)	60 (1)
5	41,71 (-1,4142)	40 (0)
6	98,28 (1,4142)	40 (0)
7	70 (0)	11,71 (-1,4142)
8	70 (0)	68,28 (1,4142)
9 (C)	70 (0)	40 (0)
10 (C)	70 (0)	40 (0)
11 (C)	70 (0)	40 (0)

(C) representa as repetições no ponto central.

4.4 ESTOCAGEM ACELERADA EM ESTUFA

Foram submetidos ao teste acelerado em estufa os seguintes tratamentos: Controle (óleo de soja sem adição de antioxidantes), TBHQ (óleo de soja + 200 mg/kg TBHQ), BHA (óleo de soja + 200 mg/kg BHA), EC (óleo de soja + 200 mg/kg compostos fenólicos de extrato de cascas de café), TBHQ + EC (óleo de soja + 100 mg/kg TBHQ + 100 mg/kg EC), e BHA + EC (óleo de soja + 100 mg/kg BHA + 100 mg/kg EC). Os tratamentos foram mantidos em estufa aquecida a 60°C por 20 dias, utilizando-se béqueres de 100 mL contendo 60 mL de amostra com relação superfície/volume de 0,4/cm. Todas as amostras, em diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 15 e 20 dias), foram recolhidas, inertizadas com nitrogênio gasoso e armazenadas à -18°C para análises posteriores quanto à estabilidade oxidativa, índice de peróxidos, dienos conjugados e retenção de tocoferóis. Para a análise de ganho de massa as amostras foram avaliadas diariamente durante 25 dias.

4.5 MÉTODOS

4.5.1 Análises nos extratos

- Teor de compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado para os diferentes ensaios por método espectrofotométrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. A metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965) baseia-se na adição de 500 µL de amostra diluída na solução de extração em 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Juntamente com estas soluções, adicionou-se 2,0 mL de carbonato de sódio para alcalinizar a solução. Os tubos de ensaio foram colocados em repouso ao abrigo de luz. Após 2 horas foram efetuadas as leituras a 765 nm.

Para quantificação do teor de compostos fenólicos totais, foi construída uma curva padrão utilizando ácido gálico (AG) em concentrações de 0 a 500 mg/L. O coeficiente de determinação da curva analítica foi de $R^2 = 0,9999$. Os teores de compostos fenólicos totais foram expressos em miliequivalentes de AG/g matéria seca.

Os extratos de cascas obtidas pelos dois processamentos (vias seca e úmida) constituídos por maiores quantidades de compostos fenólicos totais foram submetidos à análise cromatográfica. O perfil de compostos fenólicos foi identificado por cromatografia líquida de alta eficiência (marca Shimadzu, modelo Prominece, Japão) com detector de arranjo de diodos e injetor manual conforme método descrito por Kim et al. (2005). Condições de análise: coluna analítica C18 de 250 x 4,6 mm e partículas de 5 µm; fase móvel constituída de 2% de ácido acético em água (v/v) (solvente A) e metanol (solvente B). O gradiente programado foi: 100-70% A em 30 min, 70-0% A em 10 min e 0-100% A em 10 min. O fluxo foi de 1,2 mL/min e o volume de injeção de 20 µL. A quantificação de cada isômero foi realizada por padronização externa com base nas áreas dos picos, utilizando os padrões ácido cafeico, ácido salicílico, epicatequina e quercetina, detectados em 280 nm e ácido gentísico, ácido *p*-cumárico e catequina, detectados em 320 nm, todos com grau de pureza acima de 99%. Os compostos fenólicos foram expressos em mg/kg.

- Atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH'

A realização da análise seguiu o método proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), onde foi preparada uma solução etanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picrihidracil) a 6×10^{-5} M e soluções etanólicas de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico) que foram utilizadas para a curva padrão em concentrações de 0,19 a 0,93 mM.

No procedimento foram pipetados 100 μ L de amostra diluída em 2,9 mL da solução de DPPH em um tubo de ensaio âmbar. A absorvância das amostras foi lida a 515 nm em espectrofotômetro (modelo UV mini-1240, Shimadzu) após 25 minutos de reação.

O coeficiente de determinação da curva utilizando as soluções de trolox foi de $R^2 = 0,9996$. A atividade antioxidante foi expressa em miliequivalentes de trolox/g de matéria seca.

- Atividade antioxidante pelo método da redução do ferro - FRAP

A análise do poder antioxidante por redução do íon férrico foi determinada segundo metodologia previamente descrita por Benzie e Strain (1996), utilizando-se uma curva de calibração de solução de trolox, em que o coeficiente foi $R^2 = 0,9997$.

Em tubos de ensaio foram colocados 90 μ L de extrato, 270 μ L de água destilada e 2,7 mL de reagente FRAP (750 mL de tampão acetato 0,3 M, 75 mL solução TPTZ 10 mM e 75 mL cloreto férrico 20 mM). Homogeneizou-se e colocou-se em banho-maria a 37°C. As leituras foram efetuadas após 30 minutos a 595 nm e os resultados foram expressos em meq trolox/g matéria seca.

4.5.2 Análises nos óleos

- Estabilidade oxidativa

A medida da estabilidade oxidativa do óleo adicionado dos extratos em diferentes concentrações foi conduzida conforme método proposto pela AOCS Cd 12-92 (2009), que se baseia na determinação da condutividade elétrica dos produtos voláteis de degradação utilizando o equipamento Rancimat®. A determinação foi

realizada a 110°C, com fluxo de ar de 20 L/h, utilizando 3 g de amostra e volume de água destilada de 60 mL nos frascos contendo os eletrodos. Foram registradas as curvas de condutividade elétrica x tempo com o decorrer da reação e o período de indução foi expresso em horas.

- Índice de peróxidos

O índice de peróxidos refere-se a todas as substâncias que oxidam o iodeto de potássio (KI), calculado em miliequivalentes de oxigênio ativo por quilograma de matéria graxa. Este índice foi determinado segundo a norma da *American Oil Chemists' Society* Cd 8-53 da AOCS (2009), através do iodo liberado na reação do iodeto de potássio com os peróxidos presentes no óleo.

- Dienos conjugados

A determinação de dienos conjugados, presentes na matéria graxa, foi realizada de acordo com o método Ti 1a-64 da AOCS (2009). A leitura da absorbância foi a 233 nm e o resultado foi expresso como porcentagem de ácidos dienóicos conjugados.

- Perfil de tocoferóis

A análise cromatográfica de tocoferóis foi realizada segundo o método AOCS Ce 8-89 (2009), utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (marca Varian, modelo 210-263, Walnut Creek-CA), equipado com detector de fluorescência. De acordo com as condições da análise, foi utilizada a coluna de sílica de 250 x 4,6 mm com poros de 5 µm, fluxo de 1,2 mL/min, comprimento de onda de excitação em 290 nm e de emissão em 330 nm e como fase móvel a mistura de 99,5% de n-hexano e 0,5% de isopropanol, todos com grau de pureza para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A identificação de tocoferóis foi feita por comparação com o tempo de retenção dos padrões marca Sigma grau de pureza 95%. Estes foram quantificados por padronização externa e os teores de tocoferóis expressos em termos de mg/kg.

- Ganho de massa

Na análise de ganho de massa, 2,0 g de amostra de cada tratamento foram pesados em placas de Petri e colocados em estufa a 60°C. A taxa de oxidação, em termos de ganho de massa, foi medida a cada 24 horas num intervalo de 25 dias. O índice de estabilidade foi definido como o tempo requerido para um aumento de massa de 0,5% (IQBAL; BHANGER, 2007).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada resposta das análises dos extratos, foi construída uma tabela com os efeitos estimados de cada variável significativa ($\alpha = 0,05$), seja variando de forma linear (L) ou quadrática (Q). Além disso, foi realizada a análise de variância (ANOVA) para verificar a preditividade do modelo matemático obtido através do programa STATISTICA 10 (StatSoft Inc, Tulsa, EUA).

Nas análises dos óleos, os tratamentos sob estocagem em estufa seguiram esquema fatorial no delineamento inteiramente casualizado, cujos resultados obtidos das determinações analíticas, em duplicata, foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre as médias foram testadas a 95% de confiança pelo teste de Tukey por meio do programa ASSISTAT 7.7.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial antioxidante dos extratos obtidos para os diferentes ensaios foram avaliados de acordo com o teor de compostos fenólicos totais (FT), atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre (DPPH) e pelo método de redução do ferro (FRAP). Juntamente com estes dados, os resultados obtidos para o rendimento estão apresentados na Tabela 3.

5.1 ANÁLISES NOS EXTRATOS

- Rendimentos dos extratos

A Tabela 3 mostra que, embora as cascas provenientes do processamento via úmida tenham apresentado bons rendimentos, com média de 56,18%, os maiores rendimentos foram encontrados para as cascas obtidas por via seca, em que a média obtida foi de 58,54%. Um possível fator responsável por tal diferença é o grau de intumescimento das cascas da via úmida, proporcionando maior porosidade. Esta propriedade faz com que estas absorvam água com maior facilidade do que as cascas da via seca e promovem uma redução no volume do extrato disponível.

A Tabela 4 mostra os efeitos estimados para a variável “rendimento” de extratos de cascas secas. O valor t apresentado na tabela é o valor de variáveis na equação. Este valor mede a significância da correlação parcial da variável refletida no coeficiente de regressão. Observa-se que a porcentagem de etanol contribuiu positivamente para o aumento do rendimento de forma linear, enquanto o tempo de aplicação do ultrassom contribui negativamente para o rendimento.

A análise de variância para a regressão dos dados experimentais, apresentada no Apêndice 1 demonstrou-se significativa e preditiva com $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ para a regressão e $F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$ para falta de ajuste. Dessa forma, a Equação 2 prediz o rendimento em função da proporção de etanol e tempo de ultrassom com $R^2 = 0,88124$.

Tabela 3 - Respostas obtidas para os diferentes ensaios realizados para as cascas obtidas pelos processamentos via seca e via úmida, para Rendimento (%), FT (meq AG/g), DPPH (meq trolox/g) e FRAP (meq trolox/g).

Ensaio	Via seca				Via úmida			
	Rend.	FT	DPPH	FRAP	Rend.	FT	DPPH	FRAP
1	56	7,92 ± 0,13 ^a	12,23 ± 0,57 ^a	16,14 ± 0,81 ^a	45	7,17 ± 0,08 ^b	10,31 ± 0,44 ^a	13,09 ± 0,65 ^a
2	41	8,85 ± 0,07 ^a	13,24 ± 0,62 ^a	19,81 ± 0,76 ^a	49	7,24 ± 0,37 ^b	10,23 ± 0,37 ^a	13,66 ± 0,83 ^b
3	68	3,06 ± 0,06 ^b	4,10 ± 0,02 ^a	5,84 ± 0,34 ^a	60	4,01 ± 0,16 ^a	4,13 ± 0,04 ^a	6,54 ± 0,31 ^a
4	63	3,82 ± 0,06 ^b	4,68 ± 0,30 ^a	7,06 ± 0,40 ^a	60	4,53 ± 0,26 ^a	5,03 ± 0,39 ^a	7,51 ± 0,22 ^a
5	45	9,93 ± 0,12 ^a	15,02 ± 0,35 ^a	22,77 ± 0,65 ^a	42	7,24 ± 0,07 ^b	9,34 ± 0,53 ^b	13,35 ± 0,14 ^b
6	69	1,82 ± 0,18 ^a	3,22 ± 0,40 ^a	3,62 ± 0,22 ^a	59	1,71 ± 0,12 ^a	2,31 ± 0,34 ^a	2,93 ± 0,10 ^a
7	67	6,00 ± 0,06 ^a	9,13 ± 0,22 ^a	11,78 ± 0,05 ^a	59	5,92 ± 0,16 ^a	7,47 ± 0,28 ^b	10,66 ± 0,67 ^a
8	58	6,35 ± 0,21 ^a	10,58 ± 0,26 ^a	14,83 ± 0,49 ^a	58	6,19 ± 0,21 ^a	8,09 ± 0,37 ^b	10,98 ± 0,49 ^b
9	59	6,66 ± 0,14 ^a	10,05 ± 0,62 ^a	13,91 ± 0,15 ^a	62	4,92 ± 0,07 ^b	7,93 ± 0,68 ^a	11,73 ± 0,39 ^b
10	62	7,19 ± 0,16 ^a	11,34 ± 0,15 ^a	15,23 ± 0,10 ^a	62	6,10 ± 0,23 ^b	8,72 ± 0,45 ^b	10,19 ± 0,67 ^b
11	56	6,91 ± 0,19 ^a	11,30 ± 0,37 ^a	14,91 ± 0,41 ^a	62	6,34 ± 0,27 ^a	8,29 ± 0,20 ^b	11,52 ± 0,47 ^b
Médias	58,54	6,22	9,53	13,26	56,18	5,57	7,44	10,19

Rend.: Rendimento

Letras diferentes para a mesma linha e mesmo tipo de análise representam diferença significativa pelo teste de Tukey em intervalo de confiança de 95%

Tabela 4 - Efeitos estimados para rendimento de extratos de cascas de café obtidas pelo processamento via seca.

	Efeitos estimados	Erro padrão	t (7)	p
Média	58,545	1,043	56,108	<0,001
% etanol (L)	16,985	2,447	6,941	0,001
Tempo de ultrassom (L)	-8,182	2,447	-3,343	0,010

t(7): Diferença entre o grau de liberdade total (10) e o número de variáveis significativas (3)

(L): Linear

$$\text{Rendimento} = 37,00 + 0,42X - 0,20t \quad (\text{Equação 2})$$

Os gráficos para rendimento de extrato das cascas secas foram plotados e estão apresentados na Figura 11. Pela figura, evidenciou-se que quanto menor o tempo de ultrassom e maior porcentagem de etanol no solvente, maiores são os rendimentos. O etanol possivelmente tem menor capacidade de adsorção na matriz sólida, ficando mais disponível no extrato. Por outro lado, o uso do ultrassom promove a entrada do solvente na estrutura da casca, deixando o solvente menos disponível.

O rendimento de extrato a partir das cascas obtidas pelo processamento via úmida demonstrou que a porcentagem de etanol (X) influencia linearmente e quadraticamente para o rendimento, enquanto o ultrassom (t) apresenta efeito apenas quadrático (Tabela 5), com $R^2 = 0,9792$.

A regressão dos dados experimentais demonstrada no Apêndice 2 indica que o modelo da Equação 3 é significativo em um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 5 - Efeitos estimados para rendimento de extratos de cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.

	Efeitos estimados	Erro padrão	t (6)	p
Média	61,999	0,723	85,691	<0,001
% etanol (L)	12,507	0,886	14,114	<0,002
% etanol (Q)	-11,998	1,054	-11,376	<0,009
Tempo de ultrassom (Q)	-4,000	1,054	-3,792	0,006

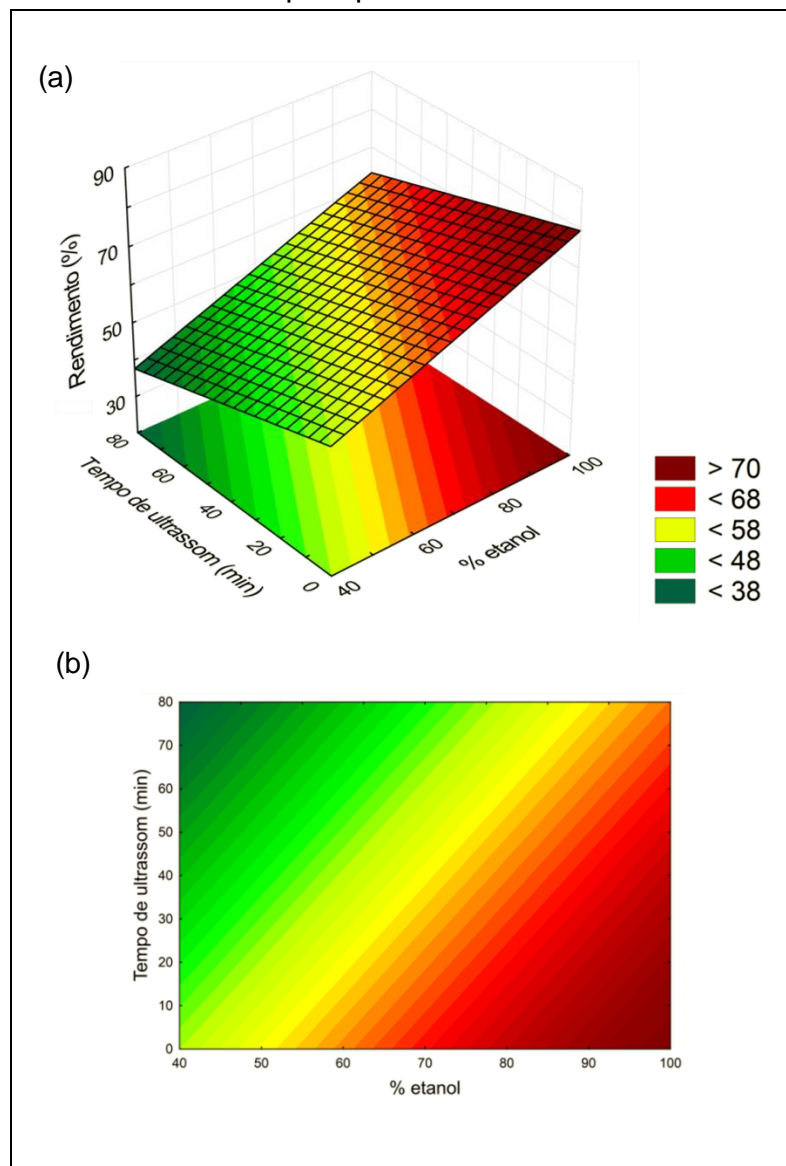
t(6): Diferença entre o grau de liberdade total (10) e o número de variáveis significativas (4)

(L): Linear

(Q): Quadrática

$$\text{Rendimento} = -28,04 + 2,21X - 0,01X^2 - 1,77 \times 10^{-5} t^2 \quad (\text{Equação 3})$$

Figura 11 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para rendimento de extrato de cascas de café obtidas pelo processamento via seca.



A Figura 12 confirma os dados obtidos para as cascas úmidas, onde maiores proporções de etanol (75-90%) favorecem o alto rendimento com maior efeito do que a aplicação do ultrassom.

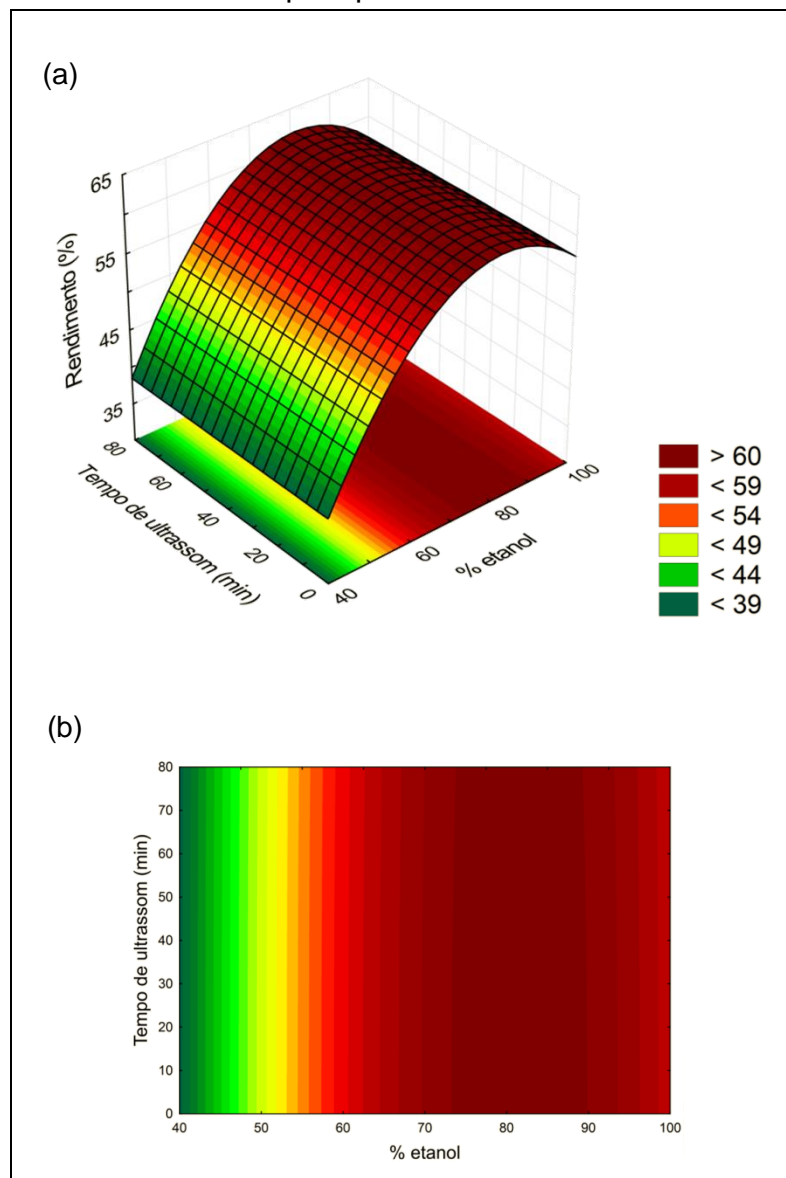
- Teor de compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais (FT) foi determinado para os ensaios do planejamento experimental para ambas as cascas. Para a via úmida, a média dos teores de fenólicos totais foi de 5,57 meq AG/g de matéria seca, enquanto que os extratos das cascas obtidas via seca apresentaram média de 6,22 meq AG/g matéria seca. O ensaio da via seca constituído por 41,71% de etanol e submetido ao tempo de aplicação de ultrassom de 40 minutos foi o que apresentou o maior teor de fenólicos totais, $9,93 \pm 0,12$ meq AG/g de matéria seca, seguido pelos ensaios realizados com 50% de etanol com aplicações de 60 e 20 minutos, em que foram obtidos $8,85 \pm 0,07$ e $7,92 \pm 0,13$ meq AG/g matéria seca, respectivamente.

Os valores encontrados no presente trabalho estão próximos aos relatados em estudo sobre a atividade antioxidante de ervas aromáticas, em que Yoo et al. (2008) obtiveram altas concentrações de fenólicos totais para extratos de camomila, limão verbena, chá verde e alecrim, cujos valores compreenderam entre 7,69 e 8,44 meq AG/g de amostra. Os resultados encontrados também foram superiores aos reportados por Sousa et al. (2011) ao estudarem a capacidade antioxidante de diversos frutos tropicais como goiaba, acerola, abacaxi, graviola, bacuri e cupuaçu. O maior teor de compostos fenólicos totais encontrado foi de 2,47 meq AG/g para polpa de acerola enquanto que para o bacuri e cupuaçu foram encontrados 0,08 e 0,04 meq AG/g. Baggio (2006) também relatou valores aproximados aos do presente trabalho para os resíduos do café, onde o conteúdo total de fenólicos variou entre 1,39 e 8,08 meq AG/g de matéria seca.

Em estudo sobre a atividade antioxidante de resíduos agroindustriais, Melo et al. (2011) avaliaram a extração utilizando solvente etanólico e aquoso. Neste trabalho, o extrato etanólico foi mais eficaz na extração de compostos fenólicos totais, obtendo teores de 3,41 meq AG/g para bagaço de goiaba e valores entre 21,45 e 40,79 meq AG/g para bagaços de uva.

Figura 12 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para rendimento de extrato de cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.



Souza (2015) relatou que a extração de compostos fenólicos assistida por ultrassom proporcionou obtenção de um teor de 4,20 meq AG/g de farinha de casca de maracujá, observando que o sistema metanol/água (70:30; v/v) foi o melhor solvente utilizado na extração.

A utilização do ultrassom também foi estudada por Wang et al. (2008) visando a otimização da extração de compostos fenólicos do farelo de trigo em função do tempo de aplicação e composição do solvente. Neste trabalho, o maior conteúdo de fenólicos totais (2,99 meq AG/g farelo de trigo) foi encontrado em extrato contendo 60% de etanol submetido a 29 min de extração. O menor tempo de extração (11 min) resultou em menor quantidade de fenólicos extraídos na mesma condição de solvente, observando, neste caso, que a aplicação do ultrassom foi parâmetro mais significativo que a proporção de etanol.

A análise dos efeitos estimados foi realizada para as cascas da via seca (Tabela 6), onde verificou-se que a proporção de etanol e o tempo de ultrassom influenciaram linearmente e quadraticamente no teor de compostos fenólicos totais com $p < 0,05$. Pelo módulo dos valores dos efeitos estimados, observou-se que a proporção de etanol teve maior influência do que o tempo de ultrassom.

Tabela 6 - Efeitos estimados para teor de compostos fenólicos totais para cascas de café obtidas pelo processamento via seca.

	Efeitos estimados	Erro padrão	t (5)	p
Média	6,919	0,181	38,105	0,000
% etanol (L)	-5,340	0,222	-24,011	0,000
% etanol (Q)	-1,085	0,264	-4,102	0,006
Tempo de ultrassom (L)	0,596	0,222	2,683	0,036
Tempo de ultrassom (Q)	-0,853	0,264	-3,223	0,018

t(5): Diferença entre o grau de liberdade total (10) e o número de variáveis significativas (5)

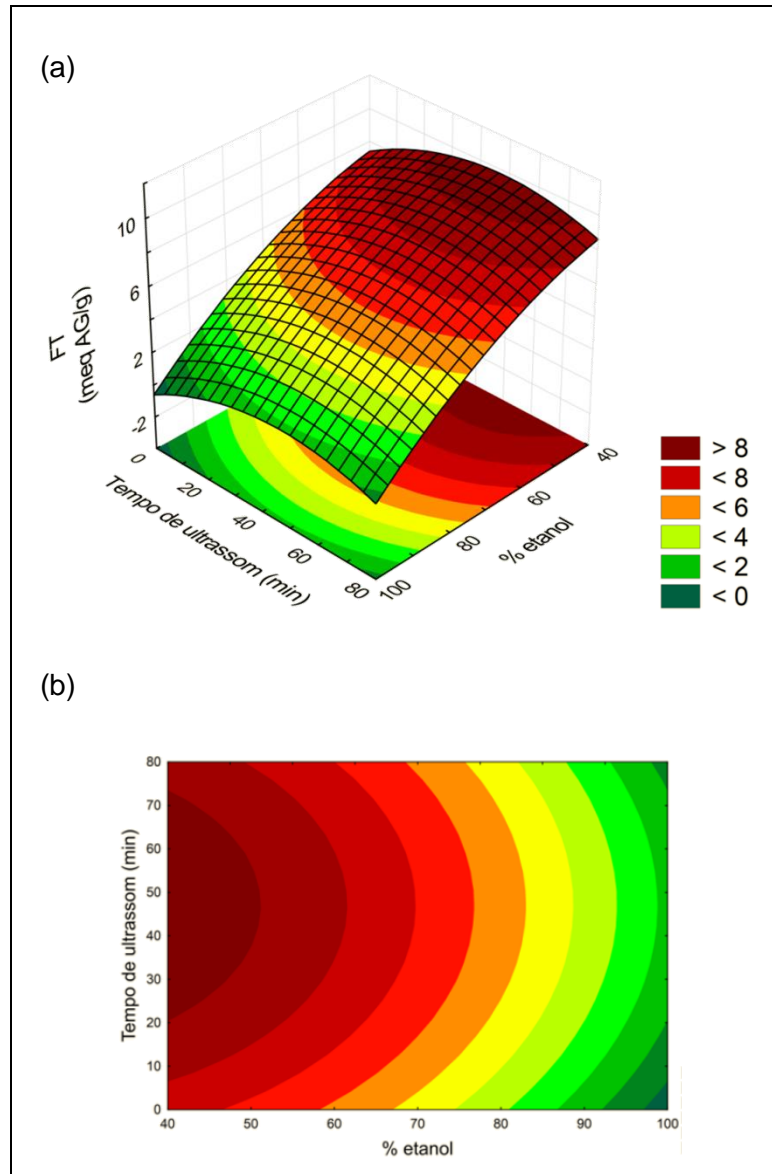
(L): Linear

(Q): Quadrática

A ANOVA do modelo criado a partir das variáveis significativas (Apêndice 3) demonstrou que o modelo representado na Equação 4 é preditivo e pode ser usado para expressar o teor de compostos fenólicos totais (FT) como uma função da proporção de etanol (X) e tempo de aplicação de ultrassom (t) com $R^2 = 0,99018$.

Feito isso, foi possível plotar as superfícies de respostas e gráfico de contorno (Figura 13) para os dados analisados. Verificou-se que quanto menor a proporção

Figura 13 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para FT para cascas de café obtidas pelo processamento via seca.



de etanol (entre 40 e 50%) melhor é o processo de extração de fenólicos totais. Este fato pode ser justificado pela diferença de polaridade dos solventes utilizados (água e etanol), que podem extrair tanto compostos polares como os menos polares, enquanto para tempos de ultrassom entre 30 e 60 min, a extração de fenólicos também é otimizada. A aplicação do ultrassom gera zonas de compressão e descompressão no líquido, promovendo o denominado “efeito esponja” (GALLEGO-JUÁREZ, 1999). Este efeito em menores tempos de ultrassom não é suficiente para induzir a saída dos compostos fenólicos da matriz sólida. Já em tempos maiores que 60 minutos, o processo de cavitação provocado pela aplicação do ultrassom pode ocasionar na degradação de compostos sensíveis às variações de temperatura causadas pelos pontos quentes, ou *hot spots* (MASON; CORDEMANS, 1996).

$$FT = 7,31 + 5,56 \times 10^{-2} X - 1,36 \times 10^{-3} X^2 + 0,10 t - 1,07 \times 10^{-3} t^2 \quad (\text{Equação 4})$$

A mesma análise estatística foi realizada para os extratos obtidos das cascas processadas pela via úmida. Na Tabela 7, verificou-se que, diferentemente dos extratos das cascas processadas a altas temperaturas, a aplicação do ultrassom não foi um parâmetro significativo ($p > 0,05$). Isso pode ter ocorrido, pois, como as cascas úmidas foram liofilizadas, elas possuem mais sítios ativos para adsorção da água em sua estrutura. Isso aumentou o grau de intumescimento das estruturas, aumentando assim a viscosidade do meio tratado com ultrassom. Sabe-se que, quando a viscosidade do meio é alta, menores são os efeitos provocados pela cavitação (MASON; LORIMER, 2002).

Tabela 7 - Efeitos estimados para teor de compostos fenólicos totais para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.

	Efeitos estimados	Erro padrão	t (7)	p
Média	6,024	0,239	25,127	<0,006
% etanol (L)	-3,424	0,403	-8,485	<0,002
% etanol (Q)	-1,225	0,459	-2,669	0,028

t(7): Diferença entre o grau de liberdade total (10) e o número de variáveis significativas (3)

(L): Linear

(Q): Quadrática

A ANOVA para a regressão matemática apresentada no Apêndice 4 demonstrou que a Equação 5 obtida é preditiva com $R^2 = 0,90817$ e pode ser usada para expressar o teor de compostos fenólicos totais somente em função da proporção de etanol.

$$FT = 4,51 + 0,12 X - 1,53 \times 10^{-3} X^2 \quad (\text{Equação 5})$$

Similarmente ao efetuado para a matéria-prima obtida via seca, foram plotados os gráficos de superfície e de contorno (Figura 14), onde também se verificou maior eficiência de extração quando a proporção de etanol em água é de aproximadamente 50%.

Visto que, no presente trabalho, os extratos constituídos por maiores teores de compostos fenólicos foram obtidos utilizando entre 40 e 50% de etanol e tempo de aplicação do ultrassom de 40 a 60 minutos, procedeu-se a identificação dos compostos fenólicos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Desta maneira, considerando o rendimento de extrato, teor de compostos fenólicos totais e atividades antioxidantes, o perfil de compostos fenólicos foi analisado nos extratos, de ambas as cascas, produzidos por 50% de etanol e submetidos a 40 minutos de ultrassom.

A Tabela 8 apresenta o perfil de compostos fenólicos presentes nos extratos de maior potencial antioxidante, obtidos a partir das cascas provenientes dos processamentos vias úmida e seca.

Observa-se para ambas as cascas a presença dos ácidos cafeico e gentísico, e também de epicatequina e catequina. Verifica-se que os compostos fenólicos, com exceção do ácido cafeico, estão presentes em maiores quantidades nas cascas provenientes do processamento via seca, destacando-se o teor de epicatequina (21,66 mg/kg). Já para as cascas obtidas via úmida, o composto de maior teor encontrado foi a catequina (3,86 mg/kg). Para ambas as cascas, a quercetina e os ácidos salicílico e *p*-cumárico não foram detectados nos extratos.

No estudo realizado por Pereira (2013), encontrou-se nos extratos de pimentas malagueta e cumari teores de 14,2 e 16,1 mg/kg de epicatequina, valores inferiores ao encontrado no presente estudo. Entretanto, neste mesmo estudo, a pimenta bode apresentou teor de 27,7 mg/kg de ácido salicílico.

Figura 14 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para FT para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.

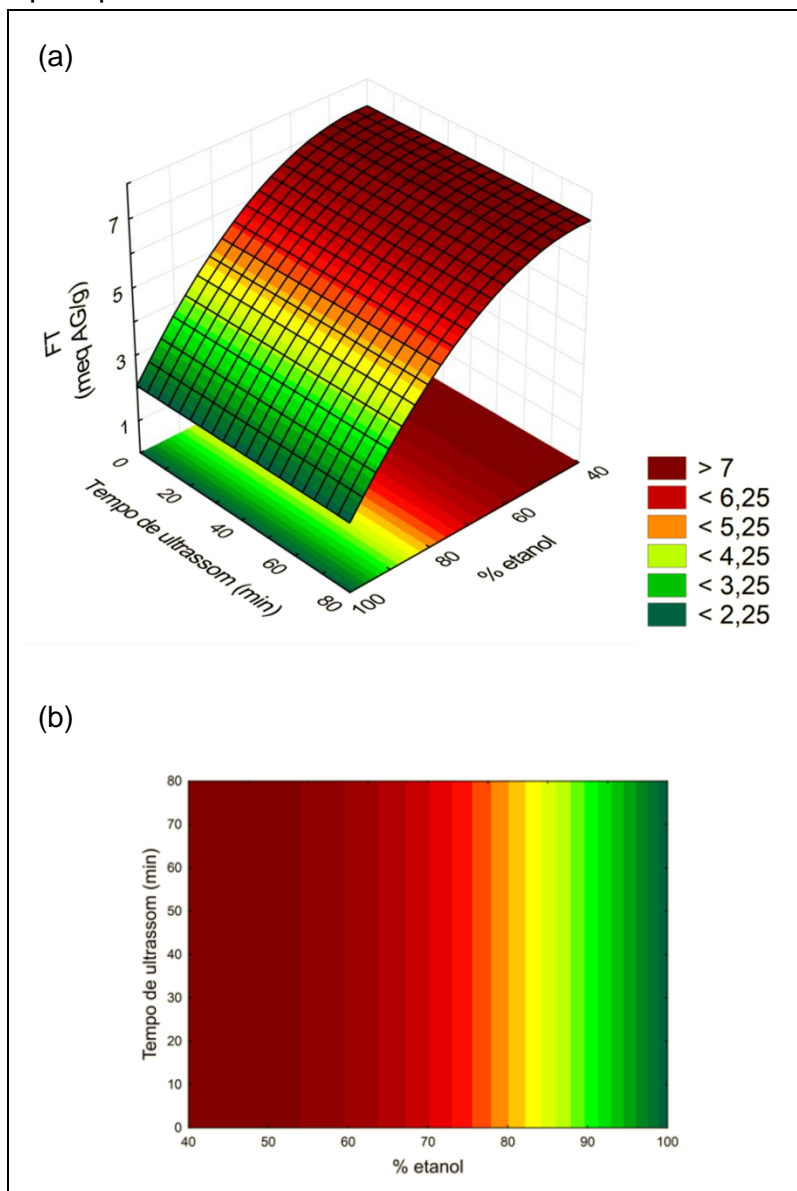


Tabela 8 - Perfil de compostos fenólicos (mg/kg) nos extratos vias seca e úmida.

Fenólicos	Via seca	Via úmida
Ácido cafeico	1,13 ± 0,01 ^b	1,20 ± 0,00 ^a
Ácido salicílico	nd	nd
Epicatequina	21,66 ± 2,21 ^a	3,53 ± 0,51 ^b
Quercetina	nd	nd
Ácido gentísico	15,82 ± 0,20 ^a	3,16 ± 0,89 ^b
Ácido <i>p</i> -cumárico	nd	nd
Catequina	4,21 ± 0,84 ^a	3,86 ± 0,48 ^a

Valores seguidos das mesmas letras minúsculas em uma mesma linha não diferem significativamente pelo teste t Student em um intervalo de confiança de 95%.

nd: não detectado

Ramirez-Martinez (1988) estudou a composição de compostos fenólicos na polpa do café. Para diferentes cultivares o autor encontrou quantidades de ácido clorogênico entre 238 e 876 mg/kg, correspondendo a 42,2% do total de compostos fenólicos presentes, seguido de epicatequina (21,6%), catequina (2,2%), ácido protocatecuico (1,6%) e ácido ferúlico (1,0%).

O fato de os extratos das cascas tratadas com altas temperaturas apresentarem teores mais elevados de compostos fenólicos totais do que às obtidas pelo processamento via úmida deve-se, possivelmente, à ocorrência da reação de Maillard. Nesta reação, os açúcares redutores e aminoácidos presentes na casca reagem entre si formando as melanoidinas, compostos com alta atividade antioxidante (BUDRYN et al., 2009). Além disso, diferentemente do descascamento via úmida, no processamento via seca ocorre o desprendimento do pergaminho e da mucilagem do grão do café (BORÉM, 2008). Estas diferenças entre os componentes também podem ter contribuído para teores mais elevados nas cascas secas.

- Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH

A atividade antioxidante analisada pelo método do sequestro do radical livre resultou em valor médio de 7,44 meq trolox/g para as cascas obtidas via úmida e de 9,53 meq trolox/g para as obtidas via seca. Similarmente à análise de compostos fenólicos totais, o maior valor encontrado, 15,02 ± 0,35 meq trolox/g, foi para o extrato obtido com menor proporção de etanol (41,71%) e tempo intermediário de ultrassom (40 min), referente ao ensaio 5. Por outro lado, diferentemente dos resultados encontrados para o conteúdo de fenólicos totais, os extratos obtidos com

maiores proporções de etanol (ensaios 3 e 4) não difeririam significativamente entre os processamentos.

Jin et al. (2016) avaliaram as propriedades antioxidantes de 110 espécies de chá de ervas e 8 de chá verde. Ao analisarem a atividade antioxidante pelo método do DPPH, os autores encontraram médias de 90,14 e de 458,03 meq trolox/g peso seco para chá de ervas e chá verde, respectivamente. Estes resultados levaram os autores a concluir que os chás de ervas apresentam atividades antioxidantes inferiores aos chás verdes.

O pergaminho encontrado nos grãos de café, conhecido como película prateada, foi estudado quanto a sua atividade antioxidante. Narita e Inouye (2012) avaliaram as condições de extração utilizando água subcrítica em diferentes temperaturas (25 a 240°C) e observaram que o aumento da temperatura proporcionou a extração de maiores teores de compostos fenólicos totais. Neste estudo, os valores encontrados para a atividade antioxidante realizada pelo método do DPPH variaram de 15,26 a 94,85 meq trolox/g extrato, apresentando a maior concentração nos extratos obtidos a 270°C. Os autores ressaltaram que as atividades antioxidantes apresentaram alta correlação com o conteúdo de fenólicos totais presentes (5,0 a 36,0 meq AG/g matéria seca).

Pode-se observar na Tabela 9 que a proporção de etanol influenciou linearmente e quadraticamente, enquanto que a utilização do ultrassom teve efeito apenas quadrático na atividade antioxidante dos extratos. Embora o tempo de ultrassom não apresente significância a 95% de confiança, o valor p é muito próximo de 0,05. Dessa forma, a influência do parâmetro pode ser considerada significativa, desde que a ANOVA realizada para a regressão não apresente diferença entre os dados experimentais e os preditos no intervalo de confiança estabelecido.

A análise de variância (Apêndice 5) realizada para o modelo criado demonstra que a Equação 6 pode ser utilizada para expressar a atividade antioxidante das cascas de café obtidas via seca, em relação à proporção de etanol (X) e tempo de utilização do ultrassom (t) com $R^2 = 0,97124$.

$$AA = 13,69 + 0,09 X - 2,18 \times 10^{-3} X^2 + 1,85 \times 10^{-4} t^2 \quad (\text{Equação 6})$$

Tabela 9 - Efeitos estimados para atividade antioxidante representada pelo método DPPH para cascas de café obtidas pelo processamento via seca.

	Efeitos estimados	Erro padrão	t (6)	p
Média	10,896	0,453	24,003	0,000
% etanol (L)	-8,310	0,555	-14,946	0,000
% etanol (Q)	-2,223	0,661	-3,360	0,012
Tempo de ultrassom (Q)	-1,484	0,661	-2,243	0,059

t(6): Diferença entre o grau de liberdade total (10) e o número de variáveis significativas (4)

(L): Linear

(Q): Quadrática

As superfícies de resposta e gráfico de contorno (Figura 15) foram plotados. Pode-se observar que os solventes com proporções de etanol entre 40 e 50% foram os mais eficientes para a atividade antioxidante. Em relação à aplicação do ultrassom, verifica-se que quanto maior o tempo de extração maiores foram os resultados obtidos para a análise de DPPH.

Os efeitos estimados para as cascas obtidas via úmida foram analisados e, diferentemente das cascas provenientes do processamento via seca, o tempo de ultrassom não representou um parâmetro significativo (Tabela 10). A atividade antioxidante teve influência linear e quadrática da proporção de etanol com $p < 0,05$.

Tabela 10 - Efeitos estimados para atividade antioxidante representada pelo método DPPH para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.

	Efeitos estimados	Erro padrão	t (7)	p
Média	8,207	0,211	38,761	0,000
% etanol (L)	-5,331	0,356	-14,958	0,000
% etanol (Q)	-2,110	0,405	-5,206	0,000

t(7): Diferença entre o grau de liberdade total (10) e o número de variáveis significativas (3)

(L): Linear

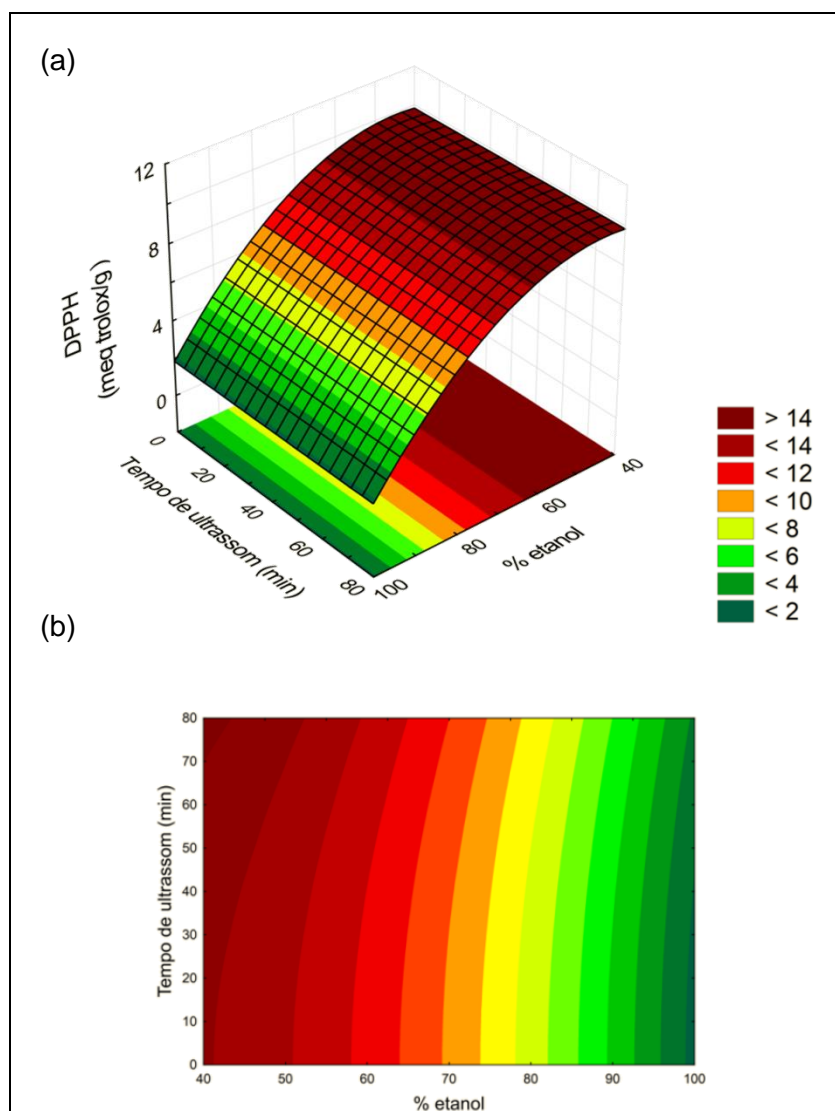
(Q): Quadrática

A partir das variáveis significativas, a análise de variância (Apêndice 6) demonstrou que o modelo representado pela Equação 7 é preditivo e pode ser utilizado para expressar a capacidade antioxidante das cascas de café obtidas por via úmida. Com $R^2 = 0,96909$, a equação foi gerada em função somente da proporção de etanol.

$$AA = 4,61 + 0,24 X - 2,64 \times 10^{-3} X^2$$

(Equação 7)

Figura 15 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para atividade antioxidante pelo método DPPH para cascas de café obtidas pelo processamento via seca.



A partir das imagens geradas para a superfície de resposta e gráfico de contorno (Figura 16), pode-se observar claramente que a atividade antioxidante dos extratos não teve influência do tempo de aplicação do ultrassom. Por outro lado, maiores potenciais antioxidantes foram encontrados nos extratos obtidos com proporções de etanol entre 40 e 50%.

- Atividade antioxidante pelo método da redução do ferro - FRAP

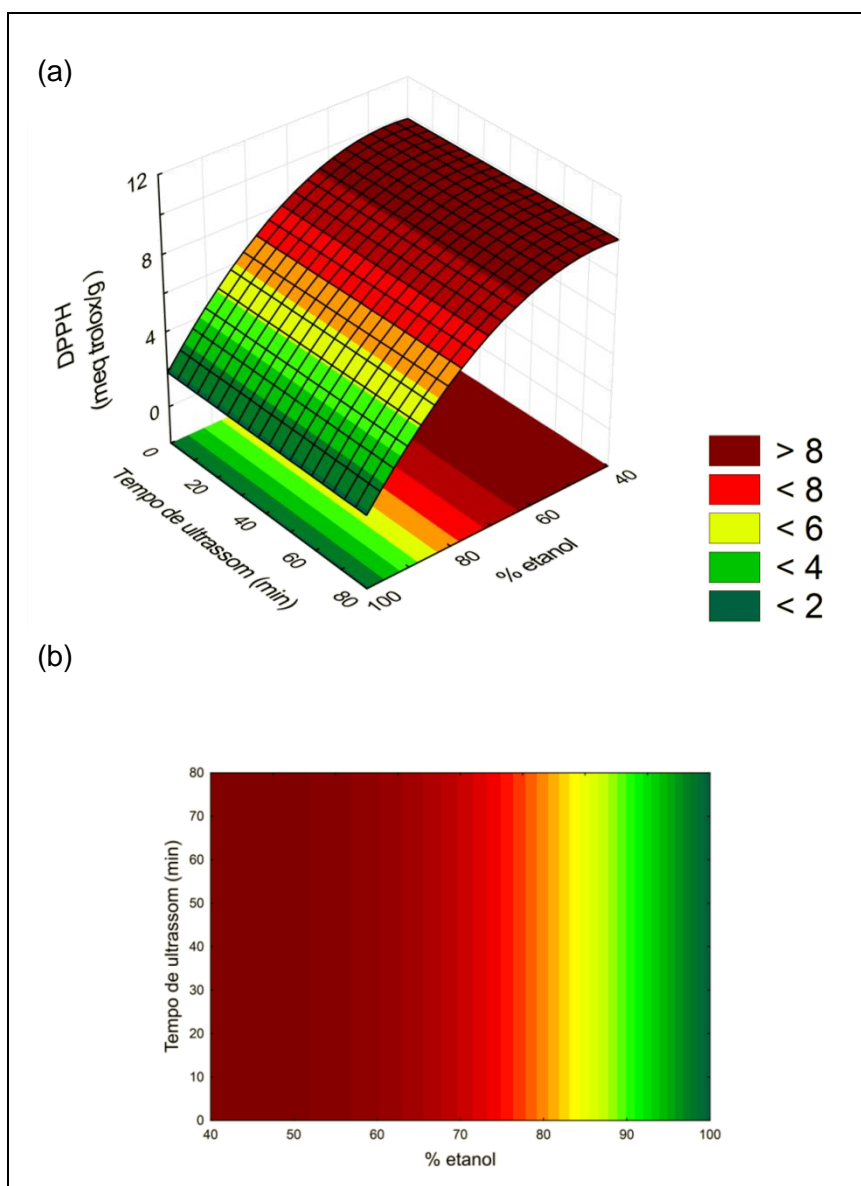
O potencial antioxidante avaliado pelo método de redução do íon férrico mostrou-se superior para as cascas provenientes do processamento via seca, visto que foi possível obter média de 13,26 meq trolox/g matéria seca, enquanto que para as obtidas por via úmida o valor médio foi de 10,19 meq trolox/g matéria seca. Semelhante ao encontrado para as análises de compostos fenólicos totais e DPPH, a maior concentração para FRAP foi encontrada para o extrato contendo menor proporção de etanol e tempo intermediário de aplicação do ultrassom, correspondente ao ensaio 5 das cascas obtidas via seca.

Em estudo sobre a capacidade antioxidante da casca de maracujá, Cazarin et al. (2014) encontraram valores entre 8,73 e 9,15 meq trolox/g amostra, para extratos etanólico e aquoso, respectivamente, os quais correspondem a valores inferiores aos encontrados para os extratos de cascas de café obtidos com menor proporção de etanol no presente trabalho. O mesmo pode ser observado em estudo relatado por Contreras-Calderón et al. (2011) ao avaliarem a capacidade antioxidante de polpa, casca e sementes de 24 frutas colombianas, em que observaram valores entre 0,88 a 43,75 meq trolox /g matéria seca.

O potencial antioxidante avaliado pelo método FRAP para extratos metanólicos de manjerona sofreu influência do tempo de ultrassom utilizado na extração. Neste estudo, Hossain et al. (2012) obtiveram altas concentrações variando entre 136,80 e 170,80 meq trolox/g de matéria seca para 10 min de aplicação. Este sistema proporcionou a obtenção de extratos com maiores atividades antioxidantes comparado com a extração convencional sólido/líquido (90,0 mg trolox/g de matéria seca).

Mediante análise dos efeitos estimados, para as cascas obtidas via seca (Tabela 11), pode-se observar que os efeitos, tipo de solvente e tempo de ultrassom,

Figura 16 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para atividade antioxidante representada pelo método DPPH para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.



influenciaram linearmente no poder redutor do ferro, com $p < 0,05$. Embora a influência quadrática não tenha apresentado significância em intervalo de confiança de 95% para tempo de ultrassom e proporção de etanol, pode-se considerar este parâmetro significativo desde que o modelo seja preditivo através da análise de variância.

Tabela 11 - Efeitos estimados para atividade antioxidante representada pelo método FRAP para cascas de café obtidas pelo processamento via seca.

	Efeitos estimados	Erro padrão	t (5)	p
Média	14,683	0,609	24,077	0,000
% etanol (L)	-12,533	0,746	-16,781	<0,003
% etanol (Q)	-2,007	0,888	-2,258	0,064
Tempo de ultrassom (L)	2,301	0,746	3,080	0,021
Tempo de ultrassom (Q)	-1,895	0,888	-2,132	0,076

t(5): Diferença entre o grau de liberdade total (10) e o número de variáveis significativas (5)

(L): Linear

(Q): Quadrática

No Apêndice 7 observa-se que a análise de variância demonstrou que a Equação 8 a partir das variáveis significativas, é preditiva e pode ser usada para prever a capacidade redutora do íon férrico como uma função da proporção de etanol (X) e tempo de aplicação de ultrassom (t) com $R^2 = 0,98029$.

$$\text{FRAP} = 18,23 + 0,04X - 2,51 \times 10^{-3} X^2 + 0,25t - 2,37 \times 10^{-3} t^2 \quad (\text{Equação 8})$$

Através das superfícies de respostas e gráficos de contorno (Figura 17) é possível observar que as menores proporções de etanol na solução extratora (entre 40 e 50%) são mais eficientes na atividade antioxidante pelo método FRAP. A eficiência do poder redutor também é maior para utilização de ultrassom entre 40 e 60 min.

Para as cascas provenientes da via úmida (Tabela 12), verificou-se que apenas a proporção de etanol influenciou linearmente e quadraticamente nos efeitos antioxidantes dos extratos. O tempo de utilização do ultrassom na extração de compostos antioxidantes não foi parâmetro significativo ($p > 0,05$).

Figura 17 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para atividade antioxidante pelo método FRAP para cascas de café obtidas pelo processamento via seca.

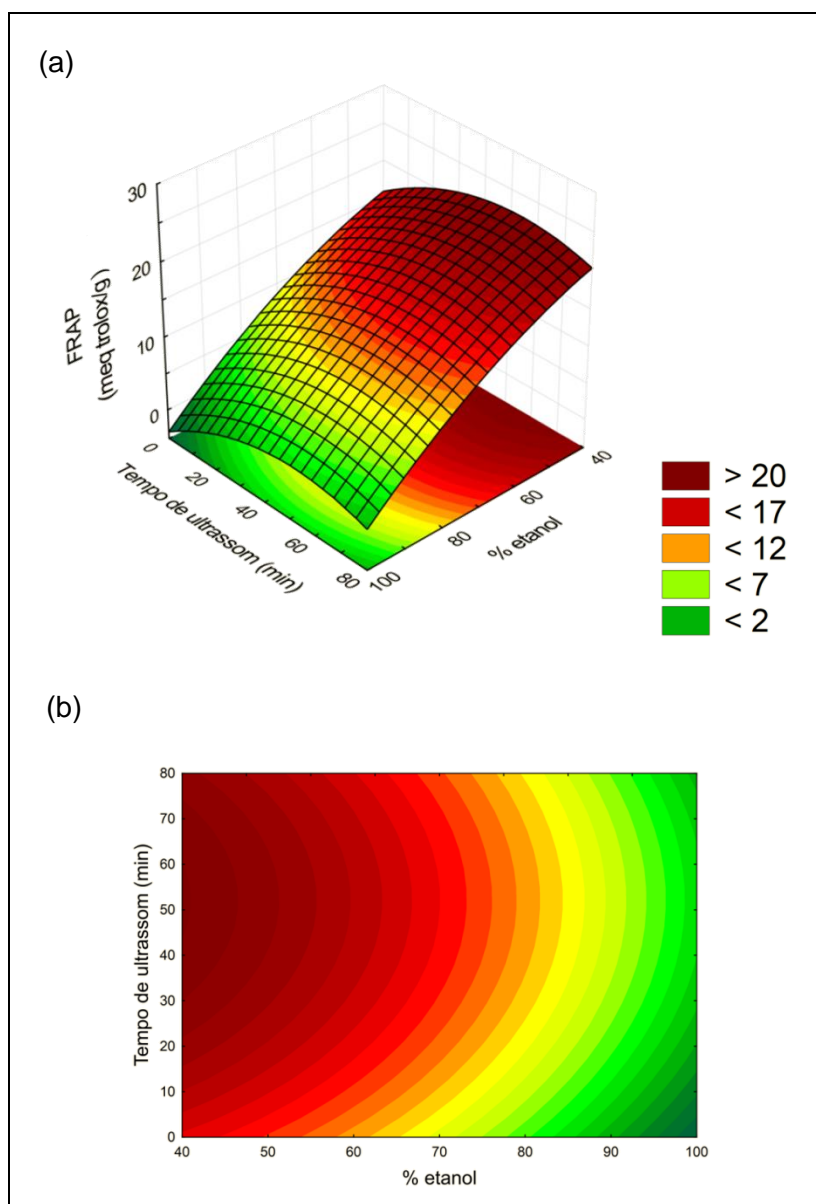


Tabela 12 - Efeitos estimados para atividade antioxidante representada pelo método FRAP para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.

	Efeitos estimados	Erro padrão	t (7)	p
Média	11,162	0,282	39,494	0,000
% etanol (L)	-6,861	0,475	-14,422	<0,001
% etanol (Q)	-2,656	0,541	-4,908	0,001

t(7): Diferença entre o grau de liberdade total (10) e o número de variáveis significativas (3)

(L): Linear

(Q): Quadrática

A ANOVA realizada para as cascas obtidas por via úmida (Apêndice 8) demonstrou que a Equação 9 gerada pelo modelo criado é preditiva e pode ser utilizada para expressar a atividade antioxidante pelo método FRAP, com $R^2 = 0,9667$, em função apenas da proporção de etanol.

$$\text{FRAP} = 6,90 + 0,29X - 3,32 \times 10^{-3} X^2 \quad (\text{Equação 9})$$

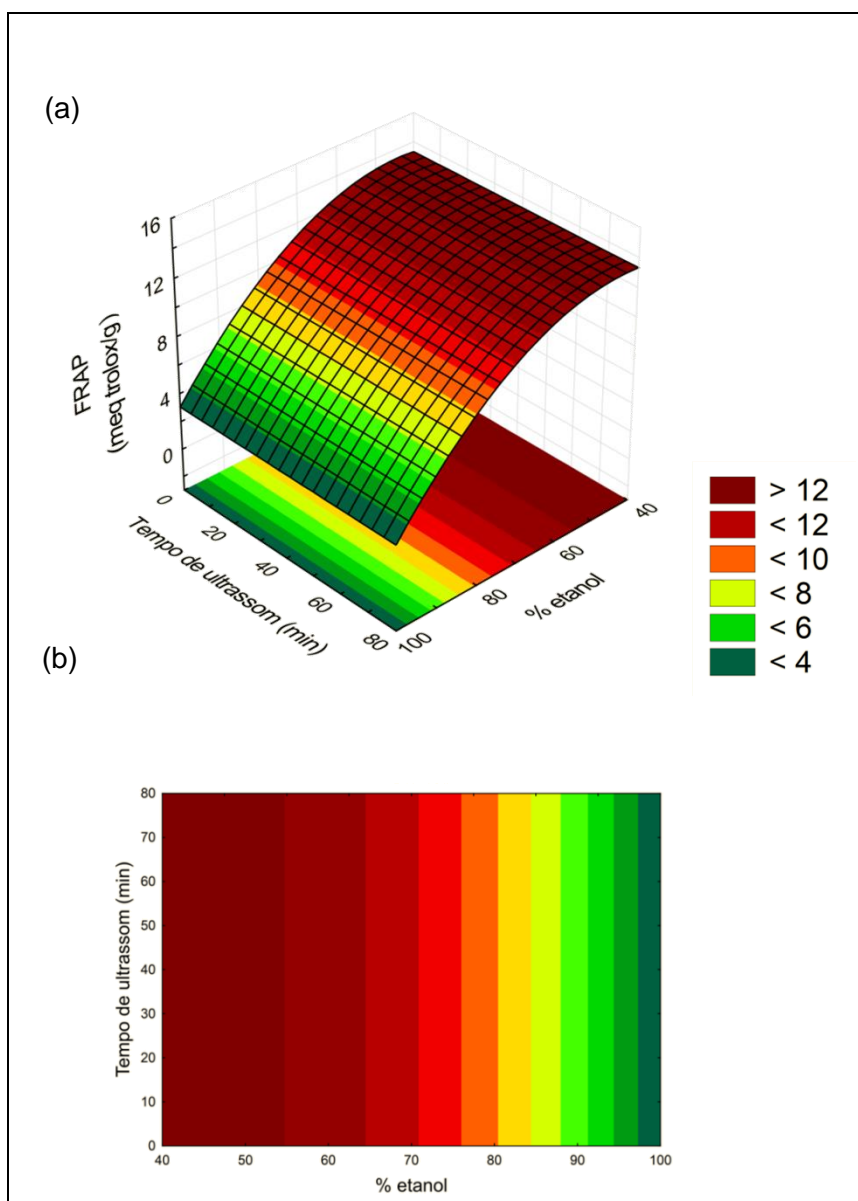
Os gráficos de superfície e de contorno (Figura 18) foram plotados e, assim como para os extratos de cascas obtidas por via seca, foi possível observar melhor atividade antioxidante quando utilizados solventes com menores proporções de etanol (entre 40 e 50%).

De acordo com as análises realizadas, as melhores condições de extratos obtidas para os compostos fenólicos totais foi para o extrato de cascas provenientes do processamento via seca com 50% de etanol e tempo de aplicação em ultrassom de 40 minutos. Em seguida, o extrato foi rotaevaporado à baixa pressão (160 mmHg) e liofilizado para remoção do solvente.

O extrato liofilizado foi ressuspenso com etanol e o teor de compostos fenólicos totais do extrato liofilizado determinado pela metodologia de Singleton e Rossi (1965), obtendo a concentração de 12,94 meq AG/g extrato.

Posteriormente, o extrato foi aplicado ao óleo de soja na concentração de 200 mg/kg de compostos fenólicos totais, e o tratamento com o extrato das cascas (EC) foi comparado com o óleo de soja adicionado dos antioxidantes sintéticos TBHQ e BHA.

Figura 18 - Superfície de resposta (a) e gráfico de contorno (b) para atividade antioxidante pelo método FRAP para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.



- Relação entre análises

Mediante características estruturais presentes nos compostos fenólicos, têm sido atribuído a estas substâncias um alto potencial redutor de radicais livres. As propriedades antioxidantes do conteúdo fenólico nas cascas de café foram determinadas através de análises específicas como DPPH e FRAP. Diante disso, para cada tipo de casca, foram gerados gráficos demonstrando a correlação entre o conteúdo total de fenólicos e as metodologias utilizadas para medir a atividade antioxidante.

Pode-se observar, na Figura 19, que para as cascas provenientes do processamento via seca, as análises realizadas para as atividades antioxidantes correlacionaram-se linearmente com o teor de fenólicos totais com $r = 0,9890$ para a metodologia do DPPH e $r = 0,9917$ para FRAP. Este tipo de correlação condiz com o relatado por Dudonné et al. (2009).

O gráfico gerado para as cascas obtidas por via úmida apresentou menores correlações entre os métodos, com $r = 0,9558$ e $r = 0,9546$ para DPPH e FRAP respectivamente (Figura 20).

Embora os parâmetros utilizados para obtenção dos extratos tenham apresentado menores efeitos para esta matéria-prima, pode-se considerar também que as análises das atividades antioxidantes apresentaram correlação significativa com os teores de fenólicos, visto que quanto maior o conteúdo de compostos fenólicos maiores foram as atividades antioxidantes.

5.2 ANÁLISES NOS ÓLEOS

- Estabilidade oxidativa

A análise de variância para determinação da estabilidade oxidativa, utilizando os valores obtidos ao longo da estocagem acelerada em estufa, está apresentada no Apêndice 9. Observa-se que o teste foi significativo ($p < 0,05$) para tratamentos, tempos de aquecimento e sua interação. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados estão representados na Tabela 13.

Figura 19 - Relação entre a análise do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) para os extratos de cascas de café obtidas pelo processamento via seca.

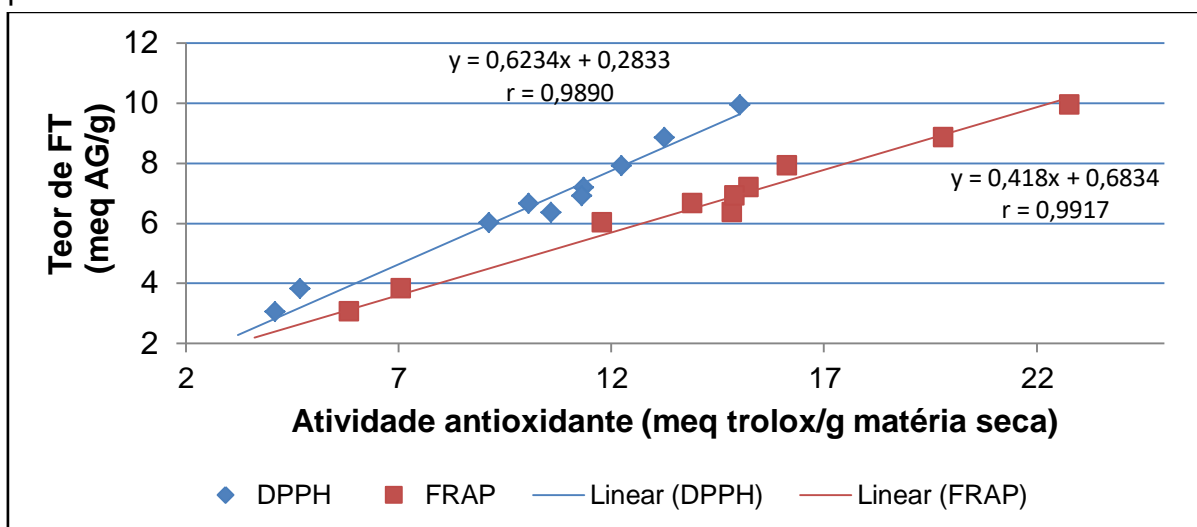


Figura 20 - Relação entre a análise do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e FRAP) para os extratos de cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.

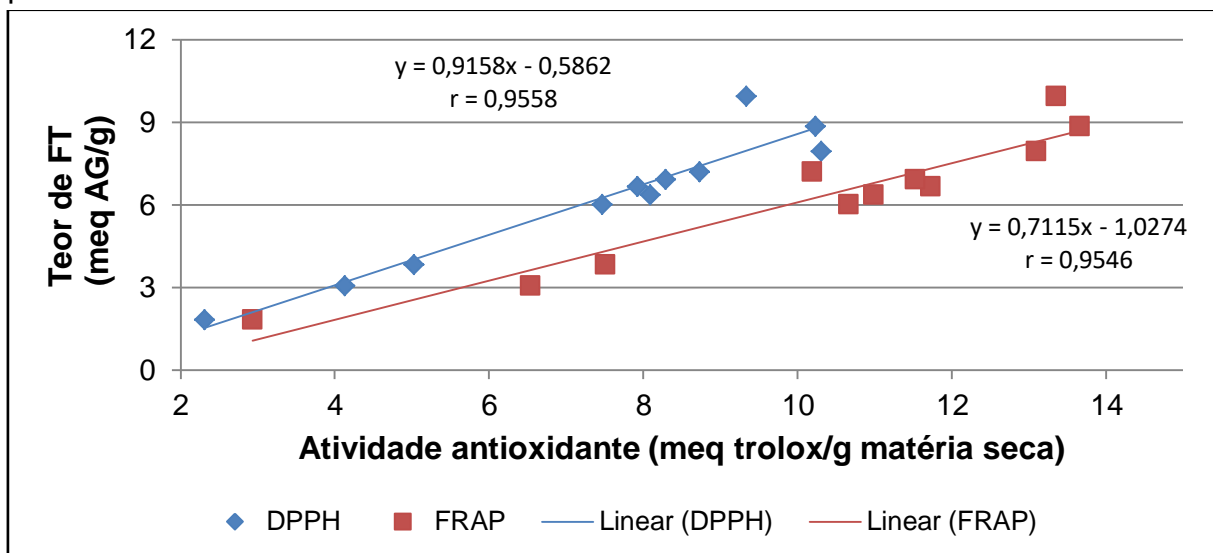


Tabela 13 - Médias de estabilidade oxidativa (h) das amostras submetidas à estocagem acelerada em estufa.

Tratamentos	Tempo de estocagem (dias)				
	0	5	10	15	20
Controle	5,91 ± 0,06 ^{aC}	4,82 ± 0,01 ^{bD}	2,96 ± 0,03 ^{cE}	2,37 ± 0,15 ^{cB}	1,57 ± 0,13 ^{dC}
BHA	6,37 ± 0,06 ^{aC}	5,00 ± 0,06 ^{bCD}	3,49 ± 0,09 ^{cDE}	2,98 ± 0,46 ^{cB}	2,06 ± 0,01 ^{dC}
TBHQ	15,53 ± 0,06 ^{aA}	15,17 ± 0,42 ^{aA}	13,76 ± 0,03 ^{bA}	10,56 ± 0,56 ^{cA}	11,10 ± 0,38 ^{cA}
EC	6,05 ± 0,40 ^{aC}	5,28 ± 0,10 ^{bCD}	4,37 ± 0,11 ^{cC}	2,93 ± 0,23 ^{dB}	1,96 ± 0,12 ^{eC}
BHA + EC	5,77 ± 0,08 ^{aC}	5,53 ± 0,04 ^{aC}	3,64 ± 0,07 ^{bD}	2,69 ± 0,02 ^{cB}	1,83 ± 0,01 ^{dC}
TBHQ + EC	11,65 ± 0,04 ^{aB}	11,27 ± 0,33 ^{aB}	10,13 ± 0,13 ^{bB}	10,07 ± 0,16 ^{bcA}	9,29 ± 0,21 ^{cB}

Controle (óleo de soja), TBHQ (óleo de soja + 200 mg/kg TBHQ), BHA (óleo de soja + 200 mg/kg BHA), EC (óleo de soja + 200 mg/kg compostos fenólicos de extrato de cascas de café), BHA + EC (óleo de soja + 100 mg/kg BHA + 100 mg/kg EC), e TBHQ + EC (óleo de soja + 100 mg/kg TBHQ + 100 mg/kg EC)

Valores seguidos das mesmas letras minúsculas em uma mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey em um intervalo de confiança de 95%.

Valores seguidos das mesmas letras maiúsculas em uma mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey em um intervalo de confiança de 95%.

A estabilidade oxidativa das amostras submetidas a 60°C em estufa durante 20 dias mostrou que, para todos os tratamentos houve uma redução na estabilidade do óleo de soja após o período de aquecimento. O extrato de cascas de café apresentou comportamento similar ao Controle e ao BHA. No entanto, em relação a estes tratamentos, o antioxidante natural contribuiu para uma melhor estabilidade em 10 dias de estocagem, visto que o período de indução foi de 4,37 h para EC e 2,96 e 3,49 h para o controle e BHA, respectivamente, com diferença significativa.

O TBHQ foi o sintético mais eficiente durante todo o período de oxidação acelerada. O tratamento TBHQ + EC proporcionou pouca variação entre os períodos de indução, não havendo diferença significativa entre os tempos 0 e 5 dias e também entre 10 e 15 dias. Neste tratamento verifica-se efeito sinérgico em 15 dias de estocagem, visto que os períodos de indução não diferiram significativamente quando o TBHQ foi utilizado na concentração 200 mg/kg.

Os resultados obtidos nesta pesquisa são próximos aos encontrados em estudo sobre a atividade antioxidante de especiarias. Ravelli (2011) relatou que os períodos de indução do óleo de soja adicionado de extrato de orégano e manjerona, na concentração de 100 mg/kg de fenólicos, foram de 6,80 e 7,20 h, respectivamente. O autor ressaltou ainda que a adição de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia e tomilho ao óleo de soja não proporcionou efeito antioxidante significativo em relação ao controle. Entretanto, neste trabalho também foi relatado que o TBHQ foi o antioxidante que proporcionou maior estabilidade ao óleo de soja frente à oxidação catalisada por alta temperatura.

- Índice de peróxidos

Peróxidos são os principais produtos primários da oxidação, e podem ser determinados por meio da análise do índice de peróxidos. Alta quantidade de peróxidos consiste em baixa estabilidade oxidativa (Yang, 2016).

O Apêndice 10 apresenta a análise de variância para a determinação do índice de peróxidos, utilizando os valores obtidos ao longo da estocagem acelerada em estufa. Observa-se que o teste foi significativo ($p < 0,05$) para os tratamentos, tempos de aquecimento e sua interação. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados estão representados na Tabela 14.

Tabela 14 - Médias de índice de peróxidos (meq/kg) das amostras submetidas à estocagem acelerada em estufa.

Tratamentos	Tempo de estocagem (dias)				
	0	5	10	15	20
Controle	1,20 ± 0,29 ^{eA}	5,94 ± 0,14 ^{dA}	44,42 ± 0,28 ^{cB}	65,70 ± 0,89 ^{bA}	92,55 ± 2,71 ^{aB}
BHA	2,01 ± 0,28 ^{eA}	6,44 ± 0,84 ^{dA}	48,34 ± 0,71 ^{cA}	65,36 ± 0,23 ^{bA}	94,97 ± 0,14 ^{aA}
TBHQ	0,50 ± 0,42 ^{bA}	1,80 ± 0,27 ^{abC}	2,11 ± 0,14 ^{abE}	2,41 ± 0,00 ^{aD}	3,37 ± 0,00 ^{aE}
EC	0,90 ± 0,14 ^{eA}	2,81 ± 0,29 ^{dBC}	23,92 ± 0,28 ^{cD}	54,62 ± 0,08 ^{bC}	74,15 ± 0,10 ^{aD}
BHA + EC	1,10 ± 0,14 ^{eA}	3,81 ± 0,02 ^{dB}	40,66 ± 0,77 ^{cC}	61,75 ± 0,05 ^{bB}	87,54 ± 0,14 ^{aC}
TBHQ + EC	0,80 ± 0,28 ^{cA}	1,71 ± 0,43 ^{bcC}	2,31 ± 0,14 ^{abcE}	2,71 ± 0,14 ^{abD}	3,51 ± 0,42 ^{aE}

Controle (óleo de soja), TBHQ (óleo de soja + 200 mg/kg TBHQ), BHA (óleo de soja + 200 mg/kg BHA), EC (óleo de soja + 200 mg/kg compostos fenólicos de extrato de cascas de café), BHA + EC (óleo de soja + 100 mg/kg BHA + 100 mg/kg EC), e TBHQ + EC (óleo de soja + 100 mg/kg TBHQ + 100 mg/kg EC)

Valores seguidos das mesmas letras minúsculas em uma mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

Valores seguidos das mesmas letras maiúsculas em uma mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey em um intervalo de confiança de 95%.

Observa-se que houve aumento do índice de peróxidos para todos os tratamentos durante 20 dias de estocagem. O uso do BHA não proporcionou redução na formação dos peróxidos ao óleo de soja, apresentando índices de peróxidos maiores que o controle nos tempos 10 e 20 dias de aquecimento.

O extrato de cascas de café proporcionou ao óleo de soja menor quantidade de peróxidos formados em relação ao tratamento com BHA. Quando utilizados em conjunto, o EC foi capaz de atuar como sinergista, uma vez que a quantidade de peróxidos foi inferior à encontrada no tratamento com apenas BHA.

O TBHQ apresentou comportamento similar à análise de estabilidade oxidativa utilizando o equipamento Rancimat®. Embora a quantidade de peróxidos formados não tenha diferido significativamente entre os tratamentos no tempo 0, o índice de peróxidos determinado para o TBHQ foi inferior a todos os outros tratamentos durante os 20 dias, exceto ao tratamento com o extrato natural em 5 dias de estocagem.

Observa-se também, o efeito sinérgico entre EC e TBHQ. O extrato apresentou capacidade de reduzir a formação dos produtos primários da oxidação, obtendo-se valores não diferentes significativamente aos encontrados para o tratamento apenas com o antioxidante sintético. A Portaria 482/99 – ANVISA estabelece o máximo de 10 meq/kg de índice de peróxidos para o óleo de soja refinado (BRASIL, 2005). Dessa maneira, no presente estudo, todos os tratamentos foram eficientes até o 5º dia, e essa eficiência se manteve para os tratamentos TBHQ e TBHQ + EC ao longo de todo o período de estocagem.

Zhang, Li e Wang (2010), avaliaram a estabilidade oxidativa de óleo de girassol adicionado de extratos de alecrim. Este estudo mostrou que o valor de peróxidos aumentou de forma linear com o tempo de armazenamento, atingindo o máximo de 272 meq/kg em 21 dias para o controle. Embora tenha apresentado valores maiores ao presente trabalho, a taxa de formação de peróxidos foi reduzida para os tratamentos constituídos pelo extrato de alecrim e pelos antioxidantes sintéticos BHA e TBHQ, os quais obtiveram valores de 75,7, 205,0, e 20,0 meq/kg respectivamente, ao final da estocagem.

- Dienes conjugados

A análise de variância para a determinação de dienos conjugados ao longo da estocagem em estufa é apresentada no Apêndice 11. Visto que o teste foi significativo ($p < 0,05$) para os tratamentos, tempos de estocagem e sua interação, os resultados obtidos a partir do desdobramento encontram-se na Tabela 15. Observa-se que, para os tratamentos Controle, BHA, EC e BHA + EC houve aumento na quantidade de dienos conjugados formados a partir de 5 dias de estocagem, não havendo diferença significativa entre os tratamentos nos tempos 0 e 5 dias. Embora ao final do tratamento em estufa, o tratamento EC tenha obtido valores semelhantes aos encontrados para o Controle e para o tratamento BHA + EC, o extrato de cascas de café proporcionou uma redução de 45,83% em relação ao Controle em 10 dias de estocagem.

O tratamento TBHQ foi o mais eficiente, em que observa-se redução de 62,83% de dienos conjugados em relação ao Controle. Este valor condiz com o encontrado por Silva e Jorge (2012), em que o antioxidante sintético apresentou 65,42% de redução dos compostos em relação ao Controle. Além disso, a aplicação do antioxidante sintético TBHQ com o extrato de cascas de café possibilitou estabilidade na formação dos compostos durante todo o tempo de estocagem, obtendo-se ao final do período uma redução de 68,24%. Similarmente ao ocorrido para o índice de peróxidos, verifica-se o efeito sinérgico entre o extrato natural e o sintético, visto que não houve diferença entre os tratamentos TBHQ e TBHQ + EC.

- Retenção de tocoferóis

A determinação da concentração de antioxidantes nos óleos, sobretudo, dos tocoferóis, é uma maneira de monitorar a qualidade do óleo, visto que são componentes importantes para a prevenção da oxidação lipídica.

As análises de variância para a determinação de α -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol e tocoferóis totais estão apresentadas nos Apêndices 12a, 12b, 12c e 12d, respectivamente. Observa-se que o teste foi significativo ($p < 0,05$) para os efeitos tratamentos, tempos de estocagem e sua interação. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 16.

Tabela 15 - Médias de dienos conjugados (%) das amostras submetidas à estocagem acelerada em estufa.

Tratamentos	Tempo de estocagem (dias)				
	0	5	10	15	20
Controle	0,42 ± 0,01 ^{cA}	0,48 ± 0,04 ^{cA}	0,96 ± 0,11 ^{bA}	0,91 ± 0,03 ^{bB}	1,48 ± 0,05 ^{aB}
BHA	0,39 ± 0,01 ^{dA}	0,47 ± 0,02 ^{dA}	0,79 ± 0,03 ^{cB}	1,52 ± 0,04 ^{bA}	1,77 ± 0,02 ^{aA}
TBHQ	0,41 ± 0,01 ^{bA}	0,40 ± 0,02 ^{bA}	0,38 ± 0,02 ^{bD}	0,41 ± 0,02 ^{bC}	0,55 ± 0,01 ^{aC}
EC	0,41 ± 0,01 ^{dA}	0,38 ± 0,04 ^{dA}	0,52 ± 0,02 ^{cC}	0,86 ± 0,03 ^{bB}	1,38 ± 0,06 ^{aB}
BHA + EC	0,41 ± 0,02 ^{dA}	0,43 ± 0,01 ^{dA}	0,70 ± 0,02 ^{cB}	0,87 ± 0,02 ^{bB}	1,44 ± 0,02 ^{aB}
TBHQ + EC	0,42 ± 0,04 ^{aA}	0,42 ± 0,01 ^{aA}	0,41 ± 0,01 ^{aD}	0,41 ± 0,00 ^{aC}	0,47 ± 0,01 ^{aC}

Controle (óleo de soja), TBHQ (óleo de soja + 200 mg/kg TBHQ), BHA (óleo de soja + 200 mg/kg BHA), EC (óleo de soja + 200 mg/kg compostos fenólicos de extrato de cascas de café), BHA + EC (óleo de soja + 100 mg/kg BHA + 100 mg/kg EC), e TBHQ + EC (óleo de soja + 100 mg/kg TBHQ + 100 mg/kg EC)

Valores seguidos das mesmas letras minúsculas em uma mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey em um intervalo de confiança de 95%.

Valores seguidos das mesmas letras maiúsculas em uma mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey em um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 16 - Médias dos teores de tocoferóis (mg/kg) presentes nas amostras submetidas à estocagem acelerada em estufa.

Tratamentos	Tempos de estocagem (dias)			
	0	5	10	20
α-tocoferol				
Controle	49,40 \pm 0,00 ^{aA}	31,25 \pm 0,21 ^{bD}	15,75 \pm 0,07 ^{cE}	nd
BHA	38,80 \pm 0,14 ^{aC}	35,95 \pm 1,06 ^{bAB}	16,4 \pm 0,14 ^{cDE}	Nd
TBHQ	38,40 \pm 0,14 ^{aC}	31,75 \pm 0,07 ^{bD}	28,25 \pm 0,35 ^{cB}	27,55 \pm 0,21 ^B
EC	41,95 \pm 0,21 ^{aB}	35,25 \pm 0,07 ^{bB}	22,25 \pm 0,49 ^{cC}	nd
BHA + EC	35,40 \pm 0,57 ^{bD}	36,8 \pm 0,14 ^{aA}	17,55 \pm 0,64 ^{cD}	nd
TBHQ + EC	33,50 \pm 0,57 ^{aE}	33,75 \pm 0,21 ^{aBC}	33,5 \pm 0,28 ^{aA}	30,5 \pm 0,28 ^A
γ-tocoferol				
Controle	198,65 \pm 0,49 ^{aA}	160,15 \pm 0,78 ^{bB}	134,65 \pm 0,64 ^{cC}	57,15 \pm 0,92 ^{dD}
BHA	167,85 \pm 0,35 ^{aD}	162,25 \pm 0,07 ^{bA}	132,15 \pm 1,06 ^{cD}	58,6 \pm 0,57 ^{dD}
TBHQ	165,10 \pm 0,85 ^{aE}	153,15 \pm 0,49 ^{bD}	151,13 \pm 0,60 ^{cA}	149,85 \pm 0,07 ^{cA}
EC	189,65 \pm 0,92 ^{aB}	163,0 \pm 0,14 ^{bA}	136,8 \pm 0,57 ^{cB}	84,0 \pm 0,71 ^{dC}
BHA + EC	172,50 \pm 0,42 ^{aC}	156,25 \pm 0,21 ^{bC}	130,9 \pm 0,99 ^{cD}	52,55 \pm 0,35 ^{dE}
TBHQ + EC	157,25 \pm 0,35 ^{aF}	154,8 \pm 0,57 ^{bCD}	151,0 \pm 1,27 ^{cA}	146,1 \pm 0,42 ^{dB}
δ-tocoferol				
Controle	49,80 \pm 0,42 ^{aA}	34,9 \pm 0,14 ^{bC}	34,85 \pm 0,35 ^{bAB}	28,4 \pm 0,42 ^{cD}
BHA	41,15 \pm 0,35 ^{aC}	38,8 \pm 0,71 ^{bA}	35,05 \pm 0,21 ^{cAB}	29,75 \pm 0,49 ^{dCD}
TBHQ	39,95 \pm 0,49 ^{aC}	36,15 \pm 0,64 ^{bBC}	33,7 \pm 0,14 ^{cB}	32,55 \pm 0,35 ^{cAB}
EC	43,75 \pm 0,21 ^{aB}	37,6 \pm 0,71 ^{bAB}	34,85 \pm 0,49 ^{cAB}	31,15 \pm 0,35 ^{dBC}
BHA + EC	39,78 \pm 0,11 ^{aC}	37,15 \pm 0,35 ^{bB}	33,65 \pm 0,78 ^{cB}	29,15 \pm 0,78 ^{dD}
TBHQ + EC	37,85 \pm 0,42 ^{aD}	37,4 \pm 1,20 ^{abAB}	36,10 \pm 0,42 ^{bA}	33,7 \pm 0,28 ^{cA}
Tocoferóis totais				
Controle	297,85 \pm 0,92 ^{aA}	226,3 \pm 0,85 ^{bAB}	185,25 \pm 1,06 ^{cC}	85,55 \pm 0,49 ^{dD}
BHA	247,80 \pm 0,42 ^{aC}	237,0 \pm 1,84 ^{bA}	183,6 \pm 1,41 ^{bC}	88,35 \pm 1,06 ^{cD}
TBHQ	243,45 \pm 1,20 ^{aC}	221,05 \pm 1,06 ^{bB}	213,05 \pm 0,21 ^{cB}	177,4 \pm 0,28 ^{dB}
EC	275,35 \pm 0,49 ^{aB}	235,85 \pm 0,92 ^{bA}	190,2 \pm 0,28 ^{cBC}	118,85 \pm 1,20 ^{dC}
BHA + EC	245,05 \pm 0,64 ^{aC}	232,83 \pm 0,04 ^{bAB}	180,85 \pm 0,64 ^{cC}	81,7 \pm 1,13 ^{dD}
TBHQ + EC	226,85 \pm 0,64 ^{aD}	226,4 \pm 1,56 ^{aAB}	221,9 \pm 1,13 ^{abA}	210,3 \pm 0,42 ^{bA}

Controle (óleo de soja), TBHQ (óleo de soja + 200 mg/kg TBHQ), BHA (óleo de soja + 200 mg/kg BHA), EC (óleo de soja + 200 mg/kg compostos fenólicos de extrato de cascas de café), BHA + EC (óleo de soja + 100 mg/kg BHA + 100 mg/kg EC), e TBHQ + EC (óleo de soja + 100 mg/kg TBHQ + 100 mg/kg EC)

Valores seguidos das mesmas letras minúsculas em uma mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey em um intervalo de confiança de 95%.

Valores seguidos das mesmas letras maiúsculas em uma mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey em um intervalo de confiança de 95%.

Para α -tocoferol, a análise estatística seguiu o teste t Student a 95% de confiança entre os tratamentos no tempo 20 dias.

nd: não detectado

Observa-se que os teores dos isômeros de tocoferol foram maiores para o Controle no tempo 0, seguido do tratamento EC, apresentando redução significativa ao longo do aquecimento. O isômero β -tocoferol não foi detectado pela análise.

Os teores de α -tocoferol e δ -tocoferol apresentaram boas retenções pelo tratamento TBHQ + EC durante os primeiros 10 dias de estocagem, visto que as concentrações não diferiram significativamente durante o período. Após este tempo, o TBHQ foi o único tratamento que se manteve constante para os três isômeros.

Dentre os isômeros de tocoferol, o mais estável foi o γ -tocoferol protegido pelo tratamento TBHQ + EC, em que apresentou redução de apenas 7,09% em relação ao seu teor inicial. Embora o α -tocoferol tenha apresentado maior susceptibilidade à oxidação para o Controle, BHA, EC e BHA + EC, o tratamento EC + TBHQ também protegeu efetivamente este isômero, com redução de 8,95% de sua concentração inicial.

A aplicação de 100 mg/kg de TBHQ com 100 mg/kg de extrato de cascas proporcionou melhor proteção a todos os isômeros comparado ao tratamento onde o TBHQ foi aplicado na concentração de 200 mg/kg. Para os teores de tocoferóis totais, verificou-se que o efeito protetor foi mais efetivo para os tratamentos TBHQ + EC seguido do TBHQ, com redução de 7,29 e 27,13%, respectivamente.

Desta maneira, verifica-se que a adição do extrato de cascas de café atuou em sinergia com o antioxidante sintético TBHQ na proteção dos tocoferóis presentes no óleo de soja, e que o γ -tocoferol foi o antioxidante mais eficaz em impedir a degradação dos tocoferóis.

A atividade antioxidante de cogumelos na oxidação acelerada do óleo de soja foi estudada por Silva e Jorge (2014). Neste trabalho os autores relataram que o α -tocoferol foi o isômero menos resistente ao período de estocagem. Por outro lado, o extrato de cogumelo e o antioxidante TBHQ foram eficazes na proteção dos isômeros β , γ e δ -tocoferol, permanecendo constantes em todo o tempo de aquecimento.

- Ganho de massa

A taxa de oxidação em termos do ganho de massa foi avaliada por meio de pesagem direta dos tratamentos a cada 24 horas durante 24 dias. Esta análise é

empregada para estimar a quantidade de oxigênio adicionada às moléculas insaturadas da amostra lipídica e também para acompanhar a formação de hidroperóxidos durante a oxidação.

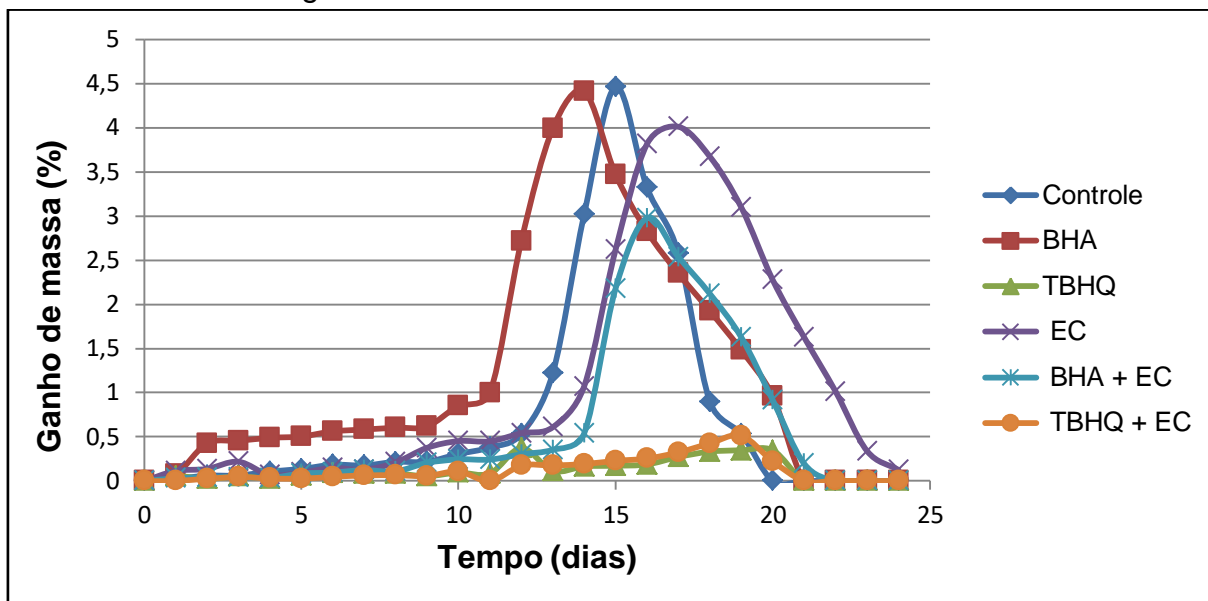
O Apêndice 13 apresenta a análise de variância para a determinação de ganho de massa. Observa-se que o teste foi significativo ($p < 0,05$) para os efeitos principais e para a interação tratamentos x tempo de estocagem. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados encontram-se no Apêndice 14.

Na Figura 21 observa-se que os tempos requeridos para alcançar 0,5% do aumento de massa foram de 5 dias para BHA, 12 dias para o controle e EC, 14 e 19 para as misturas de BHA + EC e TBHQ + EC, respectivamente. O antioxidante TBHQ foi o mais eficiente em relação à porcentagem de massa adquirida, atingindo um máximo de 0,37% de ganho de massa em 12 dias de estocagem. O extrato de cascas de café (EC) contribuiu para um início do ganho de massa mais tardio que o demonstrado pelo antioxidante BHA, assumindo maior ganho de massa em 17 dias, com 4,01%. Além disso, o EC apresentou um efeito sinérgico tanto com o BHA quanto com o TBHQ, mostrando, com este último, efeito similar ao adquirido pelo óleo de soja adicionado apenas de TBHQ.

O declínio do ganho de massa observado para todos os tratamentos se deve ao fato de que os produtos primários da oxidação formados durante o período de estocagem acelerada podem ser degradados em compostos de baixa massa molecular e também em substâncias voláteis.

Em estudo do ganho de massa de óleo de soja adicionado de extratos de cogumelos sob estocagem a 60°C, Silva e Jorge (2014) constataram a proteção contra a oxidação do óleo de soja evidenciada pelo extrato de cogumelo do sol, não apresentando aumento significativo da massa até o 15º dia. Neste mesmo trabalho, a mistura de TBHQ e Shiitake, até o 11º dia de estocagem também não proporcionou aumento significativo, atingindo um máximo de 4,0%.

Figura 21 - Taxa de oxidação em termos de ganho de massa das amostras submetidas à estocagem acelerada em estufa.



Controle (óleo de soja), TBHQ (óleo de soja + 200 mg/kg TBHQ), BHA (óleo de soja + 200 mg/kg BHA), EC (óleo de soja + 200 mg/kg compostos fenólicos de extrato de cascas de café), BHA + EC (óleo de soja + 100 mg/kg BHA + 100 mg/kg EC), e TBHQ + EC (óleo de soja + 100 mg/kg TBHQ + 100 mg/kg EC)

6 CONCLUSÕES

O trabalho realizado permitiu avaliar o potencial antioxidante das cascas de café obtidas por ambos os processamentos, bem como o efeito da adição do extrato das cascas na estabilidade do óleo de soja quando submetido à estocagem acelerada em estufa.

Os resultados apontam que maiores quantidades de compostos fenólicos foram encontradas em extratos hidroalcoólicos constituídos por menores proporções de etanol (40-50%). Maiores atividades antioxidantes tanto para o método do DPPH como FRAP também foram encontradas para os extratos nas mesmas concentrações de solvente, observando alta correlação entre os compostos fenólicos presentes e a atividade antioxidante.

A utilização do ultrassom influenciou significativamente na otimização do processo de extração dos compostos fenólicos das cascas provenientes do processamento via seca. Os extratos constituídos por proporções próximas a 50% de etanol apresentaram maiores potenciais antioxidantes quando submetidos a tempos de ultrassom entre 40 e 60 min, visto que tempos de extração superiores podem ocasionar na degradação de compostos sensíveis.

O rendimento do volume de extrato não foi influenciado pela aplicação de ultrassom. Por outro lado, maiores proporções de etanol possibilitaram melhores rendimentos. Dessa maneira, o extrato das cascas provenientes da via seca, constituído por 50% de etanol e submetido a 40 minutos de ultrassom, foi aplicado ao óleo de soja na concentração de 200 mg/kg.

O sintético TBHQ mostrou maior eficiência na inibição da formação de compostos primários da oxidação lipídica. Entretanto, o EC apresentou alta estabilidade oxidativa quando aplicado com o antioxidante sintético, ambos na concentração de 100 mg/kg, proporcionando também menor taxa de oxidação em termos de ganho de massa. Além disso, o extrato das cascas mostrou comportamento similar ao antioxidante sintético BHA na estabilidade oxidativa durante os primeiros dias de estocagem. Por outro lado, o tratamento BHA + EC foi capaz de proporcionar menor ganho de massa em relação ao adquirido pelo óleo de soja adicionado somente de BHA.

O efeito sinérgico também foi observado na retenção de tocoferóis pelo tratamento TBHQ + EC, protegendo efetivamente todos os isômeros. Este efeito proporcionou reduções mínimas principalmente no teor do γ -tocoferol, o qual apresentou maior estabilidade durante a estocagem.

Dessa maneira, pode-se concluir que, quando comparado aos antioxidantes sintéticos, o EC mostrou-se capaz de retardar a oxidação lipídica, podendo ser utilizado como alternativa ao sintético BHA. Além disso, o efeito sinérgico entre o EC e TBHQ possibilitou a redução da concentração do TBHQ a ser aplicado ao óleo de soja, contribuindo para uma melhor segurança à saúde.

7 REFERÊNCIAS

- ACHKAR, M. T. et al. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 11, n. 2, p. 398-406, 2013.
- ALLEN, J. C.; HAMILTON, R. J. **Rancidity in foods**. 3ed., London: Blackie Academic Professional, 1994. p. 290.
- ANDRADE, K. S. et al. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, London, v. 88, p. 544-552, 2012.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.
- ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, London, v. 127, p. 183-198, 2002.
- ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 353-380, 2001.
- AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 6. ed., Champaign: AOCS, 2009.
- ARAÚJO, J. M. A. Oxidação de lipídios em alimentos. In: ARAÚJO, J. M. A. (Ed.). **Química de alimentos: teoria e prática**. 3 ed., Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 1-67.
- ARUOMA, O. I. Free radicals and food. **Chemistry in Britain**, London, v. 29, n. 3, p. 210-214, 1993.
- BAGGIO, J. **Avaliação dos resíduos (casca e pó orgânico) de café (*Coffea arabica* L.) como provável fonte de substâncias bioativas**. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, London, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- BARCELOS, A. F. et al. Parâmetros bromatológicos da casca e polpa desidratada de café (*Coffea arabica* L.) armazenadas em diferentes períodos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 780-790, 2002.
- BELITZ, H. D.; GROSH, W.; SCHIEBERLE, P. Lipids. In: BELITZ, H. D.; GROSH, W. et al. **Food chemistry**, London, 4. ed. Hamburg: Springer, 2009. p. 191-193.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BORÉM, F. M. **Pós-Colheita do Café**. 1 ed., Lavras: Editora UFLA, 2008. p. 631.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 269, de 22 de setembro de 2005. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005. **Regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**. Brasília, 2005.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROINIZI, P. R. B. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 902-908, 2007.

BUDRYN, G. et al. Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 228, n. 6, p. 913-922, 2009.

CARRIÓN, J. A. C. **Influencia de los ultrasonidos de potencia en procesos de transferencia de materia**. 2003. 318 f. Tesis Doctoral (Doctorado em Ciencia y Tecnologia de los Alimentos) – Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 2003.

CAZARIN, C. B. B. et al. Capacidade antioxidante e composição química da casca de maracujá (*Passiflora edulis*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, p. 1699-1704, 2014.

COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de café, Safra 2015, Quarto Levantamento**, Brasília, n. 2 p. 1-60. 2015.

CONTRERAS-CALDERÓN, J. et al. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 2047-2053, 2011.

DERGAL, B. S. **Química de los alimentos**. 4 ed., Nancalpon de Juárez: Pearson Educación de México, 2006. p. 736.

DIAS, D. R. et al. Management and utilization of wastes from coffee processing. In: SCHWAN, R. F. e FLEET, G. H. (Ed.). **Cocoa and coffee fermentations**. Boca Raton: CC Taylor & Francis, 2014. p.545-588.

DONNELLY, J. K.; ROBINSON, D. S. Invited review free radicals in foods. **Free Radical Research**, London, v. 22, n. 2, p. 147-176, 1995.

DROZDOWSKI, B.; SZUKALSKA, E. A rapid instrumental method for the evaluation of the stability of fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 64, n. 7, p. 1008-1011, 1987.

DUDONNÉ, S. et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 5, p. 1768-1774, 2009.

DUGAN, L. R. Natural Antioxidants. In: **Autoxidation in food and biological systems**, Springer, 1980. p. 261-282.

ERENEL, G.; ERBAŞ, D.; ARICIOĞLU, A. Free radicals and antioxidant systems. **Materia Medica Polona. Polish Journal of Medicine and Pharmacy**, Warszawa, v. 25, n. 1, p. 37-43, 1993.

ESPÍN, J. C. et al. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 5, p. 1588-1592, 2000.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, Barking, v. 46, n. 2, p. 488-495, 2012.

FAN, L.; ESKIN, N. A. M. The use of antioxidants in the preservation of edible oils In: (Ed.). **Handbook of antioxidants for food preservation**, Kidlington: Woodhead Publishing, 2015. p. 373-388.

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 19, n. 1-2, p. 1-22, 1980.

FRANKEL, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 220-225, 1993.

FRANKEL, E. N. et al. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 5, p. 1054-1059, 1994.

GALLEGO-JUÁREZ, J. A. Some applications of air-borne power ultrasound to food processing. In: POVEY, M. J. W. e MASON, T. J. (Ed.). **Ultrasound in food processing**. London: Chapman & Hall, 1999. p.127-143.

GIOMO, G. S. Uma pós-colheita é segredo da qualidade. **A Lavoura**, Rio de Janeiro, v. 115, n. 668, p. 12-21, 2012.

GÓMEZ-ALONSO, S. et al. Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 36-42, 2007.

GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action in vitro. In: HUDSON, B. J. F. (Ed.). **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 1-18.

HAGERMAN, A. E. et al. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 5, p. 1887-1892, 1998.

HOSSAIN, M. B. et al. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana L.*) using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 582-590, 2012.

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

HUANG, S. W.; FRANKEL, E. N.; GERMAN, J. B. Antioxidant activity of .alpha.- and .gamma.- tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 10, p. 2108-2114, 1994.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 246-254, 2007.

JIN, L. et al. Antioxidant properties and color parameters of herbal teas in China. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 87, p. 198-209, 2016.

JORGE, N. **Química e tecnologia de óleos vegetais**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2009. p. 165.

JORGE, N.; GONÇALVES, L. A. G. Aditivos utilizados em óleos e gorduras de frituras. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 40-47, 1998.

KIM, S.Y. et al. Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grapes seed extracts. **Food Chemistry**, London, v. 97, n. 3, p. 472-479, 2005.

KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. **Nutrition Reviews**, New York, v. 51, n. 2, p. 33-40, 1993.

LAGE, F. F. **Caracterização química e quantificação de compostos fenólicos em forrageiras**. 2009. 126 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MACDONALD-WICKS, L. K.; WOOD, L. G.; GARG, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, n. 13, p. 2046-2056, 2006.

MALCOLMSON, L. J. et al. Sensory stability of canola oil: present status of shelf life studies. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 71, n. 4, p. 435-440, 1994.

MASON, T. J.; CORDEMANS, E. D. Ultrasonic intensification of chemical processing and related operations: a review. **Chemical Engineering Research & Design**, Elmsford, v. 74, n. A5, p. 511-516, 1996.

MASON, T. J.; LORIMER, J. P. **Applied sonochemistry: uses of power ultrasound in chemistry and processing**. Weinheim: Wiley-vch, 2002. 293 p.

MATOS, A. T. Tratamento e destinação final dos resíduos gerados no beneficiamento do fruto do cafeeiro. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). **Produção integrada de café**. Viçosa: UFV - DFP, 2003. p. 648-695.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MELO, P. S. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of agroindustrial residues. **Ciência Rural**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 6, p. 1088-1093, 2011.

MENEZES, E. G. T. et al. Use of different extracts of coffee pulp for the production of bioethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 169, n. 2, p. 673-687, 2013.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, London, v. 72, n. 2, p. 145-171, 2001.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - a review. **Resources, Conservation and Recycling**, Kidlington, v. 66, p. 45-58, 2012.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NARITA, Y.; INOUE, K. High antioxidant activity of coffee silverskin extracts obtained by the treatment of coffee silverskin with subcritical water. **Food Chemistry**, London, v. 135, n. 3, p. 943-949, 2012.

NARITA, Y.; INOUE, K. Review on utilization and composition of coffee silverskin. **Food Research International**, Barking, v. 61, p. 16-22, 2014.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1985. p. 139-244.

O'BRIEN, R. D. **Fats and oils: formulating and processing for applications**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 680.

ORDOÑEZ, J. A. P. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 294.

PEÑALOZA, W. et al. Solid-State Fermentation: an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, n. 2, p. 388-393, 1985.

PEREIRA, D. C. **Efeito antioxidante de extrato de pimenta em óleo de soja sob diferentes condições de estocagem**. 2013. 106 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2013.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, Barking, v. 39, n. 7, p. 791-800, 2006.

QUIÑONES, M.; MIQUEL, M.; ALEIXANDRE, Y. Los polifenoles, compuestos de origen natural com efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. **Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v. 27, n. 1, p. 76-89, 2012.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 755-760, 2006.

RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Phenolic Compounds in Coffee Pulp: Quantitative Determination by HPLC. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 43, p. 135-144, 1988.

RAVELLI, D. **Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial**. 2011, 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

REHMAN, Z. U.; HABIB, F.; SHAH, W. H. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. **Food Chemistry**, London, v. 85, n. 2, p. 215-220, 2004.

REISCHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: AKOH, C. C. e MIN, D. B. (Ed.). **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**, 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 489-516.

ROLZ, C. et al. **Coffee fermentation studies**. Association scientifique internationale du café (ASIC), Lisbon, p. 259-268, 1971.

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

SERPEN, A. et al. Direct measurement of the total antioxidant capacity of cereal products. **Journal of Cereal Science**, London, v. 48, n. 3, p. 816-820, 2008.

SILVA, A. C.; JORGE, N. Antioxidant properties of *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei* extracts. **Journal of Food Quality**, Wastport, v. 34, n. 6, p. 386-394, 2011.

SILVA, A. C.; JORGE, N. Oxidative stability of soybean oil added to *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei* mushrooms extracts in an accelerated storage test. **Nutrition & Food Science**, London, v. 42, n. 1, p. 34-40, 2012.

SILVA, A. C.; JORGE, N. Influence of *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei* extracts on the prevention of oxidation and retention of tocopherols in soybean oil in an accelerated storage test. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 51, n. 6, p. 1208-1212, 2014.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, p. 94-103, 1999.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOARES, D. J. et al. Processos oxidativos na fração lipídica de alimentos. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 30, n. 2, 2012.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOCCOL, C. R. **Resíduo de café: um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado**. EMBRAPA-CAFÉ. Brasília: Embrapa. v. 1, p. 83-98. 2002.

SOUSA, M. S. B. et al. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p. 554-559, 2011.

SOUZA, C. G. **Extração de compostos bioativos e pectina da casca de maracujá utilizando sistema pressurizado e ultrassom**. 2015, 63 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2015.

TALBOT, G. The stability and shelf life of fats and oils. **The Stability and Shelf Life of Food**, 2 ed., p. 461-503, 2016.

TOLEDO, M. C. F.; ESTEVES, W.; HARTMANN, V. E. M. Eficiência de antioxidantes em óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 5, n. 1, p. 1-11, 1985.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 812, n. 1-2, p. 85-99, 2004.

TURATTI, J. M.; GOMES, R. A. R.; ATHIÉ, I. **Lipídeos: aspectos funcionais e nova tendências**. Campinas: ITAL, 2002. p. 78.

VIEIRA, R. D. A. **Composição de alguns vinhos orgânicos produzidos em Videira - SC**. 2010, 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Viticultura e Enologia), Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves. 2010.

WAN, P. J. Accelerated stability methods. In: WARNER, K.; ESKIN, N. A. M. (Ed.). **Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods**. Champaign: AOCS Press, 1995. p. 179-189.

WANG, J. et al. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, London, v. 106, n. 2, p. 804-810, 2008.

YANG, Y. et al. Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 80, p. 141-147, 2016.

YOO, K. M. et al. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. **Food Chemistry**, London, v. 106, n. 3, p. 929-936, 2008.

ZHANG, C. X.; WU, H.; WENG, X. C. Two novel synthetic antioxidants for deep frying oils. **Food Chemistry**, London, v. 84, n. 2, p. 219-222, 2004.

ZHANG, Y.; LI, X.; WANG, Z. Antioxidant activities of leaf extract of *Salvia miltiorrhiza bunge* and related phenolic constituents. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 48, n. 10, p. 2656-2662, 2010.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Análise de variância para rendimento de extrato de cascas de café obtidas pelo processamento via seca.

Fator	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	2	710,91	355,45		
Resíduo	8	95,80	11,97	29,68	3,11
Erro puro	2	18,00	9		
Erro por falta de ajuste	6	77,80	12,96	0,69	9,33
Total	10	806,72			

Apêndice 2 - Análise de variância para rendimento de extrato de cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.

Fator	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	3	516,64	172,21		
Resíduo	7	10,99	1,57	109,65	3,07
Erro puro	2	0,00	0		
Erro por falta de ajuste	5	10,99	2,19	0	9,29
Total	10	527,63			

Apêndice 3 - Análise de variância para a regressão para teor de compostos fenólicos totais para cascas de café obtidas pelo processamento via seca.

Fator	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	4	59,85	14,96		
Resíduo	6	0,59	0,09	151,24	3,18
Erro puro	2	0,13	0,06		
Erro por falta de ajuste	4	0,45	0,11	0,61	9,24
Total	10	60,44			

Apêndice 4 - Análise de variância para a regressão para teor de compostos fenólicos totais para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.

Fator	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Regressão	2	25,76	12,88	39,55	3,11
Resíduo	8	2,60	0,32		
Erro puro	2	1,15	0,57	2,37	9,33
Erro por falta de ajuste	6	1,45	0,24		
Total	10	28,37			

Apêndice 5 - Análise de variância para a regressão para atividade antioxidante representada pelo método DPPH para cascas de café obtidas pelo processamento via seca.

Fator	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Regressão	3	146,14	48,71	78,79	4,35
Resíduo	7	4,32	0,61		
Erro puro	2	1,08	0,54	0,83	19,29
Erro por falta de ajuste	5	3,24	0,64		
Total	10	150,47			

Apêndice 6 - Análise de variância para a regressão para atividade antioxidante representada pelo método DPPH para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.

Fator	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Regressão	2	63,71	31,85	125,39	4,46
Resíduo	8	2,03	0,25		
Erro puro	2	0,32	0,16	0,56	19,33
Erro por falta de ajuste	6	1,71	0,28		
Total	10	65,75			

Apêndice 7 - Análise de variância para a regressão para atividade antioxidante representada pelo método FRAP para cascas de café obtidas pelo processamento via seca.

Fator	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Regressão	4	333,09	83,27	74,64	4,53
Resíduo	6	6,69	1,11		
Erro puro	2	0,94	0,47	0,32	19,25
Erro por falta de ajuste	4	5,74	1,43		
Total	10	339,79			

Apêndice 8 - Análise de variância para a regressão para atividade antioxidante representada pelo método FRAP para cascas de café obtidas pelo processamento via úmida.

Fator	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Regressão	2	105,04	52,52	116,02	4,46
Resíduo	8	3,62	0,45		
Erro puro	2	1,39	0,69	1,88	19,33
Erro por falta de ajuste	6	2,22	0,37		
Total	10	108,66			

Apêndice 9 - Análise de variância para a determinação da estabilidade oxidativa.

Fator de variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Tratamentos	5	887,34	177,46*	3.791,80	3,70
Tempos	4	132,18	33,04*	706,05	4,01
Tratamentos x Tempos	20	12,78	0,64*	13,66	2,54
Resíduo	30	1,40	0,04		
Desvio padrão			0,21		
Coeficiente de variação (%)			3,31		

*teste significativo ($p < 0,05$)

Apêndice 10 - Análise de variância para a determinação de índice de peróxidos.

Fator de variação	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	F _{cal}	F _{tab}
Tratamentos	5	18.921,33	3.784,27*	10.040,1	3,70
Tempos	4	29.827,68	7.456,92*	19.784,1	4,01
Tratamentos x Tempos	20	14.297,40	714,87*	1.896,6	2,54
Resíduo	30	11,3074	0,38		
Desvio padrão			0,61		
Coeficiente de variação (%)			2,31		

*teste significativo ($p < 0,05$)**Apêndice 11** - Análise de variância para determinação de dienos conjugados.

Fator de variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F _{cal}	F _{tab}
Tratamentos	5	2,58	0,51*	520,73	3,70
Tempos	4	4,92	1,23*	1.242,60	4,01
Tratamentos x Tempos	20	2,55	0,12*	128,90	2,54
Resíduo	30	0,02	0,00		
Desvio padrão			0,03		
Coeficiente de variação (%)			4,53		

*teste significativo ($p < 0,05$)**Apêndice 12a** - Análise de variância para a determinação de α -tocoferol.

Fator de variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F _{cal}	F _{tab}
Tratamentos	5	68,64	13,72*	86,71	4,24
Tempos	2	1875,71	937,85*	5.923,31	6,01
Tratamentos x Tempos	10	822,16	82,21*	519,26	3,50
Resíduo	18	2,85	0,15		
Desvio padrão			0,39		
Coeficiente de variação (%)			1,24		

Análise de variância entre todos os tratamentos nos tempos 0, 5 e 10 dias.

*teste significativo ($p < 0,05$)

Apêndice 12b - Análise de variância para a determinação de γ -tocoferol.

Fator de variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Tratamentos	5	4.95787	991,6*	2.345	3,90
Tempos	3	47.165,98	15.722,0*	37.175	4,71
Tratamentos x Tempos	15	18.999,88	1266,7*	2.995	2,88
Resíduo	24	10,15	0,4		
Desvio padrão			0,64		
Coeficiente de variação (%)			0,46		

*teste significativo ($p < 0,05$)**Apêndice 12c** - Análise de variância para a determinação de δ -tocoferol.

Fator de variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Tratamentos	5	24,02	4,80*	18,5	3,90
Tempos	3	796,03	265,35*	1.021,4	4,71
Tratamentos x Tempos	15	226,82	15,12*	58,2	2,88
Resíduo	24	6,23	0,26		
Desvio padrão			0,50		
Coeficiente de variação (%)			1,41		

*teste significativo ($p < 0,05$)**Apêndice 12d** - Análise de variância para a determinação de tocoferóis totais.

Fator de variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Tratamentos	5	7.288,15	1.457*	81,31	3,90
Tempos	3	112.733,43	37.577*	2.09	4,71
Tratamentos x Tempos	15	31.712,09	2.114*	117,93	2,88
Resíduo	24	430,24	17,92		
Desvio padrão			4,23		
Coeficiente de variação (%)			2,10		

*teste significativo ($p < 0,05$)

Apêndice 13 - Análise de variância para a determinação do ganho de massa.

Fator de variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios	F_{cal}	F_{tab}
Tratamentos	5	22,10	4,42*	70,59	3,57
Tempos	5	45,98	9,19*	146,85	3,57
Tratamentos x Tempos	25	36,03	1,44*	23,01	2,33
Resíduo	36	2,25	0,06		
Desvio padrão			0,25		
Coef. de variação (%)			28,80		

Análise de variância entre todos os tratamentos nos tempos 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias.

*teste significativo ($p < 0,05$)

Apêndice 14 - Médias do ganho de massa (%) das amostras submetidas à estocagem acelerada em estufa.

Tratamentos	Tempo de estocagem (dias)							
	3	6	9	12	15	18	21	24
Controle	0,06 ± 0,01 ^{CA}	0,18 ± 0,08 ^{CA}	0,21 ± 0,06 ^{CA}	0,53 ± 0,15 ^{bcB}	4,46 ± 0,80 ^{AA}	1,13 ± 0,00 ^{bC}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
BHA	0,45 ± 0,03 ^{dA}	0,56 ± 0,02 ^{dA}	0,61 ± 0,02 ^{dA}	2,71 ± 0,81 ^{bA}	3,86 ± 0,62 ^{AA}	1,92 ± 0,01 ^{CB}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
TBHQ	0,05 ± 0,00 ^{AA}	0,09 ± 0,02 ^{AA}	0,05 ± 0,15 ^{AA}	0,37 ± 0,04 ^{AB}	0,17 ± 0,01 ^{AC}	0,33 ± 0,05 ^{AD}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
EC	0,21 ± 0,10 ^{CA}	0,09 ± 0,03 ^{CA}	0,37 ± 0,16 ^{CA}	0,44 ± 0,10 ^{CB}	2,61 ± 0,15 ^{BB}	3,67 ± 1,04 ^{AA}	1,62 ± 0,00 ^A	0,12 ± 0,00
BHA + EC	0,04 ± 0,01 ^{bA}	0,12 ± 0,00 ^{bA}	0,20 ± 0,01 ^{bA}	0,39 ± 0,00 ^{bB}	2,17 ± 0,13 ^{AB}	2,11 ± 0,01 ^{AB}	1,19 ± 0,02 ^B	0,00 ± 0,00
TBHQ + EC	0,04 ± 0,01 ^{AA}	0,04 ± 0,00 ^{AA}	0,05 ± 0,00 ^{AA}	0,17 ± 0,01 ^{AB}	0,22 ± 0,00 ^{AC}	0,42 ± 0,01 ^{aCD}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Controle (óleo de soja), TBHQ (óleo de soja + 200 mg/kg TBHQ), BHA (óleo de soja + 200 mg/kg BHA), EC (óleo de soja + 200 mg/kg compostos fenólicos de extrato de cascas de café), TBHQ + EC (óleo de soja + 100 mg/kg TBHQ + 100 mg/kg EC), e BHA + EC (óleo de soja + 100 mg/kg BHA + 100 mg/kg EC)

Valores seguidos das mesmas letras minúsculas em uma mesma linha não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

Valores seguidos das mesmas letras maiúsculas em uma mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 95% de confiança.

No tempo 21 dias, a análise estatística seguiu o teste t Student, a 95% de confiança, entre os tratamentos EC e BHA + EC.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 19 / 10 / 16



Assinatura do autor