



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Lady Rossana Palomino García

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO
FÚNGICA EM ESTADO SÓLIDO NA OBTENÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS A PARTIR DE RESÍDUOS DE
CAFÉ**

São José do Rio Preto

2015

LADY ROSSANA PALOMINO GARCÍA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO
FÚNGICA EM ESTADO SÓLIDO NA OBTENÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS A PARTIR DE RESÍDUOS DE
CAFÉ**

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

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araujo

São José do Rio Preto
2015

Palomino García, Lady Rossana.

Avaliação da influência da fermentação fúngica em estado sólido na obtenção de compostos fenólicos a partir de resíduos de café / Lady Rossana Palomino García. -- São José do Rio Preto, 2015
120 f. : il., tabs.

Orientador: Vanildo Luiz Del Bianchi

Coorientador: Angela Regina Araujo

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Café - Indústria. 3. Resíduos industriais. 4. Fenóis. 5. Fermentação em estado sólido. 6. Antioxidantes. I. Bianchi, Vanildo Luiz Del. II. Araújo, Angela Regina. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 633.73:664

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

LADY ROSSANA PALOMINO GARCÍA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO
FÚNGICA EM ESTADO SÓLIDO NA OBTENÇÃO DE
COMPOSTOS FENÓLICOS A PARTIR DE RESÍDUOS DE
CAFÉ**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Samara Ernandes
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Dois Vizinhos

Prof. Dr. Rodrigo de Oliveira Moraes
Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL – Campinas

Prof. Dr. Elias de Souza Monteiro Filho
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 29 de abril de 2015.

Dedicatória

A Dios

Por sus infinitas bendiciones, por ser mi soporte y siempre guiar mi camino, y por permitirme la culminación de esta etapa.

A mis queridos padres, Gaby y Luis Alberto

Por su ejemplo de honestidad, respeto, trabajo, perseverancia y amor, que ha sido la guía en cada paso que doy. Por ser el estímulo de mis conquistas y la alegría de vencerlas.

A mi hermano Germán y mi sobrina Isabella

Por su presencia en mi vida, su amor y su apoyo incondicional en la distancia. Porque sus sonrisas siempre fueron mi compañía y aliciente en los momentos difíciles.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi por abrir as portas do seu laboratório e aceitar-me como sua aluna de Doutorado. Por esses anos de ensinamento, pela confiança, pela paciência, pela oportunidade de ter conhecido uma grande pessoa e, sobretudo, por ter ganhado um amigo para toda a vida.

À Prof^a. Dr^a. Angela Regina Araújo por permitir realizar uma parte do trabalho nos laboratórios do grupo NuBBE do Instituto de Química de Araraquara. Por toda sua ajuda desinteressada, por seu interesse pela Ciência e por sua especial amizade, sem as quais não seria possível concluir esta Tese de Doutorado.

Aos professores, membros da banca, que gentilmente aceitaram o convite para avaliar este trabalho.

À minha amiga Juliana Ferreira, pela ajuda infinita sempre, pelas boas lembranças e principalmente por nossa amizade, que carregarei comigo para o resto da vida.

A todos meus queridos amigos: Aline, Ariane, Samara, Michele, Dayane, Sidnei, Alexandre, pela amizade e ajuda em diferentes momentos da minha estadia no Brasil. São amigos inesquecíveis.

À Doutoranda Carolina Rabal, do Instituto de Química de Araraquara, pela valiosíssima ajuda nas análises realizadas nos laboratórios do Grupo NuBBE, e pela grande amizade.

À Pos-Doutoranda, Maria Luiza Zeraik do Instituto de Química de Araraquara, pela ajuda e os ensinamentos nas análises de atividade antioxidante.

Às técnicas de laboratório, Tânia Vinturim Gonçalves, do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do IBILCE, e Juliana Rodrigues do Instituto de Química de Araraquara, pela ajuda e pelos notáveis ensinamentos.

Às minhas queridas amigas Yaned e Pilar que, ainda na Colômbia, me apoiaram neste processo e nunca me permitiram desistir.

À Pro reitoria de Pós-graduação da UNESP pela bolsa concedida.

RESUMO

A produção de café gera grande quantidade de resíduos, sendo os principais a casca produzida no tratamento da cereja de café pela via seca, a polpa gerada no processamento pela via úmida e a borra oriunda do processo de obtenção do café solúvel. Na atualidade, esses resíduos têm pouca utilização e são retornados ao solo ou queimados. Assim, este estudo tem como objetivo a adequação dos resíduos de café como substratos para processos fermentativos, assim como a avaliação da influência da fermentação fúngica em estado sólido na obtenção de compostos fenólicos a partir desses resíduos. Obtiveram-se diferentes resíduos da indústria de café, cascas das variedades Arábica e Robusta, provenientes do processamento seco, polpa e pergaminho do café Robusta, gerados no processamento úmido, e borra e torta de café, resíduos do processo de produção de café solúvel. Avaliou-se o conteúdo de proteínas, lipídeos e açúcares redutores nesses resíduos, demonstrando que a presença dessas macromoléculas os faz substratos apropriados para processos fermentativos. Foi avaliado o teor de compostos fenólicos totais, assim como a influência de diferentes solventes no processo de extração, estabelecendo-se que o solvente mais adequado foi a acetona. No processo fermentativo, foi utilizado inicialmente o fungo *Penicillium purpurogenum* e a casca da variedade Robusta como substrato. Neste processo, foi avaliada a presença de soro de queijo como meio de umidificação e foi determinado o teor de compostos fenólicos durante 14 dias. Observou-se aumento no teor de compostos fenólicos, atingindo a maior concentração entre o terceiro e quinto dia. A concentração inicial da suspensão de fungo no processo fermentativo, após cinco dias, teve influência no teor de compostos fenólicos, confirmando-se que, quando se utiliza uma concentração de esporos com um valor de 10^6 , houve maior concentração de compostos fenólicos. Estabelecidos esses critérios, um resíduo de cada tipo do processamento de café foi selecionado como substrato da fermentação em estado sólido, para realizar experimentos utilizando a metodologia de superfície de resposta. Assim, foi avaliada a interação entre o teor inicial da umidade do substrato, a temperatura de incubação e o pH do meio, estabelecendo-se que a umidade e a temperatura são os parâmetros que exercem maior influência no processo. Os melhores resultados na extração de polifenóis foram obtidos quando o teor inicial de umidade no substrato esteve na faixa de 50 a 75%. A temperatura de incubação ideal apresentou pequenas variações para cada resíduo, na casca esteve entre 33 e 35 °C, no caso da polpa, esteve próxima dos 33 °C e na borra de café, apresentou-se um intervalo ótimo de temperatura entre 27 e 33 °C. As variações pequenas no

pH do meio não exerceram uma influência importante no processo, desde que este seja mantido no intervalo ideal de crescimento para os fungos filamentosos, entre 4 e 6.

Os extratos acetônicos da casca Robusta, da polpa e da borra de café foram analisados por CLAE e encontraram-se altos teores de ácido clorogênico, além de ácido cafeico e rutina, embora em menores quantidades. Depois da fermentação, os extratos acetônicos destes resíduos apresentaram variações no teor dos compostos fenólicos, concluindo-se que na fermentação aconteceram hidrólise e biotransformações das moléculas. Os extratos acetônicos apresentaram atividade antioxidante, que aumentou depois da fermentação. Desta forma, pretende-se dar valor agregado aos resíduos de café, proporcionando informação de suas características físico-químicas, assim como dando uma alternativa de uso como uma fonte de compostos fenólicos, ou como potenciais substratos em processos de fermentação em estado sólido.

Palavras-chave: resíduos de café, compostos fenólicos, fermentação em estado sólido, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Coffee production generates a large amount of residues. The principal ones are husk which is produced during the dry processing of coffee cherries, pulp, generated during the wet processing and spend coffee, originated during the process of soluble coffee preparation. Currently, these residues have little use and are returned to the soil or burned. This study aims to improve the knowledge of coffee residues as substrates for fermentation processes and evaluates the influence of fungal solid state fermentation to obtain phenolic compounds from these residues. Different residues were obtained in the coffee industry such as husk of Arabica and Robusta varieties, which are derived from the dry processing, pulp and parchment from Robusta coffee, generated in the wet processing, as well as spend coffee and coffee tart, residues of soluble coffee process. The content of proteins, lipids and reducing sugars in these residues were tested. The tests demonstrated that the presence of these macromolecules makes them suitable substrates for fermentation processes. The content of phenolic compounds and the influence of different solvents in its extraction process were tested and the result showed that the most suitable solvent was acetone. In the fermentation process, the fungus *Penicillium purpurogenum* and the Robusta husk working as a substrate were initially used. In this process the presence of whey to humidify the substrate was evaluated, and the content of phenolic compounds was determined during 14 days. There was an increase in the content of phenolic compounds reaching the highest concentration between the third and fifth day. After five days of fermentation, the initial concentration of the fungus suspension influenced the content of phenolic compounds. It was confirmed because when an inoculum of 10^6 spores/g dry substrate was used, it generated a higher concentration of phenolic compounds. Using these criteria, a residue of each type of coffee processing was selected as fermentation substrate in solid state to conduct experiments using the response surface methodology. As a result, this work evaluated the interaction between the initial content of moisture in the substrate, the incubation temperature and the pH of the medium. Consequently, this study established that the moisture and temperature are the most influential parameters during the process. The best results in extraction of polyphenols were obtained when the initial moisture content was between 50 and 75%. The optimal incubation temperature showed small variations for each residue. The variation in the husk was between 33 and 35°C, while in the pulp it was about 33°C and the optimal temperature for spend coffee ranged between 27 and 33°C. Small variations in the pH of the medium did not exert an

important influence in the process as long as they were maintained in the optimal range for growth for the filamentous fungi: between 4 and 6. In a next step, the acetonic extracts of husk Robusta, pulp and spend coffee were analyzed by HPLC method. High levels of chlorogenic acid, and smaller quantities of caffeic acid and rutin were found. After fermentation, the acetonic extracts of these residues showed variations in the content of phenolic compounds, and it was concluded that during the fermentation process, the hydrolysis and biotransformations of molecules happened. The acetonic extracts showed antioxidant activity, which increased after fermentation. In this way, this study also intends to add value to the coffee residues by providing information on their physico-chemical characteristics and an alternative use as a source of phenolic compounds or as potential substrates for fermentation processes in solid state.

Key-words: coffee residues, phenolic compounds, solid state fermentation, antioxidant activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estruturas básicas de ácidos fenólicos e flavonoides.....	8
Figura 2	Estrutura dos isômeros do ACG.....	11
Figura 3	Camadas da cereja de café.....	13
Figura 4	Processamento da cereja de café.....	13
Figura 5	Resíduos de café de origem brasileiro.....	28
Figura 6	Resíduos de café de origem colombiano.....	29
Figura 7	Cinética da fermentação utilizando dois meios de umidificação.....	52
Figura 8	Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos (mg AG/g de substrato) em casca de café Robusta em função da umidade inicial do meio e a temperatura de incubação.....	58
Figura 9	Superfícies de resposta para o teor de compostos fenólicos (mg AG/g substrato) em casca de café Robusta em função da umidade e o pH do meio (a); umidade do meio e temperatura de incubação (b); temperatura de incubação e pH do meio (c).....	61
Figura 10	Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos (mg AG/g de substrato) em polpa de café em função da umidade inicial do meio e a temperatura de incubação.....	65
Figura 11	Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos (mg AG/g de substrato) em borra de café em função da umidade inicial do meio e a temperatura de incubação.....	67
Figura 12	Diagrama esquemático de um cromatógrafo líquido.....	73
Figura 13	Estruturas dos compostos identificados por UV/DAD nos resíduos de café: a) ácido clorogênico; b) ácido cafeico; c) rutina.....	81

Figura 14	Espectros UV/DAD dos ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico (a) e a rutina (b).....	82
Figura 15	Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata de soluções padrões de: 1 ácido clorogênico, 2 ácido cafeico, 3 rutina.....	83
Figura 16	Perfil cromatográfico em $\lambda = 330$ nm dos extratos da casca Robusta (a) antes da fermentação e (b) após fermentação, submetidos a EFS em C ₁₈ . 1 ácido clorogênico; 2 ácido cafeico; 3 rutina.....	86
Figura 17	Perfil cromatográfico em $\lambda = 330$ nm dos extratos da polpa de café (a) antes da fermentação e (b) após fermentação, submetidos a EFS em C ₁₈ . 1 ácido clorogênico; 2 ácido cafeico; 3 rutina.....	88
Figura 18	Estrutura química do radical DPPH [*]	94
Figura 19	Representação gráfica do CE ₅₀ obtido pelo método do DPPH para os extratos e os padrões.....	101
Figura 20	Representação gráfica do CE ₅₀ obtido pelo método da piranina para os extratos e os padrões.....	103
Figura 21	Cromatograma do extrato bruto de <i>P. purpureogenum</i> em Czapek.....	114
Figura 22	Cromatograma do extrato bruto de <i>P. purpureogenum</i> em CBD.....	115
Figura 23	Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto de <i>P.purpureogenum</i> em CBD (DMSO-d ₆ , 600 MHz).....	116
Figura 24	Espectro de RMN de ¹ H do extrato bruto de <i>P.purpureogenum</i> em Czapek (DMSO-d ₆ , 600 MHz).....	116
Figura 25	Curva de Calibração de Ácido Gálico.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Exemplos de metabólitos secundários com maior rendimento em fermentação em estado sólido.....	10
Tabela 2	Composição da polpa e da casca de café (% peso em base seca).....	14
Tabela 3	Análises físico-químicas dos resíduos de café.....	31
Tabela 4	Composição da polpa, da casca e da borra de café (% de peso em base seca).....	32
Tabela 5	Disponibilidade anual de nutrientes.....	33
Tabela 6	Teor de fenóis totais nos extratos das cascas de café obtidos por agitação.....	34
Tabela 7	Teor de fenóis totais nos extratos dos resíduos de café solúvel obtidos por agitação.....	34
Tabela 8	Teor de fenóis totais nos extratos dos resíduos de café da Colômbia obtidos por agitação.....	34
Tabela 9	Comparação do teor de fenóis totais nos extratos obtidos por agitação dos principais resíduos de café Robusta.....	35
Tabela 10	Teor de fenóis totais nos extratos das cascas de café obtidos por ultrassom.....	35
Tabela 11	Teor de fenóis totais nos extratos dos resíduos de café solúvel obtidos por ultrassom.....	36
Tabela 12	Teor de fenóis totais nos extratos dos resíduos de café da Colômbia obtidos por ultrassom.....	36
Tabela 13	Comparação do teor de fenóis totais nos extratos obtidos por ultrassom dos principais resíduos de café Robusta.....	37

Tabela 14	Comparação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos acetônicos obtidos com dois tipos de extração.....	37
Tabela 15	Comparação entre os extratos aquosos da polpa.....	38
Tabela 16	Delineamento composto central rotacional.....	48
Tabela 17	Delineamento composto central rotacional com deslocamento.....	49
Tabela 18	Comparação da cinética da fermentação utilizando dois meios de umidificação.....	51
Tabela 19	Teor de fenóis totais na casca de café após cinco dias de fermentação, utilizando diferentes concentrações da suspensão do fungo.....	53
Tabela 20	Valores de pH do substrato.....	53
Tabela 21	Teor de compostos fenólicos na casca de café Robusta (planejamento inicial).....	54
Tabela 22	Regressão múltipla para ajuste do modelo quadrático e análise de variância da regressão para os dados de teor de compostos fenólicos em casca de café Robusta ($R^2 = 97,09\%$).....	55
Tabela 23	Teor de compostos fenólicos na casca de café Robusta (segundo planejamento).....	57
Tabela 24	Regressão múltipla para ajuste do modelo quadrático e análise de variância da regressão para os dados de teor de compostos fenólicos em casca de café Robusta ($R^2 = 97,09\%$). Modelo deslocado.....	58
Tabela 25	Teor de compostos fenólicos na polpa de café.....	61
Tabela 26	Regressão múltipla para ajuste do modelo quadrático e análise de variância da regressão para os dados de teor de compostos fenólicos em polpa de café ($R^2 = 92,52\%$).....	62
Tabela 27	Teor de compostos fenólicos na borra de café.....	64

Tabela 28	Regressão múltipla para ajuste do modelo quadrático e análise de variância da regressão para os dados de teor de compostos fenólicos em borra de café ($R^2 = 83,27\%$).....	64
Tabela 29	Gradiente de eluição usado na separação dos compostos fenólicos.....	78
Tabela 30	Parâmetros referentes às curvas analíticas dos padrões.....	80
Tabela 31	Resultados dos ensaios de precisão para os padrões.....	82
Tabela 32	Resultados dos ensaios de exatidão para os padrões.....	83
Tabela 33	Determinação quantitativa por CLAE-UV/DAD dos compostos fenólicos nos extratos da casca de café Robusta.....	85
Tabela 34	Determinação quantitativa por CLAE-UV/DAD dos compostos fenólicos nos extratos da polpa de café.....	87
Tabela 35	Porcentagem de DPPH* reduzido pelas amostras e padrões.....	98
Tabela 36	Porcentagem de radical peroxila sequestrado pelas amostras e padrões....	100
Tabela 37	Meios de cultura utilizados para o cultivo do fungo <i>P. purpurogenum</i>	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	Dicloridrato de 2,2'-azobis(2-metilpropanimidamida)
ACG	Ácido clorogênico
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AG	Ácido gálico
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
C ₁₈	Octadecilsilano
CBD	Caldo-Batata-Dextrose
CE ₅₀	Concentração efetiva média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-UV/DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector ultravioleta por arranjo de diodos
CV	Coeficiente de variação
DCC	Delineamento composto central
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH [•]	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DPR	Desvio padrão relativo
EFS	Extração em fase sólida
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Fermentação submersa
HPLC	High-performance liquid chromatography
MSR	Metodologia de superfície de resposta
R	Recuperação
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
rpm	Rotação por minuto
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível
TFA	Ácido trifluoroacético
TMS	Tetrametilsilano
t _R	Tempo de retenção

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1.1 Fermentação em estado sólido	2
1.1.2 Resíduos agroindustriais como alternativa de suporte.....	5
1.1.3 Compostos fenólicos bioativos	7
1.1.4 Ácidos clorogênicos.....	10
1.1.5 Composição dos resíduos de café.....	12
1.1.6 Atividade Antioxidante.....	16
1.2 OBJETIVOS GERAIS	19
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS	25
2.1 INTRODUÇÃO.....	25
2.2 OBJETIVOS	27
2.3 PARTE EXPERIMENTAL	28
2.3.1 Amostras	28
2.3.2 Análises Físico-Químicas.....	29
2.3.3 Extração de compostos fenólicos	30
2.3.4 Determinação de compostos fenólicos totais.....	30
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
2.4.1 Análises Físico-químicas.....	32
2.4.2 Avaliação do teor de compostos fenólicos totais.....	34
2.4.2.1 Fenóis Totais nos extratos obtidos mediante extração com agitação	34
2.4.2.2 Fenóis Totais nos extratos obtidos mediante extração com ultrassom	36
2.5 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	40
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
CAPÍTULO 3 - PROCESSO DE FERMENTAÇÃO	43
3.1 INTRODUÇÃO.....	43
3.1.1 Fermentação em estado sólido com resíduos de café	43
3.1.2 Metodologia de Superfície de Resposta	44
3.2 OBJETIVOS	46
3.3 PARTE EXPERIMENTAL	47

3.3.1	Microrganismo e inóculo.....	47
3.3.2	Cinética	47
3.3.3	Avaliação da influência da concentração da suspensão do fungo	48
3.3.4	Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)	48
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.4.1	Processo de fermentação utilizando o fungo <i>Penicillium purpurogenum</i> e como substrato a casca de café Robusta	51
3.4.2	Avaliação do efeito de diferentes concentrações da suspensão do fungo no teor de compostos fenólicos após cinco dias de fermentação	54
3.4.3	Metodologia de Superfície de Resposta	56
3.4.3.1	Casca Robusta (Experimento I).....	56
3.4.3.2	Casca Robusta (Experimento II)	58
3.4.3.3	Polpa.....	63
3.4.3.4	Borra	65
3.5	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	69
3.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
CAPÍTULO 4 - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS DOS RESÍDUOS DE CAFÉ ANTES E APÓS FERMENTAÇÃO.....		72
4.1	INTRODUÇÃO.....	72
4.1.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	72
4.1.2	Validação do método analítico.....	73
4.2	OBJETIVOS	75
4.3	PARTE EXPERIMENTAL	76
4.3.1	Materiais, reagentes e padrões analíticos	76
4.3.2	Preparo dos extratos para análise por CLAE-UV/DAD	76
4.3.3	Análise por CLAE-UV/DAD.....	77
4.3.4	Parâmetros analíticos avaliados	77
4.3.4.1	Construção das curvas analíticas e linearidade	77
4.3.4.2	Precisão	78
4.3.4.3	Exatidão	78
4.3.4.4	Análise quantitativa dos compostos majoritários presentes nos extratos dos resíduos de café	79
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
4.4.1	Construção das curvas analíticas e linearidade	82
4.4.2	Precisão	83

4.4.3	Exatidão	84
4.4.4	Análise quantitativa	85
4.5	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	90
4.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
CAPÍTULO 5 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE		93
5.1	INTRODUÇÃO.....	93
5.1.1	Método do radical DPPH'	94
5.1.2	Método para avaliar a ação redutora do radical peroxila	94
5.2	OBJETIVOS	96
5.3	PARTE EXPERIMENTAL	97
5.3.1	Reagentes e padrões analíticos.....	97
5.3.2	Preparo de amostras (soluções estoque)	97
5.3.3	Teste da capacidade redutora de radicais dos extratos (método do DPPH').....	97
5.3.4	Ação redutora sobre radicais peroxila	98
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	100
5.4.1	Análise da capacidade redutora de radicais DPPH'	100
5.4.2	Análise da ação redutora sobre radicais peroxila	102
5.5	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	106
5.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
CAPÍTULO 6 – PERFIS QUÍMICOS DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS DO CULTIVO DE <i>P. PURPUROGENUM</i> EM CZAPEK E CDB		109
6.1	INTRODUÇÃO.....	109
6.2	OBJETIVOS	111
6.3	PARTE EXPERIMENTAL	112
6.3.1	Materiais e reagentes	112
6.3.2	Cultivo do fungo em diferentes meios de cultivo líquido.....	112
6.3.3	Obtenção do extrato bruto de <i>P. purpurogenum</i>	112
6.3.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV/DAD).....	113
6.3.5	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.....	113
6.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	114
6.4.1	Perfil Cromatográfico dos extratos brutos em CLAE-UV/DAD	114
6.4.2	Perfil químico dos extratos brutos em RMN de ¹ H.....	115
6.5	CONCLUSÕES PARCIAIS.....	117
6.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

CONCLUSÕES GERAIS	119
APÊNDICE – Curva de Calibração de Ácido Gálico	120

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1 INTRODUÇÃO

A economia do Brasil, uma das maiores do mundo, está baseada na agricultura, cujos principais produtos de exportação são o café, a cana de açúcar, a soja, a mandioca e as frutas. No entanto, esta grande produção agroindustrial é responsável pela geração de enormes quantidades de resíduos (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003). Existe uma grande preocupação na utilização eficiente desses resíduos agroindustriais, assim como na agregação de valor aos mesmos. Na área de bioprocessos, estes resíduos proporcionam substratos alternativos, e seu uso ajuda a resolver problemas de contaminação ambiental (PANDEY et al., 2000).

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, além de ser a segunda mercadoria mais comercializada depois do petróleo (MUSSATTO et al., 2011). Sendo assim, em toda a cadeia produtiva do café são gerados por ano mais de dois milhões de toneladas de resíduos (FAN et al., 2000). Existem dois métodos de processamento industrial da cereja de café: a via seca e a via úmida. Dependendo do método utilizado, seco ou úmido, os principais resíduos recebem o nome de casca e polpa respectivamente (FAN et al., 2000; MURTHY; NAIUDU, 2012). Mas, as operações que abrangem até a produção de café solúvel, envolvem vários tipos de resíduos além dos mencionados, como o pergaminho, o tegumento ou película e a borra de café. O Brasil é um dos maiores produtores de café no mundo (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003), sendo, portanto, responsável por grande parte desses resíduos, que se constituem principalmente de casca e borra.

Tem sido reportado que esses resíduos são ricos em nutrientes e compostos orgânicos como cafeína, taninos e polifenóis, e que seus extratos podem apresentar boa atividade antioxidante (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003; MURTHY; NAIDU, 2012). Esses compostos fenólicos presentes podem apresentar atividade biológica e potencial antioxidante, sendo a extração dos mesmos uma possibilidade de aproveitamento desses resíduos.

A fermentação em estado sólido (FES) é uma boa alternativa para a produção de compostos fenólicos e para o aumento do seu conteúdo (MARTINS et al., 2011). O uso de resíduos de café como substratos em processos de FES tem sido estudado. O uso da cepa *Fusarium moniliforme* e da casca de café deu como resultado final uma produção de ácido

giberélico (MACHADO et al., 2002). Aromas de frutas foram produzidos a partir de casca de café com *Ceratocystis fimbriata* (SOARES et al., 2000). A produção de compostos fenólicos a partir destes resíduos não tem sido muito estudada. Porém, Machado e outros (2012) encontraram que várias cepas de fungos filamentosos foram capazes de crescer e liberar grande quantidade de compostos fenólicos a partir do tegumento procedente da torrefação e da borra de café.

Não foram encontrados trabalhos que comparem o teor de compostos fenólicos iniciais dos resíduos com o teor apresentado depois do processo de fermentação. Desta maneira, o objetivo deste trabalho é avaliar a influência da fermentação fúngica em estado sólido na obtenção de compostos fenólicos a partir de resíduos da indústria do processamento de café, além de avaliar sua capacidade antioxidante e identificar os principais compostos fenólicos presentes, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

1.1.1 Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) é entendida como o processo microbiológico que ocorre em uma superfície sólida que pode ou não ser biodegradável, e que tem a propriedade de absorver ou conter água, com ou sem nutrientes solúveis (VINIEGRA-GONZÁLEZ, 1997). A FES realiza-se em ausência ou quase ausência de água livre, mas com o substrato possuindo umidade suficiente para sustentar o crescimento e o metabolismo do microrganismo, cujo limite mínimo tem que ser de aproximadamente 12% (VINIEGRA-GONZÁLEZ, 1997; NIGAM, 2009). Em uma definição mais ampla, a FES pode incluir processos nos quais os microrganismos são cultivados na presença de uma fase líquida, em concentrações máximas de substrato ou sobre veículos inertes (HÖLKER; LENZ, 2005). Os fungos são ideais para este tipo de cultivo porque são capazes de crescer em condições de baixa atividade de água, enquanto as bactérias requerem maior presença de água no sistema de fermentação (NIGAM, 2009).

Dependendo da natureza da fase sólida utilizada, dois tipos de FES são diferenciados (BARRIOS-GONZÁLEZ et al., 2005):

- a) A fase sólida está constituída por um material que assume simultaneamente a função de suporte e fonte de nutrientes. Resíduos agrícolas são usados neste caso.

- b) A fase sólida é constituída por um suporte inerte impregnado com um meio líquido. O suporte inerte serve como reservatório para nutrientes e água. Materiais como o bagaço da cana de açúcar ou o poliuretano podem ser usados como suporte inerte.

As vantagens de alguns sistemas de FES em relação à fermentação submersa (FS) incluem baixos requerimentos de energia no processo, já que o oxigênio é transferido quase diretamente ao microrganismo; os metabólitos secundários são produzidos geralmente com rendimentos muito mais elevados, em curto tempo e sem requerer condições estéreis (BARRIOS-GONZÁLEZ et al., 2005); a técnica reproduz o processo microbiológico natural, do mesmo modo como acontece nos processos de compostagem e ensilagem (RODRÍGUEZ-COUTO; SANROMÁN, 2006).

Existem vários fatores importantes que produzem imenso impacto sobre o sucesso da tecnologia de FES. Estes incluem a seleção do microrganismo e do substrato, a otimização dos parâmetros do processo, e também a purificação do produto final, o que tem sido um desafio para esta tecnologia. É necessário o estabelecimento da relação entre a fisiologia dos microrganismos e os fatores físico-químicos. Esses fatores incluem a temperatura, o pH, a aeração, a atividade de água e a umidade, as propriedades do leito e a natureza do substrato sólido (SINGHANIA et al., 2009). Entre estes fatores, a umidade, a natureza do substrato sólido e o tamanho de partícula são os mais importantes nos processos de FES (RODRÍGUEZ-COUTO; SANROMÁN, 2006; SINGHANIA et al., 2009).

A seleção da umidade depende do microrganismo utilizado e também da natureza do substrato. Os fungos precisam de menor teor de umidade do que as bactérias, para seu desenvolvimento. E a seleção de substrato depende de vários fatores, principalmente relacionados com o custo e a disponibilidade e, portanto, pode abarcar o teste de vários resíduos agroindustriais (SINGHANIA et al., 2009).

Geralmente, substratos com tamanho de partícula pequeno proporcionam uma grande área superficial para o ataque microbiano, o que pode ser considerado como um fator desejável. Porém, partículas pequenas também podem gerar aglomeração do substrato, o que interfere com a respiração microbiana, limitando o crescimento do microrganismo. Por sua parte, as partículas de tamanho grande permitem maiores eficiências na respiração, devido ao incremento do espaço entre as partículas, contudo, ao mesmo tempo, provêem uma limitada superfície ao ataque microbiano. Consequentemente, se faz necessário encontrar o tamanho de partícula apropriado para cada processo particular (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; RODRÍGUEZ-COUTO; SANROMÁN, 2006).

A diferença mais conhecida entre a FES e a FS é a esporulação das culturas de fungos. Este parâmetro é bastante difícil de controlar usando FS, porém, mediante a FES é fácil se obter esporos fúngicos. Tem-se sugerido que as condições de cultivo em superfície sólida são mais parecidas com o habitat natural dos organismos fúngicos, o que explicaria a facilidade deles se desenvolverem (VINIEGRA-GONZÁLEZ, 1997). Tem sido observado que tanto os fungos filamentosos quanto a produção de suas enzimas crescem adequadamente em substratos sólidos umedecidos. Os esporos de fungos produzidos por FES mostram maior estabilidade, são mais resistentes à secagem e exibem taxas de germinação mais elevadas durante períodos de tempo mais prolongados após serem submetidos à liofilização, quando comparados com os esporos obtidos por FS (HÖLKER; LENZ, 2005).

Os fungos filamentosos têm se convertido no grupo de microrganismos mais importante para processos de FES, devido às suas capacidades fisiológicas e modo de crescimento de suas hifas, além de sua capacidade de degradar macromoléculas, especialmente carboidratos. Assim, as capacidades fisiológicas dos fungos filamentosos que os fazem apropriados para FES são: sua habilidade de crescer em presença de pouca atividade de água e pH baixo; a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, que permitem a degradação de macromoléculas; sua esporulação, que facilita a armazenagem dos esporos e o preparo do inóculo. O modo de crescimento de suas hifas proporciona uma vantagem sobre microrganismos unicelulares, já que a colonização dos substratos sólidos é rápida, a fim de utilizar os nutrientes disponíveis. Além disso, devido à forma de crescimento das hifas, os fungos filamentosos têm a capacidade de penetrar os substratos sólidos, sendo este um fator importante quando os nutrientes da superfície são totalmente consumidos (MITCHELL, 1992).

Estudos sobre produção de enzimas a partir de fungos em FES têm demonstrado que, em comparação com a FS, os processos de FES proporcionam maiores produtividades volumétricas e são menos propensos a problemas por inanição de substrato, ou à diminuição no rendimento por causa de temperaturas mais altas ou variações de pH. Além disso, o tempo de fermentação pode ser mais curto e a degradação de enzimas é minimizada (HÖLKER; LENZ, 2005). Por essa razão, o uso de FES é um procedimento mais apropriado para produzir esporos para vários tipos de aplicações industriais, como a produção de inóculo de *Penicillium roquefortii* para queijos azuis e Camembert, melhoramento do salame a partir de *P. nalgiovensis*, e também no campo de produção de agentes protetores de plantas usando

Coniothyrium minitans e produção de *Bauveria bassiana* como biopesticida (VINIEGRA-GONZÁLEZ, 1997; HÖLKER; LENZ, 2005).

Quando cultivados em substratos sólidos, um grande número de fungos tem demonstrado um amplo espectro de produção de metabólitos secundários. A produção desses metabólitos parece estar associada com a formação de hifas aéreas e com o aparecimento de esporos na fase estacionária de crescimento. Tem sido observado que vários metabólitos secundários podem ser produzidos unicamente durante o crescimento dos fungos em substratos sólidos, mesmo que os fungos em questão possam ser facilmente cultivados em processos submersos (HÖLKER; LENZ, 2005).

Embora as técnicas da FES sejam conhecidas há séculos, esta tecnologia ganhou uma nova atenção de pesquisadores e indústrias do mundo inteiro nas últimas décadas, devido às vantagens que oferece sobre a FS, principalmente nas áreas de gestão de resíduos sólidos, produção de energia a partir de biomassa e produção de moléculas com alto valor comercial, como metabólitos secundários biologicamente ativos, além da produção de alimentos, rações, combustíveis e produtos químicos (PANDEY; SOCCOL; LARROCHE, 2008).

1.1.2 Resíduos agroindustriais como alternativa de suporte

A disposição direta ao meio ambiente dos resíduos gerados pela agroindústria representa uma das causas principais de poluição ambiental, e também significa uma perda de biomassa que poderia ser utilizada para a produção de diferentes metabólitos com valor comercial. Recentemente, tem-se incrementado o interesse na utilização eficiente dos resíduos agroindustriais, assim como na agregação de valor aos mesmos. Na área de bioprocessos, estes resíduos proporcionam substratos alternativos, e seu uso ajuda a resolver problemas de contaminação ambiental (PANDEY et al., 2000; AJILA et al., 2011).

Na fermentação em estado sólido, o material de suporte deve apresentar características favoráveis para o desenvolvimento dos microrganismos, e preferencialmente ser um material de baixo custo; essas características são encontradas facilmente em resíduos procedentes das atividades agrícolas ou agroindustriais (MARTINS et al., 2011).

A maior parte do material orgânico disponível na natureza apresenta-se em forma polimérica, por exemplo, os polissacarídeos (celulose, hemicelulose, pectinas, amido, etc.), a lignina e as proteínas. Este material pode ser metabolizado por diferentes microrganismos

como fonte de energia. Assim, resíduos agroindustriais na FES proporcionam uma fonte rica e complexa de nutrientes que pode ser suficiente ou algumas vezes insuficiente e incompleta, com respeito aos requerimentos nutricionais totais do microrganismo cultivado no substrato. Uma vez que os resíduos agroindustriais proporcionam uma combinação de compostos de carbono com alto peso molecular, estas formas poliméricas requerem hidrólises enzimáticas para sua mineralização e uso como fonte de energia. Assim, durante o cultivo em estado sólido, essas moléculas de carbono complexas podem contribuir com os mecanismos de inibição ou indução do metabolismo microbiano (NIGAM; PANDEY, 2009).

Diversos resíduos agroindustriais têm sido usados em processos fermentativos. Guimarães e outros (2009) obtiveram a enzima β -fructofuranosidase a partir do fungo *Aspergillus niveus* cultivado em fermentação submersa, em um meio suplementado com bagaço de cana como fonte de carbono. Ácidos orgânicos como o ácido cítrico e o ácido láctico têm sido produzidos por FES; o fungo *Aspergillus niger* foi o responsável pela produção de ácido cítrico a partir de casca de café, e a bactéria *Lactobacillus delbrueckii*, cultivada em bagaço de mandioca e de cana de açúcar, produziu ácido láctico (SHANKARANAND; LONSANE, 1994; JOHN; NAMPOOTHIRII; PANDEY, 2006). Diferentes resíduos, como os farelos de trigo, de arroz ou de milho, a casca de arroz, as farinhas de milho e de sorgo e o bagaço de cana foram testados na produção do antibiótico Neomicina a partir de uma cepa de *Streptomyces marinensis* (ELLAIAH; SRINIVASULU; ADINARAYANA, 2004). O fungo *Ceratocystis fimbriata*, cultivado em estado sólido, tem produzido aromas de frutas: quando cultivado em polpa de frutas cítricas (ROSSI et al., 2009), aumentou o aroma da polpa, e, quando cultivado em casca de café (SOARES et al., 2000), desenvolveu um forte aroma de abacaxi. Os resíduos agroindustriais também têm sido usados para obtenção de compostos bioativos. Vatter e Shetty (2003), por exemplo, reportaram que, mediante FES, houve incremento no conteúdo dos compostos fenólicos em bagaço de arando vermelho (*cranberry*), utilizando o fungo *Lentinus edodes*. Liberação de compostos fenólicos também foi observada utilizando cascas de nozes pecan (*Carya illinoensis*) e várias cepas de *Aspergillus niger* (MEDINA et al., 2010). Por sua parte, Sousa e Correia (2012) utilizaram resíduos de abacaxi e de goiaba como substrato para o fungo *Rhizopus oligosporus*, demonstrando aumento no teor de compostos fenólicos.

Os compostos bioativos são produtos com alto valor agregado, o que justifica seu isolamento a partir de resíduos industriais. Esses resíduos podem ser uma fonte alternativa

para obter antioxidantes naturais, os quais são considerados seguros quando comparados com os antioxidantes sintéticos (MURTHY; NAIDU, 2012).

1.1.3 Compostos fenólicos bioativos

Os compostos bioativos são compostos essenciais e não essenciais (por exemplo, vitaminas e polifenóis respectivamente) que ocorrem na natureza, fazem parte da cadeia alimentar e pode ser demonstrado que têm efeitos, benéficos ou não, sobre a saúde humana (BIESALSKI et al., 2009). Os mais comuns são os metabólitos secundários, tais como antibióticos, micotoxinas, alcaloides, pigmentos, fatores de crescimento e compostos fenólicos (MARTINS et al., 2011). Esses metabólitos secundários são compostos com estrutura química variada e sofisticada, e além de serem produzidos pelas plantas, podem ser produzidos também por algumas espécies microbianas submetidas a estresse (BARRIOS-GONZÁLES et al., 2005).

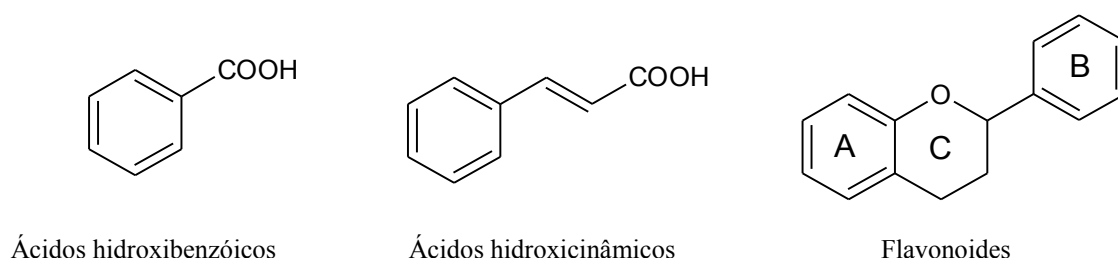
Os compostos fenólicos estão presentes em todas as plantas, e são sintetizados usualmente como resposta aos ataques dos patógenos e insetos, ou em resposta ao estresse ambiental, como a exposição aos raios UV ou a hiper-hidratação (VATTEM; SHETTY, 2003; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). Mais de 8.000 estruturas de fenóis têm sido identificadas, mas todas elas possuem a estrutura básica característica, um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila. (KRIS-ETHERTON et al., 2002; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). Podem-se classificar como moléculas fenólicas simples ou compostos altamente polimerizados. Dessa forma encontram-se, dentro deste grupo, fenóis simples, cumarinas, ligninas, lignanos, taninos condensados e hidrolisáveis, ácidos fenólicos e flavonoides (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

Desta grande variedade estrutural, os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos, são considerados como os principais compostos fenólicos na dieta humana. Os ácidos fenólicos se dividem em dois grupos: os ácidos hidroxibenzóicos com estrutura comum C_6-C_1 , e os ácidos hidroxicinâmicos com estrutura característica C_6-C_3 (Figura 1). Por sua parte, os flavonoides são os compostos fenólicos mais amplamente distribuídos nos tecidos vegetais; consistem em quinze átomos de carbono dispostos em uma configuração $C_6-C_3-C_6$, ou seja, uma estrutura composta por dois anéis aromáticos (A e B), unidos por três carbonos geralmente sob a forma

de um anel heterocíclico (C) (Figura 1). Os taninos estão divididos em taninos hidrolisáveis e condensados, sendo os primeiros ésteres dos ácidos fenólicos, enquanto os segundos são polímeros dos flavonoides (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Pesquisas têm demonstrado que os fenóis possuem excelentes propriedades antioxidantes (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; VATTEM; SHETTY, 2003) e podem apresentar efeitos benéficos na saúde humana. Além disso, apresentam outras atividades, como antialérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora (VATTEM; SHETTY, 2003; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Figura 1 - Estruturas básicas de ácidos fenólicos e flavonoides



FONTE: Khoddami, Wilkes e Roberts (2013)

Os compostos fenólicos exercem seu papel antioxidante de várias formas: sequestrando os radicais livres, pela doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH), o que resulta na formação de um radical fenoxil relativamente estável, que possui a capacidade de suportar um elétron desemparelhado através do deslocamento deste ao redor de todo o sistema de elétrons da molécula; quelando metais de transição, como o Fe^{2+} e o Cu^{+} , que atuam como catalisadores na peroxidação lipídica; interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; reparando lesões nas moléculas atacadas por radicais livres (CORREIA et al., 2004; LIMA, 2008). A eficiência dos compostos fenólicos pode-se associar com fatores, tais como o número de grupos hidroxila e o local da ligação, bem como a posição relativa dos grupos hidroxilas no anel aromático (CORREIA et al., 2004).

Os polifenóis têm sido considerados como antinutrientes na alimentação animal, devido ao efeito nocivo causado pela habilidade de alguns deles de formar ligações e precipitar macromoléculas como proteínas, carboidratos e enzimas digestivas, reduzindo desse modo a digeribilidade dos alimentos. Porém, o interesse nos compostos fenólicos tem sido voltado para sua atividade antioxidante e seus efeitos potenciais na saúde humana (BRAVO, 1998).

Embora os compostos fenólicos estejam localizados em todas as partes das plantas, estes ocorrem principalmente sob a forma conjugada, com um ou mais resíduos de açúcar ligados aos grupos hidroxila, bem como com outros compostos, tais como ácidos, amins e lipídeos. Este fato reduz sua habilidade de atuar como antioxidantes, pois a disponibilidade do grupo hidroxila no anel fenólico é um fator importante para a estabilização por ressonância dos radicais livres (VATTEM; SHETTY, 2003; CORREIA et al., 2004).

Sendo assim, se os fenóis são liberados dos glicosídeos, sua capacidade antioxidante e outras características poderiam ser melhoradas. A hidrólise enzimática destes glicosídeos fenólicos parece ser um caminho promissor para aumentar a concentração de compostos fenólicos livres. A enzima β -glicosidase catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas e é uma enzima presente em todos os organismos vivos, inclusive, tem sido demonstrada sua produção em grandes quantidades por fungos, durante a fermentação em estado sólido, a partir de resíduos lignocelulósicos (VATTEM; SHETTY, 2003; CORREIA et al., 2004).

Desta forma, a extração e/ou produção de compostos bioativos por fermentação tem se convertido em uma interessante alternativa. Neste processo os metabólitos secundários acumulam-se usualmente durante a etapa seguinte ao crescimento microbiano, chamada de “Idiofase”. Assim, os metabólitos secundários são formados no meio de fermentação depois que o crescimento microbiano é completado. Fungos filamentosos sintetizam muitos metabólitos secundários e são ricos em genes codificadores de proteínas que estão envolvidos na biossíntese desses compostos (NIGAM, 2009).

Apesar de que muitos compostos bioativos são ainda produzidos por FS, nas últimas décadas houve a tendência a incrementar a utilização da técnica de FES para a produção desses compostos, devido à FES ter se mostrado mais eficiente (NIGAM, 2009). Na Tabela 1, apresentam-se alguns exemplos de metabólitos secundários bioativos que têm apresentado maiores rendimentos quando obtidos por FES.

Os fungos filamentosos são os microrganismos mais usados para produzir compostos bioativos por FES e eles têm mostrado um grande potencial para este propósito. Correia e outros (2004) confirmaram a habilidade do fungo *Rhizopus oligosporus* de produzir, sob FES, um aumento nos níveis de compostos fenólicos livres nos resíduos de abacaxi misturados com farinha de soja como fonte de nitrogênio. O fungo *Aspergillus niger* foi utilizado no processo de FES a partir de folhas de arbusto de creosoto e cascas de romã, observando-se acumulação no final do processo dos ácidos gálico e elágico (AGUILAR et al., 2008). Por sua parte, o processo de FES estudado por Vatter e Shetty (2003), a partir de bagaço de arando vermelho

(*cranberry*), mostrou que o fungo *Lentinus edodes* produziu um aumento nos compostos fenólicos com atividade antioxidante, em especial do ácido elágico.

Tabela 1 - Exemplos de metabólitos secundários com maior rendimento em fermentação em estado sólido

Metabólito	Microrganismo
6-fenil-alfa-pirona	<i>Trichoderma harzianum</i>
Bafilomicina B1+ C1	<i>Streptomyces halstedii</i> K122
Ácido benzoico	<i>Bjerkandera adusta</i>
Álcool benzílico	<i>Bjerkandera adusta</i>
Cefamicina C	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Aroma de coco	<i>Trichoderma sp.</i>
Alcaloides do Ergot	<i>Claviceps fusiformis</i>
Ácido giberélico	<i>Giberella fujikuroi</i>
Iturina	<i>Bacillus subtilis</i>
Ocratoxina	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Oxitetraciclina	<i>Streptomyces rimossus</i>
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Rifamicina-B	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>
Tetraciclina	<i>Streptomyces viridifaciens</i>

FONTE: Martins et al. (2011)

1.1.4 Ácidos clorogênicos

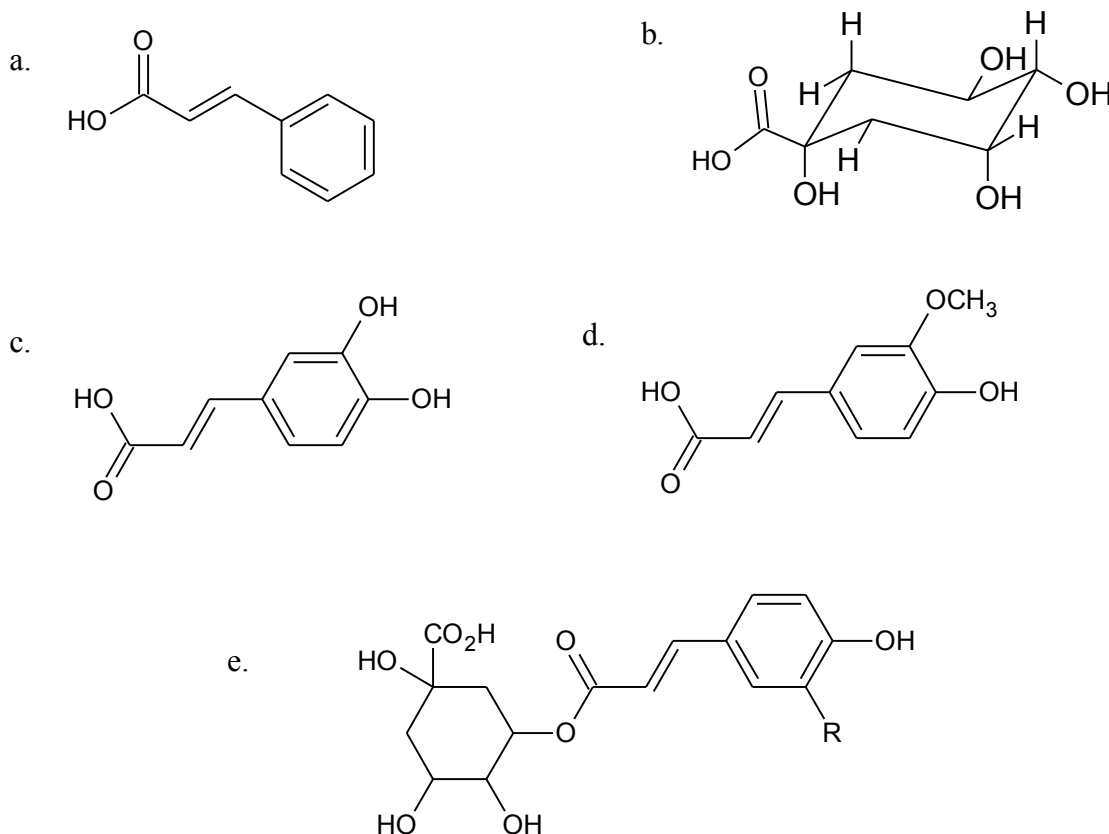
Os ácidos clorogênicos (ACG) são uma família de compostos formados pela esterificação de um ou mais derivados do ácido trans-cinâmico (Figura 2a) com o ácido quínico (ácido 1L-1(OH),3,4,5- tetra-hidroxíciclohexanóico) (Figura 2b) (DE MARIA; MOREIRA, 2004; FARAH; DONANGELO, 2006).

Segundo De Maria e Moreira (2004), estes compostos fenólicos podem ser subdivididos pela identidade do derivado do ácido cinâmico, número e posição dos resíduos acila. Os grupos majoritários (Figura 2e), encontrados na natureza, são:

- Éster do ácido cafeico (Figura 2c) com o ácido quínico (ácido cafeoilquínico - ACQ) (isômeros 3-, 4-, 5-).
- Éster de dois resíduos do ácido cafeico com um de ácido quínico (ácido dicafeoilquínico - diACQ) (isômeros 3,4-, 3,5-, 4,5-).
- Éster do ácido ferúlico (Figura 2d) com o ácido quínico (ácido feruloilquínico - AFQ) (isômeros 3-, 4-, 5-).

O grupo mais abundante na natureza é o ACQ.

Figura 2 – Estrutura dos isômeros do ACG



FONTE: De Maria e Moreira (2004)

a) ácido trans-cinâmico; b) D-(-)-ácido quínico; c) ácido cafeico; d) ácido ferúlico;
e) R=OH, ácido 5-cafeoilquínico, R=OCH₃, ácido feruloilquínico

Estes compostos apresentam propriedades benéficas à saúde, não só devido à sua potente atividade antioxidante, mas também como agentes hepatoprotetores, hipoglicemiantes e antivirais. Estudos epidemiológicos têm sugerido a associação entre o consumo de alimentos que contém ACG e a prevenção de doenças (FARAH; DONANGELO, 2006; GARAMBONE; ROSA, 2007).

Café e frutas são as maiores fontes de ácido clorogênico na alimentação. O ACG está presente em frutas cítricas, maçãs, peras, frutas silvestres, alcachofra e berinjela. Tomates são também uma boa fonte de ácidos hidroxinâmicos sendo o ácido clorogênico um dos mais abundantes. No café, os polifenóis são quase que inteiramente ácido clorogênico. Uma xícara

da bebida (200 mL) pode conter cerca de 20 a 675 mg de ácido clorogênico (DE MARIA; MOREIRA, 2004; GARAMBONE; ROSA, 2007).

O ACG encontrado em grãos de soja e farinha de soja desengordurada foi o composto fenólico com maior capacidade antioxidante, dentre todos os ácidos fenólicos encontrados. O extrato de farelo de trigo mostrou também um grande potencial antioxidante, e após sua análise por CLAE, detectaram-se quantidades apreciáveis de ácidos fenólicos, dentre eles os ácidos clorogênico e ferúlico. Estudos em extratos de seis variedades de batata mostraram que os principais responsáveis pela atividade antioxidante destes extratos foram os ácidos clorogênico, cafeico e protocatequínico (SOARES, 2002).

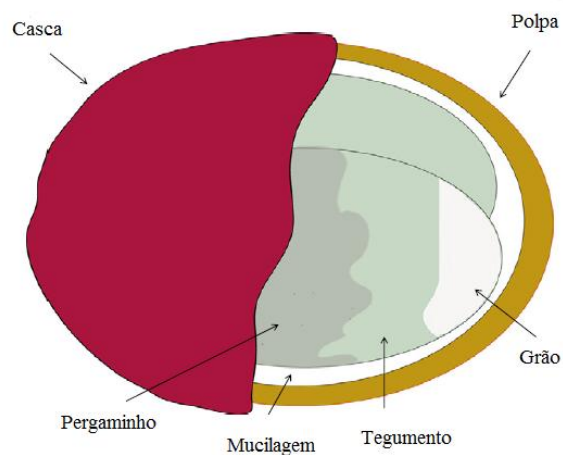
Levando em consideração as propriedades atribuídas ao ACG e o conhecimento de que este está presente nos resíduos de café, é evidente que estes resíduos possuem um grande potencial como matéria prima, da qual se pode obter o composto de interesse e, além disso, procurar uma forma mais eficiente para sua obtenção, como é a utilização de tecnologias de fermentação.

1.1.5 Composição dos resíduos de café

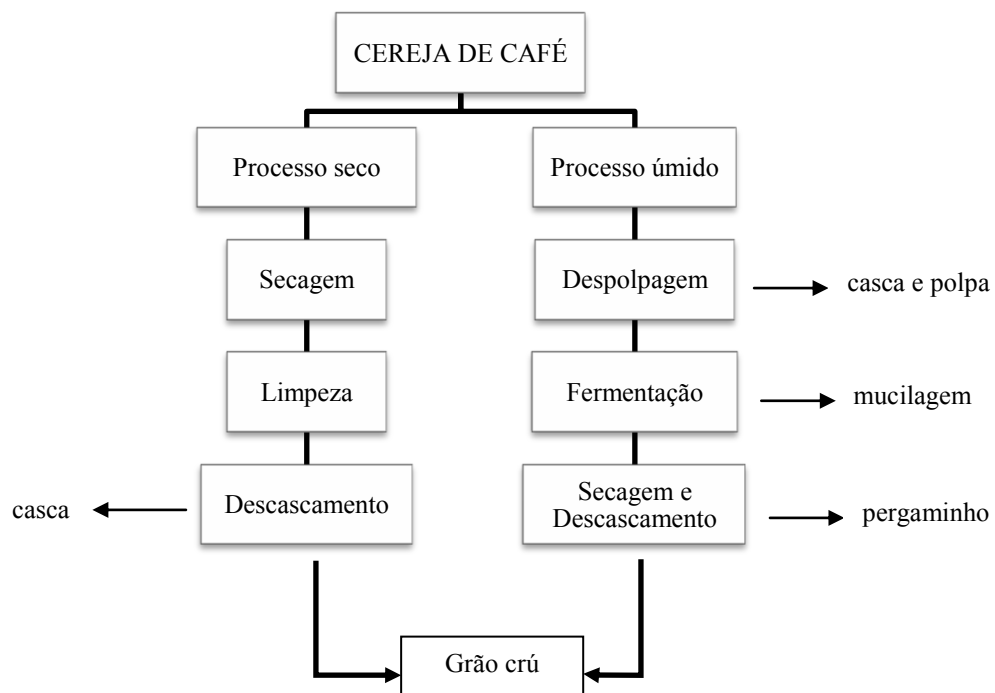
O processamento industrial da cereja de café tem como finalidade separar as sementes que constituem o produto comercializável, das partes do fruto que as envolvem (polpa, mucilagem e endocarpo ou pergaminho) e de seu próprio tegumento (película) (SILVA-CARDOSO, 1994).

As cerejas de café sofrem várias operações de pós-colheita, que abarcam o despulpamento, a fermentação, a lavagem, a secagem, e a torrefação (SOCCOL, 2002; MURTHY; NAIDU, 2012). A constituição da cereja de café apresenta-se na Figura 3.

Existem dois métodos de processamento da cereja: a via seca e a via úmida. A Figura 4 mostra as etapas envolvidas em cada processo. Dependendo do método utilizado, seco ou úmido, os resíduos recebem o nome de casca e polpa, respectivamente (FAN et al., 2000; MURTHY; NAIDU, 2012). Mas, as operações que abarcam até a produção de café solúvel envolvem vários tipos de resíduos além dos mencionados, como o pergaminho, o tegumento ou película e a borra de café.

Figura 3 - Camadas da cereja de café

FONTE: Esquivel e Jiménez (2012)

Figura 4 - Processamento da cereja de café

FONTE: Adaptado de Pandey et al. (2000); Borrelli et al. (2004)

No Brasil, as cerejas de café são geralmente processadas pela via seca. Aproximadamente 80% do café produzido é proveniente deste método. Estima-se que o país produz todos os anos aproximadamente 30 milhões de sacas de casca, uma quantidade muito similar da produção de grãos (SOCCOL, 2002). Este subproduto é rico em compostos orgânicos e nutrientes, além de biomoléculas como cafeína, taninos e polifenóis (PANDEY et al., 2000).

Alguns autores têm reportado dados da composição da polpa e da casca de café (Tabela 2), os quais permitem ver que a composição da polpa de café difere da composição da casca, embora a natureza dos compostos presentes em ambos seja bastante similar. Apresenta-se diferença na composição porcentual dos componentes, dependendo do tipo de processamento e a eficiência deste, a variedade da cultura e as condições de cultivo, tais como o tipo de solo, dentre outras (PANDEY et al., 2000).

Tabela 2 - Composição da polpa e da casca de café
(% peso em base seca)

Componente	Polpa de café	Casca de café
Carboidratos	44 - 50	57,8
Proteínas	10 -12	9,2
Fibras	18 - 21	-
Lipídeos	2,5	2
Cafeína	1,3	1,3
Taninos	1,8 - 8,56	4,5
Pectinas	-	12,4

FONTE: Adaptado de Pandey et al. (2000)

Com sua riqueza em carboidratos, proteínas, gorduras e fibras, a casca de café parece ser um suplemento alimentar útil na alimentação de gado e outros animais. No entanto, a presença de fatores antifisiológicos e antinutricionais, como a cafeína, os taninos, e os polifenóis, a torna inadequada para tais aplicações. Vários estudos têm sido realizados para avaliar a casca de café a partir de um ponto de vista da nutrição animal. Contudo, baixas ingestão, digeribilidade da proteína e retenção de nitrogênio são os principais fatores que limitam a sua utilização. Consequentemente, a maior parte da casca permanece inutilizada ou pouco usada (BRAND et al., 2000).

Com relação aos compostos fenólicos, Ramirez-Coronel e outros (2004) encontraram quatro classes principais de polifenóis na polpa de café, sendo estes, flavan 3-óis, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis e antocianidinas. O ácido clorogênico tem sido reportado como o composto mais abundante na polpa de café, e outros fenóis como epicatequina, catequina, rutina e ácido ferúlico, em menores proporções, também fazem parte dos compostos encontrados (RAMIREZ-MARTINEZ, 1988). Também, Clifford e Ramirez-Martinez (1991) reportaram a presença de ácidos clorogênicos, cafeína e ácido protocatecuico, na polpa de café.

A borra de café é um resíduo com tamanho de partícula muito fino e altas umidade, carga orgânica e acidez. É gerada durante a produção de café instantâneo, o qual é produzido após a torrefação, trituração, extração e concentração das substâncias solúveis em água. O resíduo remanescente obtido após a extração é denominado borra de café. Cerca de 50% da produção de café no mundo é usada para o preparo de café solúvel, portanto, a borra de café é gerada em grandes proporções, com uma produção anual de 6 milhões de toneladas. Um dos principais problemas encontrados pela indústria de café é a disposição desses resíduos, que até o momento inclui descarga no esgoto ou nos aterros sanitários, incineração, alimentação do gado e utilização como enchimento e adsorvente em material termofixo (RAMALAKSHMI et al., 2009; MUSSATTO et al., 2011). Este resíduo contém cafeína, taninos e polifenóis, embora em menores quantidades que a casca e a polpa (FAN et al., 2000). Atividades biológicas têm sido avaliadas nos extratos de borra de café, os quais têm mostrado expressiva atividade anti-radicalar, antioxidante e antitumoral, embora apenas uma limitada ação anti-inflamatória e antialérgica (RAMALAKSHMI et al., 2009). Suas propriedades antioxidantes poderiam ser consequência da presença de cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

Murthy e Naidu (2012) analisaram a polpa, a casca, o tegumento e a borra de duas variedades de café (Arábica e Robusta), concluindo que estes resíduos contêm quantidades apreciáveis de compostos bioativos com capacidade antioxidante, e estabelecendo, mediante análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que o principal componente é o ácido clorogênico, o qual apresenta teores na faixa de 10% - 23%.

O pergaminho é o endocarpo resistente e fibroso que cobre ambos os hemisférios da semente de café e os separa um do outro. No processamento por via seca, o pergaminho é separado dos grãos verdes de café em conjunto com a casca e a polpa, em uma única etapa. No entanto, no processamento por via úmida, o pergaminho é removido após secagem e descasque em passos separados. O último processo permite a obtenção e a utilização de pergaminho separadamente de outros subprodutos. Este resíduo está constituído por α -celulose (40-49%), hemicelulose (25-32%), lignina (33-35%) e cinzas (0,5-1%). Não é conhecido nenhum estudo sobre as características funcionais do pergaminho de café (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

1.1.6 Atividade Antioxidante

A exposição dos organismos a fatores exógenos e endógenos gera diversas espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila ($\bullet OH$) e outras espécies radicalares não livres como H_2O_2 e o oxigênio singlete (1O_2), que induzem alterações nas células, citotoxicidade e/ou indiretamente genotoxicidade, favorecendo a aceleração do envelhecimento e a aparição de câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (DASGUPTA; DE, 2007; TRIPATHI; MOHAN; KAMAT, 2007).

Um antioxidante é definido como “qualquer substância que, quando está presente em baixas concentrações comparado com o substrato oxidável, reduz ou previne significativamente a oxidação deste substrato” (BENZIE; STRAIN, 1996).

Uma molécula catalogada como bom antioxidante tem as seguintes características: presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio, para serem doados ao radical; capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; capacidade de quelar metais de transição implicados no processo oxidativo, e acesso ao local de ação (LIMA, 2008). Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou que podem ser reciclados por outro antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Um fator que proporciona um desafio diferente em cada ensaio de atividade antioxidante é que dentro de sistemas biológicos existem pelo menos quatro fontes de antioxidantes gerais: as enzimas (superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase), as macromoléculas (albumina, ceruloplasmina, ferritina e outras proteínas), as moléculas pequenas (ácido ascórbico, glutathione, ácido úrico, tocoferol, carotenoides, polifenóis), e alguns hormônios (estrogênio, angiotensina, melatonina, etc.). Além disso, existem múltiplas fontes radicalares e oxidantes, por exemplo, $O_2^{\bullet-}$, 1O_2 , $HO\bullet$, $NO\bullet$, $ONOO^-$, $HOCl$, $RO(O)\bullet$, $LO(O)\bullet$; e ambos, oxidantes e antioxidantes têm diferentes características físicas e químicas. Antioxidantes individuais podem, em alguns casos, atuar por múltiplos mecanismos em um único sistema ou por um mecanismo único e diferente dependendo do sistema de reação. Ademais, os antioxidantes podem responder de diferentes formas em presença de fontes oxidantes ou radicalares (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Os antioxidantes podem desativar radicais mediante dois mecanismos principais: por transferência de átomo de hidrogênio – HAT (*Hydrogen Atom Transfer*), e por transferência de um único elétron – SET (*Single Electron Transfer*). Estes mecanismos diferem

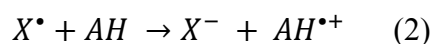
essencialmente na cinética e no potencial para as reações colaterais, mas, o resultado final é o mesmo, independentemente do mecanismo. Estes mecanismos podem ocorrer em simultâneo, sendo o dominante determinado pelas propriedades, estrutura e solubilidade do antioxidante e pela natureza do solvente do sistema de reação (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Os métodos que avaliam a capacidade antioxidante por transferência de átomo de hidrogênio baseiam-se na inibição (por ação de um antioxidante - AH) dos radicais livres ($X^\bullet$) através da doação de hidrogênio (Equação 1). Estas reações concluem-se geralmente em alguns segundos ou minutos, e são independentes do solvente e do pH (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).



Alguns exemplos de ensaios que envolvem a transferência de átomos de hidrogênio são: capacidade de absorção do radical de oxigênio - ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*); capacidade sequestradora total de radicais livres - TRAP (*total radical-trapping antioxidant parameter*), quimiluminescência e fotoquimiluminescência (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; MACDONALD; WOOD; GARG, 2006).

Os métodos fundamentados na transferência de elétron se baseiam na detecção da capacidade de um antioxidante de transferir um elétron para reduzir qualquer composto, incluindo metais, carbonilas e radicais (Equação 2). As reações por transferência de elétrons são usualmente lentas e requerem longos períodos de tempo para serem completadas. Entre os métodos utilizados para determinar a capacidade antioxidante por este mecanismo destacam-se a quantificação de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu; o método da capacidade antioxidante em equivalentes Trolox (TEAC); o poder redutor férrico - FRAP (*ferric reducing antioxidant power*); o método de capacidade de redução do Cu (II); o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) e o método DMPD (N,N-dimetil-1,4-fenilenodiamina) (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; MACDONALD; WOOD; GARG, 2006).



Na indústria alimentícia, os antioxidantes sintéticos são usados comumente para aumentar a vida de prateleira de alimentos lipídicos ou que contenham lipídeos em sua composição. Deste modo, a oxidação lipídica é inibida por sequestradores de radicais livres.

Os compostos mais utilizados com esta finalidade são o butilhidroxianisol (BHA), o butilhidroxitolueno (BHT), a *terc*-butilhidroxiquinona (TBHQ), a trihidroxibutilfenona (THBP) e o galato de propila (GP). Estudos têm demonstrado a possibilidade de estes antioxidantes apresentarem alguns efeitos tóxicos; seu consumo tem sido associado ao desenvolvimento, em ratos, de alguns tipos de câncer, como os de próstata, mama e estômago. Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles (SOUSA et al., 2007; LIMA, 2008).

Os resíduos de café, assim como o grão de café, possuem compostos fenólicos, embora em menor quantidade. Estes compostos apresentam propriedades benéficas à saúde, não somente como potentes antioxidantes, mas também como agentes hepatoprotetores, hipoglicemiantes e antivirais. Por este motivo, a extração, a quantificação e a avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos em resíduos de café, foram os objetivos desta pesquisa. Além disso, objetivou-se a adequação destes resíduos à fermentação em estado sólido, e a avaliação da influência do processo na obtenção dos compostos fenólicos.

1.2 OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar o teor de compostos fenólicos totais em resíduos de café, assim como a influência de diferentes solventes em seu processo de extração.
- Avaliar, mediante análises físico-químicas, a adequação dos resíduos de café como substratos apropriados para fermentação em estado sólido.
- Avaliar a influência da fermentação fúngica em estado sólido na obtenção de compostos fenólicos a partir de resíduos da indústria do processamento de café.
- Melhorar as condições de fermentação do fungo *Penicillium purpurogenum* em resíduos de café, visando obter um acréscimo no teor de compostos fenólicos.
- Identificar os principais compostos fenólicos presentes nos extratos antes e após a fermentação, mediante cromatografia líquida de alta eficiência.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos obtidos antes e após a fermentação.
- Cultivar o fungo *P. purpurogenum* em diferentes meios líquidos e obter os perfis químicos por cromatografia líquida de alta eficiência e ressonância magnética nuclear.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, C. N. et al. Production of antioxidant nutraceuticals by solid-state cultures of pomegranate (*Punica granatum*) peel and creosote bush (*Larrea tridentata*) leaves. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 46, n. 2, p. 218–222, 2008.
- AJILA, C. M. et al. Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* – Liberation and extraction of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, London, v. 126, n. 3, p. 1071–1080, 2011.
- 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.
- BARRIOS-GONZÁLES, J. et al. Secondary metabolites production by solid-state fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, Minden, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2005.
- BENZIE, I. 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.
- BIESALSKI, H. et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. **Nutrition Reviews**, New York, v. 25, p. 1202–1205, 2009.
- BORRELLI, R. C. et al. Characterization of a new potential functional ingredient : Coffee silverskin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 1338–1343, 2004.
- BRAND, D. et al. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 27, n. 1-2, p. 127–133, 2000.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 11, p. 317–33, 1998.
- CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. **Food Chemistry**, London, v. 40, n. 1, p. 35–42, 1991.
- CORREIA, R. T. P. et al. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 12, p. 2167–2172, 2004.
- DASGUPTA, N.; DE, B. Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 2, p. 471–474, 2007.
- DE MARIA, A. C. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 586–592, 2004.

ELLAIHAH, P.; SRINIVASULU, B.; ADINARAYANA, K. Optimisation studies on neomycin production by a mutant strain of *Streptomyces marinusensis* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 5, p. 529–534, 2004.

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. . et al. Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. **Acta Biotechnology**, Weinheim, v. 20, n. 1, p. 41–52, 2000.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 23–36, 2006.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição**, Marília, v. 18, n. 2, p. 229–235, 2007.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Production of β -fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon sources: Characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. **Process Biochemistry**, London, v. 44, n. 2, p. 237–241, 2009.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current opinion in microbiology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 301–306, 2005.

JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**, London, v. 41, n. 4, p. 759–763, 2006.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 2, p. 2328–2375, 2013.

KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 113, n. 9B, p. 71S–88S, 2002.

LIMA, A. DE. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**, 2008. 182f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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, p. 2046–2056, 2006.

MACHADO, C. M. M. et al. Gibberellic acid production by solid-state fermentation in coffee husk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 102-103, n. 1-6, p. 179–91, 2002.

MACHADO, E. M. S. et al. Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 60, p. 87–90, 2012.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology advances**, New York, v. 29, n. 3, p. 365–73, 2011.

MITCHELL, D. A. Microbial basis of processes. In: DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. (Eds.). **Solid Substrate Cultivation**. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 17–28.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 5, n. 3, p. 897–903, 2012.

MUSSATTO, S. I. et al. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 4, n. 5, p. 661–672, 2011.

NIGAM, P. S. Production of bioactive secondary metabolites. In: NIGAM, P. S.; PANDEY, A. (Eds.). **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**. First ed. Northern Ireland: Springer, 2009. p. 129–145.

PANDEY, A et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153–162, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Introduction. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. (Eds.). **Current developments in Solid-state Fermentation**. New Delhi: Springer, 2008. p. 3–12.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n. 10, p. 1153–1169, 2000.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 10, p. 4290–302, 2005.

RAMALAKSHMI, K. et al. Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. **Food Chemistry**, London, v. 115, n. 1, p. 79–85, 2009.

RAMIREZ-CORONEL, M. A. et al. Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by Thiolytic-High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 5, p. 1344–1349, 2004.

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.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 152–159, 1997.

RODRÍGUEZ-COUTO, S.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 76, n. 3, p. 291–302, 2006.

ROSSI, S. C. et al. Improving fruity aroma production by fungi in SSF using citric pulp. **Food Research International**, Barking, v. 42, n. 4, p. 484–486, 2009.

SHANKARANAND, V. S.; LONSANE, B. K. Coffee husk: an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger* in a solid-state fermentation system. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 165–168, 1994.

SILVA-CARDOSO, A. P. Tecnologia Primária do Café. In: _____. **Café - Cultura e Tecnologia Primária**. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical, 1994. p. 135–150.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

SOARES, M. et al. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n. 8, p. 857–861, 2000.

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

SOCOL, C. R. Resíduo de café um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. In: Embrapa (Ed.); I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. **Anais...** p.83–98, 2002. Poços de Caldas, MG. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/19>>. Acesso em: 11 set. 2013.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. . Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2-3, p. 205–218, 2003.

SOUSA, B. A.; CORREIA, R. T. P. Phenolic content, antioxidant activity and antiamylolytic activity of extracts obtained from bioprocessed pineapple and guava wastes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 25–30, 2012.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

TRIPATHI, R.; MOHAN, H.; KAMAT, J. P. Modulation of oxidative damage by natural products. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 81–90, 2007.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 3, p. 367–379, 2003.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitation and monitoring. In: ROUSSOS, S. et al. (Eds.). **Advances in Solid State Fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1997. p. 5–22.

CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS

2.1 INTRODUÇÃO

Mais de 50% do fruto do café não é usado para a produção do grão comercializável, sendo descartado durante o processamento. Até agora, os maiores avanços no aproveitamento dos subprodutos têm sido para outros propósitos industriais distintos aos da indústria de alimentos, como a produção de energia, a adsorção de compostos, e a manufatura de produtos industriais, como etanol, ácido giberélico e α -amilase (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

A presença simultânea de polissacarídeos, proteínas e minerais faz dos resíduos de café substratos com alto valor biotecnológico, que podem ser usados, por exemplo, como substratos ou suportes sólidos em processos de fermentação, para cultivo de microrganismos, e extração ou produção de compostos com aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Selecionar as linhagens de microrganismos com maior potencial e estabelecer as melhores condições do processo são os principais desafios para converter esses compostos em produtos de valor agregado (MUSSATTO et al., 2011).

Assim, a determinação do conteúdo de proteínas, lipídeos e açúcares redutores e totais nos subprodutos de café a serem utilizados em processos de fermentação é necessária, para avaliar a possibilidade de seu uso com ou sem a necessidade da adição de nutrientes para a multiplicação do microrganismo responsável pela fermentação.

Outra característica importante dos resíduos de café é a presença de compostos fenólicos. Em polpa fresca de café foi reportado ácido clorogênico (42% do total dos compostos fenólicos identificados), epicatequina, catequina, rutina, ácido protocatecuico e ácido ferúlico (RAMIREZ-MARTINEZ, 1988). Mais recentemente, foram encontrados em polpa de café Arábica, flavan 3-óis, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis e antocianidinas (RAMIREZ-CORONEL et al., 2004). A casca de café foi estudada como fonte de antocianinas (PRATA; OLIVEIRA, 2007). Reportou-se também presença de cafeína, taninos e polifenóis na borra de café (FAN et al., 2000), sendo que o principal composto fenólico presente foi o ácido clorogênico (MURTHY; NAIDU, 2012).

Os compostos fenólicos presentes nos extratos estão frequentemente associados com outras biomoléculas como proteínas, carboidratos, lipídeos, terpenos, clorofila e outros compostos orgânicos (AJILA et al., 2011). Por isso deve se encontrar o melhor solvente para extraí-los. Tem sido reportado que misturas de etanol/água ou acetona/água funcionam

melhor na extração de compostos fenólicos do que cada solvente sozinho (YILMAZ; TOLEDO, 2006). A solubilidade dos compostos fenólicos depende principalmente dos grupos hidroxila e do comprimento da cadeia carbônica (AJILA et al., 2011). A escolha do melhor solvente para extração de compostos fenólicos foi objeto de nossos estudos, além da comparação entre um método tradicional de extração onde foi utilizada agitação e um método utilizando energia ultrassônica.

2.2 OBJETIVOS

O objetivo desta parte do trabalho foi caracterizar os resíduos da indústria do café, visando sua posterior utilização em um processo de fermentação em estado sólido, e corroborar a presença de compostos fenólicos. Para isso, foram realizadas as seguintes etapas:

- Determinação do teor de proteínas, lipídeos totais, e açúcares redutores e totais, nos resíduos de café.
- Avaliação da influência de diferentes solventes e de dois tipos de extração na determinação de compostos fenólicos totais.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 Amostras

As cascas de café das variedades Arábica e Robusta, a borra e a torta de café (Figura 5) foram gentilmente cedidas pela indústria Cocam, Companhia de Café Solúvel e Derivados, localizada em Catanduva, (latitude 21°8' S, longitude 48°58' O; 503 m de altitude), São Paulo, Brasil. As cascas são resíduos do processamento da cereja de café pela via seca, a borra é oriunda do processo de obtenção do café solúvel, e a torta é um resíduo da prensagem do café torrado para a obtenção de óleo de café que é posteriormente usado no café liofilizado para melhora de suas características.

Figura 5 – Resíduos de café de origem brasileiro



Casca de café Arábica



Casca de café Robusta



Borra de café



Torta de café

A polpa e o pergaminho do café Robusta (Figura 6) provenientes da Colômbia foram obtidos em uma fazenda localizada no município de Timbío (latitude 29°20' N, longitude 29°35' O; 1000-2000 m de altitude) no Departamento de Cauca, Colômbia. Estes resíduos provêm do processamento da cereja de café pela via úmida; a polpa é gerada durante o despulpamento, enquanto o pergaminho é obtido após a secagem e o descascamento da cereja.

Antes de serem utilizados, os resíduos foram secos a 60 °C até ser obtido peso constante, sendo posteriormente triturados.

Figura 6 – Resíduos de café de origem colombiano



Polpa de café

Pergaminho

2.3.2 Análises Físico-Químicas

Análises físico-químicas foram feitas nos resíduos sem fermentar. A determinação de proteínas foi feita pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1997; método 991.20), utilizando o fator de conversão de 5,75 (BRASIL, 2003). Os lipídeos totais foram obtidos com extração da fração etérea por fluxo intermitente, utilizando éter de petróleo como solvente sob refluxo, em aparelho de Soxhlet (AOAC, 1997; método 963.15). As determinações de açúcares redutores e açúcares totais foram realizadas pelo método quantitativo de Lane-Eynon (AOAC, 1997; método 923.09), baseado na redução de cobre pelos grupos redutores dos açúcares.

2.3.3 Extração de compostos fenólicos

A metodologia de extração dos compostos fenólicos foi realizada segundo as condições otimizadas por Ajila e outros (2011) com algumas modificações. Pesou-se 1,0 g de cada resíduo antes e após a fermentação, adicionando-se 20 mL de solvente. As amostras foram colocadas em frascos de Erlenmeyer em uma incubadora Shaker (Lucadema, modelo LUCA-222) a 40 °C e 120 rpm por 30 min, posteriormente centrifugadas por 20 min, e finalmente filtradas.

A extração foi realizada testando vários solventes: água, etanol-água (80:20 v/v), metanol-água (80:20 v/v) e acetona-água (80:20 v/v). As misturas dos solventes foram avaliadas levando em consideração as que proporcionaram os melhores resultados na extração de compostos fenólicos, no trabalho de Ajila e outros (2011). Todos os solventes utilizados foram grau analítico marca Synth. Utilizou-se o sobrenadante na determinação dos compostos fenólicos.

O mesmo procedimento foi utilizado para a extração efetuada com ultrassom. Neste caso, os frascos de Erlenmeyer contendo as amostras foram colocados em um banho de ultrassom (Unique, Modelo MaxiClean 750), por 30 min, e a temperatura foi controlada para permanecer em 40 °C. Cada extração foi realizada em duplicata.

2.3.4 Determinação de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado nos extratos fenólicos obtidos a partir dos resíduos sem fermentar e também após fermentação. Empregou-se a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965) com as modificações de Palomino e outros (2009). Ao tubo de reação foram adicionadas alíquotas de 100 µL de cada extrato, 1600 µL de água destilada e 200 µL do reagente Folin-Ciocalteu (grau analítico, Dinâmica). Agitou-se o tubo e deixou-se em repouso por 8 minutos. Depois, foram adicionados 100 µL de Na₂CO₃ 10%. A mistura de reação foi estocada por 1 h em ausência de luz e a absorbância determinada em um espectrofotômetro (Biospectro, SP-22) a 760 nm. Para cada extrato fenólico, a análise foi feita em triplicata.

Com o objetivo de expressar os resultados como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de substrato), realizou-se uma curva de calibração com este padrão (grau

analítico, Vetec) nas concentrações de 50 a 500 $\mu\text{g/mL}$. Para cada concentração, as análises foram realizadas em triplicata. A curva de calibração se apresenta no Apêndice.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Análises Físico-químicas

A utilização dos resíduos de café em processos de fermentação faz necessária a determinação das características físico-químicas, visando avaliar a possibilidade de eles exercerem simultaneamente o papel de suporte e fonte de nutrientes ou estabelecer se constituem um material inerte que deverá ser impregnado de um meio líquido com nutrientes selecionados que permitam o desenvolvimento do microrganismo. Desta forma, foi determinado o conteúdo de proteínas, lipídeos e açúcares redutores e totais nos resíduos que são objeto de estudo.

Tabela 3 - Análises físico-químicas dos resíduos de café

Resíduo	% Proteína	% Lipídeos	% Açúcares redutores	% Açúcares totais
Casca Robusta	13,62 ± 0,34 ^B	2,21 ± 0,49 ^C	2,57 ± 0,28 ^C	3,01 ± 0,28 ^C
Casca Arábica	6,59 ± 0,28 ^D	0,64 ± 0,08 ^{DE}	9,79 ± 0,11 ^A	11,83 ± 0,12 ^A
Borra	10,29 ± 0,28 ^C	16,65 ± 0,07 ^A	nd	Nd
Torta	15,97 ± 0,22 ^A	7,90 ± 0,04 ^B	5,69 ± 0,55 ^B	7,22 ± 0,92 ^B
Polpa	9,68 ± 0,04 ^C	1,46 ± 0,66 ^{CD}	5,63 ± 0,23 ^B	5,92 ± 0,23 ^B
Pergaminho	2,27 ± 0,16 ^E	0,41 ± 0,2 ^E	nd	Nd

% em peso seco

nd = não detectado

Valores expressos em média ± desvio padrão, n = 3

Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si.

Observam-se na Tabela 3 diferenças significativas no teor de proteína, lipídeos e açúcares entre os diferentes resíduos. O resíduo com maior teor de proteína foi a torta, seguido pela casca Robusta, enquanto que o maior conteúdo de lipídeos foi apresentado pela borra. Em relação aos açúcares, a casca Arábica foi o resíduo com maior teor de açúcares redutores e totais. O pergaminho de café apresentou o menor teor de proteína e lipídeos, e ausência de açúcares pela metodologia utilizada.

Ao classificar os resíduos segundo o tipo de processo que os gera, seco, úmido, ou resíduos do café solúvel; se faz possível evidenciar maiores diferenças. Observou-se que entre a casca Robusta e a casca Arábica, a primeira apresentou maior teor de proteínas e lipídeos, enquanto que a casca Arábica conteve maior quantidade de açúcares (Tabela 3).

Entretanto os resíduos gerados na obtenção de café solúvel apresentaram grandes diferenças no teor de proteínas e lipídeos, sendo a torta a fração que teve a maior porcentagem de proteína, e a borra o maior conteúdo de lipídeos. Na borra de café não foram detectados açúcares redutores (Tabela 3).

Em relação aos resíduos gerados a partir do processo úmido da cereja de café, pode-se observar que a polpa apresentou teor de proteínas, lipídeos e açúcares maior que os mostrados pelo pergaminho (Tabela 3).

Os resultados anteriores concordam com alguns dados reportados na bibliografia, porém, existe uma ampla diferença entre vários autores (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição da polpa, da casca e da borra de café
(% de peso em base seca)

Componente	1^{a,d}	2^{a,e}	3^{b,d}	4^{b,e}	5^{c,f}
Proteínas	10-12	7,5-15	9,2	5,2	13,6
Lipídeos	2,5	2,0-7,0	2	nd	Nd
Carboidratos	44-50	21-32	57,8	35	45,3

FONTE: Adaptado de Pandey et al. (2000); Mussatto et al. (2011); Esquivel e Jiménez (2012)

^aPolpa de café, ^bCasca de café, ^cBorra de café

^d(Pandey et al., 2000), ^e(Esquivel e Jiménez, 2012), ^f(Mussatto et al., 2011)

nd: não determinado

Pandey e outros (2000) afirmaram que a composição da polpa de café difere da composição da casca, embora a natureza dos compostos presentes em ambos seja bastante similar. A diferença na composição porcentual dos componentes depende do tipo de processamento e da eficiência deste, da variedade da cultura, e das condições de cultivo, como do tipo de solo. Mussatto e outros (2011) encontraram que a proteína e os carboidratos constituem uma fração significativa da borra de café, mas não reportaram teores de lipídeos, os quais são expressivos nesta pesquisa.

Visando utilizar estes resíduos em processos de fermentação, a presença de proteínas, lipídeos e açúcares redutores faz dos resíduos de café um substrato adequado para o crescimento de microrganismos. Estes resíduos agroindustriais podem se converter em uma fonte de nutrientes de processos de fermentação em estado sólido e desta forma reduzir os custos do processo e ao mesmo tempo evitar problemas ambientais causados por sua disposição final.

Por outra parte, levando em consideração a disponibilidade anual dos resíduos, é interessante obter os dados das quantidades disponíveis de proteínas, açúcares e lipídeos que estão sendo inutilizados (Tabela 5). No Brasil, as cerejas de café são geralmente processadas pela via seca; aproximadamente 80% do café produzido é proveniente deste método. Estima-se que o país produza todos os anos aproximadamente 30 milhões de sacas de casca, uma quantidade muito similar à produção de grãos (SOCCOL, 2002). De acordo com Vegro e Carvalho (1997) durante a produção de café solúvel, em média, para cada kg de café obtém-se 1,5 kg de resíduo. Os dados relativos ao consumo interno brasileiro, divulgados pela Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC), no período compreendido entre maio/2011 e abril/2012, registraram o consumo de café solúvel em 1,1 milhão de sacas. Sendo assim, seriam produzidos 1,65 milhão de sacas de borra de café anualmente.

Tabela 5 - Disponibilidade anual de nutrientes

Resíduo	Disponibilidade anual em milhões de kg		
	Proteínas	Lipídeos	Açúcares totais
Casca	266,5	39,7	54,2
Borra	11,1	16,5	-

2.4.2 Avaliação do teor de compostos fenólicos totais

Nesta pesquisa, a recuperação dos compostos fenólicos foi realizada testando a influência de quatro tipos de solventes orgânicos, e a influência da extração tanto efetuada em ultrassom como por agitação.

2.4.2.1 Fenóis Totais nos extratos obtidos mediante extração com agitação

Na Tabela 6 observa-se que o extrato acetônico da casca Robusta apresentou o maior teor de compostos fenólicos quando comparado com os extratos obtidos com outros solventes, e também quando comparado com todos os extratos da casca Arábica. Neste processo de extração, os mais altos teores de fenóis foram obtidos para os dois tipos de cascas nos extratos acetônicos, embora no caso da casca Arábica a diferença com o extrato metanólico não foi significativo.

Tabela 6 - Teor de fenóis totais nos extratos das cascas de café obtidos por agitação

Tipo de Casca	Teor de fenóis totais (mg AG/g substrato)			
	Extrato aquoso	Extrato etanólico	Extrato metanólico	Extrato acetônico
Robusta	96,92 ± 4,95 ^{C,a}	100,00 ± 2,94 ^{C,a}	125,00 ± 0,35 ^{B,a}	159,50 ± 1,06 ^{A,a}
Arábica	73,50 ± 2,01 ^{C,b}	75,58 ± 0,71 ^{BC,b}	78,50 ± 0,11 ^{AB,b}	80,91 ± 0,23 ^{A,b}

Letras maiúsculas (mesma linha) e letras minúsculas (mesma coluna) diferentes indicam que os resultados diferem significativamente entre si ($P \leq 0.05$)

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram que o maior valor de fenóis totais foi encontrado no extrato acetônico da torta de café. Todos os extratos obtidos com este resíduo exibiram maiores teores quando comparados com os mesmos extratos obtidos a partir da borra de café. Por sua vez, o extrato acetônico da borra também foi o que apresentou maior conteúdo de fenóis, porém esse resultado não diferiu significativamente do apresentado pelo extrato etanólico.

Tabela 7 - Teor de fenóis totais nos extratos dos resíduos de café solúvel obtidos por agitação

Resíduo	Teor de fenóis totais (mg AG/g substrato)			
	Extrato aquoso	Extrato etanólico	Extrato metanólico	Extrato acetônico
Borra	54,75 ± 0,24 ^{C,b}	68,91 ± 1,18 ^{AB,b}	63,75 ± 4,95 ^{BC,b}	77,25 ± 0,24 ^{A,b}
Torta	155,00 ± 0,35 ^{C,a}	176,00 ± 0,35 ^{B,a}	172,75 ± 2,12 ^{B,a}	190,83 ± 0,83 ^{A,a}

Letras maiúsculas (mesma linha) e letras minúsculas (mesma coluna) diferentes indicam que os resultados diferem significativamente entre si ($P \leq 0.05$)

Os resultados obtidos para os resíduos de café provenientes da Colômbia mostraram grandes diferenças entre eles. Observa-se na Tabela 8 que o extrato aquoso da polpa de café exibiu o maior teor de fenóis e, além disso, os valores de fenóis em todos os extratos deste resíduo diferiram significativamente entre eles. O conteúdo de fenóis nos extratos obtidos a partir do pergaminho é bastante baixo quando comparado com a polpa, e não houve diferenças significativas entre os diferentes tipos de extratos.

Tabela 8 - Teor de fenóis totais nos extratos dos resíduos de café da Colômbia obtidos por agitação

Resíduo	Teor de fenóis totais (mg AG/g substrato)			
	Extrato aquoso	Extrato etanólico	Extrato metanólico	Extrato acetônico
Polpa	77,83 ± 0,06 ^{A,a}	60,04 ± 0,71 ^{C,a}	55,83 ± 1,35 ^{D,a}	72,88 ± 0,71 ^{B,a}
Pergaminho	6,92 ± 0,33 ^{A,b}	7,73 ± 0,35 ^{A,b}	7,56 ± 0,11 ^{A,b}	6,91 ± 0,67 ^{A,b}

Letras maiúsculas (mesma linha) e letras minúsculas (mesma coluna) diferentes indicam que os resultados diferem significativamente entre si ($P \leq 0.05$)

Ao comparar o teor de compostos fenólicos presente nos principais resíduos gerados na obtenção do grão de café Robusta por duas vias diferentes, encontrou-se maior teor destes compostos na casca e principalmente no extrato acetônico (Tabela 9). Este resultado é esperado se levar-se em consideração que, no processamento por via seca, retira-se em conjunto, mediante o descasque, a casca, a polpa e o pergaminho, tudo em uma única etapa, e se dá o nome de casca ao resíduo gerado. No entanto, no processamento por via úmida, cada camada do grão verde de café é removida em passos separados. Sendo assim, espera-se que o resíduo gerado no processamento seco seja mais rico em compostos fenólicos, pois contém todas as partes do fruto que envolvem a semente de café.

Tabela 9 - Comparação do teor de fenóis totais nos extratos obtidos por agitação dos principais resíduos de café Robusta

Obtenção do grão	Resíduo	Teor de fenóis totais (mg AG/g substrato)			
		Extrato aquoso	Extrato etanólico	Extrato metanólico	Extrato acetônico
Via seca	Casca	96,92 ± 4,95 ^{C,a}	100,00 ± 2,94 ^{C,a}	125,00 ± 0,35 ^{B,a}	159,50 ± 1,06 ^{A,a}
Via úmida	Polpa	77,83 ± 0,06 ^{A,b}	60,04 ± 0,71 ^{C,b}	55,83 ± 1,35 ^{D,b}	72,88 ± 0,71 ^{B,b}

Letras maiúsculas (mesma linha) e letras minúsculas (mesma coluna) diferentes indicam que os resultados diferem significativamente entre si ($P \leq 0.05$)

2.4.2.2 Fenóis Totais nos extratos obtidos mediante extração com ultrassom

Quando a extração dos compostos fenólicos foi realizada utilizando ultrassom, observaram-se diferenças significativas entre as cascas, apresentando-se sempre o maior teor nos extratos da casca Robusta. A acetona continuou sendo o melhor solvente para extrair os compostos fenólicos nas cascas testadas, embora as diferenças com os extratos metanólicos não sejam significativas (Tabela 10). Observa-se maior eficiência na extração com ultrassom quando comparada com a extração com agitação, principalmente nos extratos acetônicos, com um aumento de até 35% dos compostos fenólicos extraídos na casca Arábica.

Tabela 10 - Teor de fenóis totais nos extratos das cascas de café obtidos por ultrassom

Casca	Teor de fenóis totais (mg AG/g substrato)			
	Extrato aquoso	Extrato etanólico	Extrato metanólico	Extrato acetônico
Robusta	98,62 ± 0,47 ^{C,a}	156,45 ± 0,08 ^{B,a}	175,70 ± 0,41 ^{A,a}	175,93 ± 0,08 ^{A,a}
Arábica	84,50 ± 3,65 ^{B,b}	88,25 ± 2,59 ^{B,b}	101,58 ± 1,41 ^{A,b}	109,70 ± 0,57 ^{A,b}

Letras maiúsculas (mesma linha) e letras minúsculas (mesma coluna) diferentes indicam que os resultados diferem significativamente entre si ($P \leq 0.05$)

Os resultados dispostos na Tabela 11 mostram grandes diferenças entre os extratos ao usar este tipo de extração. Os extratos da torta de café apresentaram maiores teores de compostos fenólicos quando comparados com os extratos obtidos a partir da borra. Para os dois resíduos, o extrato acetônico apresenta os melhores resultados, e a eficiência na extração melhora quando comparada com a extração realizada com agitação, observando-se um incremento de 31% no teor de compostos fenólicos no extrato acetônico da borra.

Tabela 11 - Teor de fenóis totais nos extratos dos resíduos de café solúvel obtidos por ultrassom

Resíduo	Teor de fenóis totais (mg AG/g substrato)			
	Extrato aquoso	Extrato etanólico	Extrato metanólico	Extrato acetônico
Borra	54,16 ± 0,83 ^{C,b}	70,25 ± 2,12 ^{B,b}	70,50 ± 0,35 ^{B,b}	101,84 ± 2,95 ^{A,b}
Torta	148,21 ± 2,47 ^{D,a}	170,58 ± 1,41 ^{C,a}	182,25 ± 0,47 ^{B,a}	214,50 ± 0,83 ^{A,a}

Letras maiúsculas (mesma linha) e letras minúsculas (mesma coluna) diferentes indicam que os resultados diferem significativamente entre si ($P \leq 0.05$)

A polpa foi o único resíduo que apresentou melhores resultados com extração aquosa, tanto por agitação como por extração efetuada por ultrassom, porém não houve diferenças significativas entre os dois tipos de extração. Na extração por ultrassom, todos os extratos da polpa contiveram maior teor de fenóis quando comparados com os extratos do pergaminho (Tabela 12). A extração dos compostos fenólicos presentes no pergaminho melhorou significativamente com o ultrassom, apresentando um aumento de mais de 200% quando comparado à extração por agitação.

Tabela 12 - Teor de fenóis totais nos extratos dos resíduos de café da Colômbia obtidos por ultrassom

Resíduo	Teor de fenóis totais (mg AG/g substrato)			
	Extrato aquoso	Extrato etanólico	Extrato metanólico	Extrato acetônico
Polpa	77,37 ± 0,47 ^{A,a}	55,96 ± 0,71 ^{C,a}	52,63 ± 0,35 ^{D,a}	67,50 ± 0,30 ^{B,a}
Pergaminho	26,54 ± 0,12 ^{C,b}	27,58 ± 0,06 ^{B,b}	27,96 ± 0,00 ^{B,b}	29,08 ± 0,42 ^{A,b}

Letras maiúsculas (mesma linha) e letras minúsculas (mesma coluna) diferentes indicam que os resultados diferem significativamente entre si ($P \leq 0.05$)

Da mesma forma que com a extração com agitação, a extração com ultrassom evidencia grandes diferenças no conteúdo de compostos fenólicos entre os resíduos apresentados na Tabela 13. Todos os extratos da casca Robusta superaram os teores de fenóis da polpa.

Tabela 13 - Comparação do teor de fenóis totais nos extratos obtidos por ultrassom dos principais resíduos de café Robusta

Obtenção do grão	Resíduo	Teor de fenóis totais (mg AG/g substrato)			
		Extrato aquoso	Extrato etanólico	Extrato metanólico	Extrato acetônico
Via seca	Casca	98,62 ± 0,47 ^{C,a}	156,45 ± 0,08 ^{B,a}	175,70 ± 0,41 ^{A,a}	175,93 ± 0,08 ^{A,a}
Via úmida	Polpa	77,37 ± 0,47 ^{A,b}	55,96 ± 0,71 ^{C,b}	52,63 ± 0,35 ^{D,b}	67,50 ± 0,30 ^{B,b}

Letras maiúsculas (mesma linha) e letras minúsculas (mesma coluna) diferentes indicam que os resultados diferem significativamente entre si (P≤0.05)

Dos resultados anteriores, observou-se que, com exceção da Polpa, todos os extratos apresentaram melhores resultados quando foram realizadas as extrações com acetona. Observa-se que o melhor solvente para a extração de compostos fenólicos neste tipo de resíduos é um solvente aprótico, ou seja, que carece de hidrogênio ácido. Com o objetivo de visualizar as diferenças entre os dois tipos de extração para este solvente, apresenta-se a Tabela 14.

Tabela 14 - Comparação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos acetônicos obtidos com dois tipos de extração

Resíduo	Teor de fenóis totais (mg AG/g substrato)	
	Extração com ultrassom	Extração com agitação
Casca Robusta	175,93 ± 0,08 ^A	159,50 ± 1,06 ^B
Casca Arábica	109,70 ± 0,57 ^A	80,91 ± 0,23 ^B
Borra	101,84 ± 2,95 ^A	77,25 ± 0,24 ^B
Torta	214,50 ± 0,83 ^A	190,83 ± 0,83 ^B
Pergaminho	29,08 ± 0,42 ^A	6,91 ± 0,67 ^B

As médias que não compartilham uma letra na mesma linha são significativamente diferentes (P≤0.05)

Os resultados anteriores confirmaram que o melhor tipo de extração, quando foi utilizada a mistura acetona-água (80:20 v/v) como solvente, foi a extração efetuada por ultrassom, pois desta forma apresentou-se um incremento significativo no teor de fenóis recuperados, quando comparado com as extrações com agitação. Este fato explica-se devido a que a extração ultrassônica quebra as células vegetais e facilita a liberação do conteúdo delas dentro do meio de extração. Em geral, há um aumento na transferência de massa e melhor acesso do solvente às células vegetais. Tratando-se de material vegetal previamente seco, existe uma melhora no processo de hidratação que toma lugar simultaneamente com a fragmentação do material vegetal (TOMA et al., 2001).

No caso da polpa, a qual apresentou melhores resultados na extração com água, não foram observadas diferenças significativas entre os dois tipos de extração (Tabela 15).

Tabela 15 - Comparação entre os extratos aquosos da polpa

Resíduo	Teor de fenóis totais (mg AG/g substrato)	
	Extração com ultrassom	Extração com agitação
Polpa	77,37 ± 0,47 ^A	77,83 ± 0,06 ^A

Letras maiúsculas iguais indicam que os resultados não diferem significativamente entre si ($P \leq 0.05$)

Com relação a estudos prévios realizados em resíduos de café (MURTHY e NAIDU, 2012; RAMALAKSHMI et al., 2009), é evidente que são utilizadas diferentes metodologias de extração e quantificação de compostos fenólicos. Por exemplo, Murthy e Naidu (2012) extraíram compostos fenólicos de subprodutos de café (polpa, casca, tegumento e borra) a partir de uma extração por Soxhlet utilizando uma mistura de isopropanol-água (60:40 v/v) como solvente. A avaliação de polifenóis totais nestes extratos mostrou um teor de 1% - 1,5% (p/p de AG), concentrações bastante menores quando comparadas com os resultados obtidos nesta pesquisa, os quais levados à mesma unidade de medida, vão desde 0,7% até 19% (p/p de AG) na extração por agitação, e desde 2,7% até 21% (p/p de AG) na extração por ultrassom.

Por sua parte, Ramalakshmi e outros (2009) obtiveram extratos metanólicos a partir de borra de café desengordurada com hexano. As borras provenientes do café Robusta e Arábica mostraram um teor de compostos fenólicos de 4,8 % e 6,3% (equivalentes de AG) respectivamente. Já nesta pesquisa, os valores de compostos fenólicos na borra analisada variam de 5,4%, no extrato aquoso, até 7,7%, no extrato acetônico, ambos obtidos por agitação, e desde 5,4% até 10% nos extratos aquoso e acetônico, respectivamente, obtidos por ultrassom. Assim, pode-se concluir que as extrações realizadas neste trabalho são bastante eficientes na recuperação dos compostos fenólicos.

2.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

A caracterização dos resíduos de café mostrou que estes são ricos em proteína, lipídeos e açúcares redutores, fato que os faz substratos apropriados para processos de fermentação, além de serem uma fonte disponível dessas macromoléculas, dado que atualmente não são amplamente usados.

Os resíduos de café apresentaram presença de compostos fenólicos quando avaliados pelo método de Folin Ciocalteu.

Observou-se que, dentre os solventes testados, o mais adequado para a extração de compostos fenólicos neste tipo de resíduos é uma mistura de acetona-água (80:20 v/v). Além disso, observaram-se diferenças entre as extrações realizadas por agitação e por ultrassom, evidenciando-se que o ultrassom permite uma maior recuperação dos compostos de interesse.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJILA, C. M. et al. Solid-state fermentation of apple pomace using *Phanerocheate chrysosporium* – Liberation and extraction of phenolic antioxidants. **Food Chemistry**, London, v. 126, n. 3, p. 1071–1080, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC). Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 15 ago. 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST - AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 1997. 16th Edition. v. II.V.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 26 dez. 2003. Disponível em: <http://www.crn3.org.br/legislacao/doc/RDC_N_360_DE_23_DE_DEZEMBRO_DE_2003.pdf>. Acesso em: 6 mar. 2014.

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. . et al. Use of various coffee industry residues for the cultivation of *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. **Acta Biotechnology**, Weinheim, v. 20, n. 1, p. 41–52, 2000.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 5, n. 3, p. 897–903, 2012.

MUSSATTO, S. I. et al. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 4, n. 5, p. 661–672, 2011.

PALOMINO, L. R. et al. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). **VITAE**, Medellín, v. 16, n. 3, p. 388–395, 2009.

PANDEY, A et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153–162, 2000.

PRATA, E. R. B. A.; OLIVEIRA, L. S. Fresh coffee husks as potential sources of anthocyanins. **LWT - Food Science and Technology**, Waltham, v. 40, n. 9, p. 1555–1560, 2007.

RAMALAKSHMI, K. et al. Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. **Food Chemistry**, London, v. 115, n. 1, p. 79–85, 2009.

RAMIREZ-CORONEL, M. A. et al. Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by Thiolysis-High-Performance Liquid

Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 5, p. 1344–1349, 2004.

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.

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.

SOCOL, C. R. Resíduo de café um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. In: Embrapa (Ed.); I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. **Anais...** p.83–98, 2002. Poços de Caldas, MG. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/19>>. Acesso em: 11 set. 2013.

TOMA, M. et al. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, v. 8, p. 137–142, 2001.

VEGRO, C. L. R.; CARVALHO, F. C. Disponibilidade e utilização de resíduos gerados no processamento agroindustrial do café. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 9–16, 1994.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 1, p. 41–48, 2006.

CAPÍTULO 3 - PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Fermentação em estado sólido com resíduos de café

O uso de resíduos de café em processos de FES tem sido estudado. Vários trabalhos da literatura têm confirmado o crescimento de diferentes cepas de fungos em resíduos de café, tais como *Rhizopus*, *Phanerochaete*, *Aspergillus*, *Gibberella fujikuroi*, *Mucor*, *Penicillium* e *Neurospora* (BRAND et al., 2000; PANDEY et al., 2000; MACHADO et al., 2002; MACHADO et al., 2012). O fato tem sido explicado pela presença de grande quantidade de açúcares fermentescíveis nesses resíduos, que constituem substrato apropriado para o cultivo de fungos e leveduras (PANDEY et al., 2000).

O uso de uma cepa de *Gibberella fujikuroi* e da casca de café deu, como resultado final, produção de ácido giberélico (MACHADO et al., 2002). Aromas de frutas foram produzidos com *Ceratocystis fimbriata* a partir de casca de café suplementada com glicose (SOARES et al., 2000). Murthy e Naidu (2012) testaram a polpa, a casca, o tegumento e a borra de café, na produção da enzima xilanase pelo fungo *Penicillium* sp., e os resultados mostraram maior atividade enzimática quando foi usada a casca de café. Também foi reportada a produção de ácido cítrico pelo fungo *Aspergillus niger* usando como suporte casca de café umedecida com uma solução de NaOH, sendo que a produção se incrementou em presença de minerais (SHANKARANAND; LONSANE, 1994).

Apesar de ser conhecido que a FES é uma boa alternativa para a produção de compostos fenólicos e para o aumento do seu conteúdo (MARTINS et al., 2011), este fato não tem sido muito estudado a partir de resíduos de café. Porém, Machado e outros (2012) avaliaram a capacidade de sete estirpes de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* e *Neurospora*, de crescer e liberar compostos fenólicos a partir do tegumento e da borra de café sob condições de cultivo em estado sólido. Os resultados da pesquisa mostraram que todas as cepas cresceram nos resíduos, porém *Penicillium purpurogenum*, *Neurospora crassa* e *Mucor* liberaram maior quantidade de compostos fenólicos.

3.1.2 Metodologia de Superfície de Resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) tem sido bastante utilizada para modelar pesquisas sobre otimização de processos em nível experimental (MYERS; MONTGOMERY, 1995). É uma técnica baseada em planejamentos fatoriais que foi introduzida na década de 1950, e que desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (BARROS-NETO; SPACINO-SCARMINIO; BRUNS, 2010).

A MSR consiste de um conjunto de métodos matemáticos e estatísticos utilizados no estudo empírico das relações entre variáveis controladas, chamadas fatores, e uma ou mais respostas mensuráveis (BOX; DRAPER, 1987; MYERS; MONTGOMERY, 1995). Por meio da MSR, é possível aproximar um modelo empírico a uma relação entre os fatores e a resposta do processo. Essa função que relaciona tais variáveis é chamada de superfície de resposta (ANDRADE-MENDONÇA, 2012).

Box e Wilson (1951) desenvolveram métodos de determinação de condições ótimas em pesquisas industriais, introduzindo a função polinomial com duas ou mais variáveis independentes, como uma boa aproximação da função de resposta. Além disso, os autores apresentaram delineamentos de tratamentos, visando encontrar um ponto na região experimental de interesse em que a resposta fosse ótima, utilizando o menor número possível de combinações entre os níveis dos fatores.

Geralmente, a forma do relacionamento entre a variável resposta e os fatores é desconhecida. Portanto, a qualidade das estimativas dos parâmetros depende principalmente do método de estimação utilizado (método dos mínimos quadrados, ou método da máxima verossimilhança) e da utilização de planos adequados para a coleta de dados. Esses planos são denominados delineamentos para superfície de resposta, e destacam-se os delineamentos compostos centrais (DCC), dada a economia do número de combinações planejadas (ANDRADE-MENDONÇA, 2012).

A MSR tem duas etapas distintas: modelagem e deslocamento, que são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada (BARROS-NETO; SPACINO-SCARMINIO; BRUNS, 2010). O primeiro passo na modelagem é encontrar uma aproximação aceitável para a relação entre os fatores e a variável resposta, onde usualmente se aplica um polinômio de baixa ordem e, se a resposta se ajustar bem ao modelo de uma função linear das variáveis independentes, tem-se, portanto,

um modelo de primeira ordem, o qual pode apresentar ou não interações entre os fatores. Porém, se houver curvatura no sistema, então, deve-se partir para um polinômio de ordem maior, com adição de termos quadráticos, tendo assim um modelo de segunda ordem (MYERS; MONTGOMERY, 1995).

O modelo completo mais comumente usado baseado em n observações da resposta Y , medidas em diferentes combinações entre os níveis dos fatores A e B , é representado pela Equação 3:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 a_i + \beta_2 a_i^2 + \beta_3 b_j + \beta_4 b_j^2 + \beta_5 a_i b_i + \varepsilon_{ij} \quad (3)$$

Em que,

a_i é o valor do nível i do fator A ;

b_j é o valor do nível j do fator B ;

β_k é o parâmetro do modelo, com $k = 0, 1, \dots, 5$;

ε_{ij} é o erro experimental.

Para avaliar numericamente a qualidade de ajuste de um modelo, a Análise de Variância (ANOVA) costuma ser o método mais utilizado.

3.2 OBJETIVOS

Nesta parte do trabalho avaliou-se a influência da fermentação fúngica em estado sólido na obtenção de compostos fenólicos a partir da casca de café Robusta, da polpa e da borra de café. Foram necessárias as seguintes etapas:

- Avaliação de dois meios de umidificação, água e soro de queijo, visando estabelecer as diferenças no crescimento do fungo e na liberação dos compostos fenólicos.
- Avaliação da cinética da fermentação com a finalidade de determinar o número de dias necessários para o processo.
- Avaliação da influência, da concentração da suspensão de esporos utilizada na fermentação, na obtenção dos compostos fenólicos.
- Estabelecimento das melhores condições de fermentação utilizando a metodologia de superfície de resposta.

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 Microrganismo e inóculo

Utilizou-se o fungo filamentoso *Penicillium purpurogenum* CCT 2008 doado pela Coleção de Culturas Tropical, Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil), o qual foi mantido em geladeira em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) a 5 °C, e crescido em estufa de incubação a 30 °C. O inóculo da fermentação consistiu de esporos obtidos depois de 7 dias a partir do meio de cultura esporulante, os quais foram coletados em uma solução de Tween 80 com concentração de 0,1% e contados em uma câmara de Neubauer.

3.3.2 Cinética

Os resíduos de café previamente secos e triturados foram esterilizados a 120 °C por 15 minutos, em uma autoclave vertical (Phoenix, modelo AV 75). A água e o soro de queijo, ambos utilizados como meio de umidificação, também foram esterilizados nas mesmas condições. O soro de queijo após ser esterilizado e filtrado se transforma em permeado de soro, através da precipitação das proteínas, e é utilizado como uma fonte adicional de açúcares fermentescíveis e minerais.

A fermentação foi realizada em sacos plásticos de polipropileno de média densidade (tamanho 15 x 20 cm), contendo 10 g do substrato esterilizado e umidificado com água ou soro de queijo, em uma relação 1:1 do material seco e o líquido. A inoculação foi feita com uma suspensão de esporos a uma concentração de aproximadamente $6,3 \times 10^6$ esporos/g de substrato. Os sacos foram incubados a 30 °C por 14 dias. A primeira avaliação correspondente ao tempo zero foi realizada imediatamente após a inoculação. No decorrer do experimento, foi retirado a cada dia um saco plástico da estufa de incubação para a obtenção do extrato fenólico. Neste caso os extratos fenólicos foram obtidos mediante extração realizada com agitação, utilizando como solvente acetona/água (80:20 v/v). O procedimento de extração foi realizado como mencionado no item 2.3.3 do Capítulo 2.

3.3.3 Avaliação da influência da concentração da suspensão do fungo

A fermentação realizou-se sob as mesmas condições já citadas no item 3.3.2. O substrato foi umidificado com soro de leite esterilizado e filtrado. Obteve-se uma suspensão de esporos com concentração elevada à sétima potencia, a partir da qual foram realizadas as respectivas diluições, para avaliar concentrações de esporos à sexta, quinta e quarta potências. Os sacos plásticos foram incubados a 30 °C por cinco dias. A fermentação para cada concentração de fungo foi realizada em duplicata e de cada sacola foram tomadas duas amostras para a obtenção dos extratos fenólicos, mediante extração com agitação e acetona/água (80:20 v/v), como já mencionado no Capítulo 2.

3.3.4 Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Levando em consideração os resultados do teor de proteínas, lipídeos e açúcares nos resíduos de café, e a classificação que destes resíduos foi feita segundo o tipo de processo que os gera, os resíduos selecionados para melhorar as condições de fermentação foram: a casca Robusta, a borra e a polpa de café.

Foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta, na qual as três variáveis independentes (fatores) foram: umidade inicial do meio de fermentação, pH do meio de fermentação e temperatura de incubação; e a variável dependente (resposta) foi o conteúdo de compostos fenólicos. Para avaliar os efeitos combinados das variáveis independentes sobre a variável dependente aplicou-se um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) constituído por três partes:

- uma parte cúbica contendo 8 pontos (combinações entre os níveis -1 e +1), totalizando 2^3 combinações,
- uma parte axial contendo 6 pontos (uma variável no nível $+\alpha$ e duas em 0; e uma no nível $-\alpha$ e duas em 0),
- três pontos centrais (as três variáveis independentes no nível 0), a fim de fornecer uma medida do erro puro e estabilizar a variância da resposta prevista.

A faixa de variação dos fatores foi estabelecida levando em consideração as condições de crescimento do fungo reportadas na literatura e resultados de testes preliminares. A faixa de pH para o crescimento adequado de fungos filamentosos situa-se entre 4 e 6 (MITCHELL,

1992). Os testes preliminares mostraram que a temperatura de incubação do fungo pode variar entre 25 e 35 °C não inibindo o crescimento deste. A maior porcentagem de umidade do meio está restrita ao limite entre uma fermentação em estado sólido e uma fermentação em estado líquido.

Inicialmente se realizou um planejamento experimental para investigar a superfície de resposta em torno das condições habituais de funcionamento do processo e estabelecer se era necessário fazer um deslocamento ao longo da superfície de resposta. O resíduo utilizado para este propósito foi a casca de café Robusta.

A Tabela 16 apresenta o delineamento experimental com valores codificados e reais das variáveis independentes.

Tabela 16 - Delineamento composto central rotacional

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	U (%)	pH	T (°C)
1	-1	-1	-1	22	4,4	27
2	+1	-1	-1	43	4,4	27
3	-1	+1	-1	22	5,6	27
4	+1	+1	-1	43	5,6	27
5	-1	-1	+1	22	4,4	33
6	+1	-1	+1	43	4,4	33
7	-1	+1	+1	22	5,6	33
8	+1	+1	+1	43	5,6	33
9	-1,68	0	0	15	5	30
10	+1,68	0	0	50	5	30
11	0	-1,68	0	32,5	4	30
12	0	+1,68	0	32,5	6	30
13	0	0	-1,68	32,5	5	25
14	0	0	+1,68	32,5	5	35
15	0	0	0	32,5	5	30
16	0	0	0	32,5	5	30
17	0	0	0	32,5	5	30

X₁, X₂, X₃: variáveis independentes; U: umidade inicial do meio; pH: pH do meio; T: temperatura de incubação.

Os resultados obtidos para a variável resposta foram submetidos à análise de regressão múltipla, sendo considerados significativos os coeficientes cujo valor de p esteve abaixo de 0,05. A regressão foi avaliada através de análise de variância, considerando-se regressão significativa quando $p \leq 0,05$ e sem falta de ajuste quando $p > 0,05$. Para a construção da superfície de resposta, foram considerados os coeficientes estatisticamente significativos das variáveis independentes. As análises foram realizadas no programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, EUA).

Depois de analisados os resultados, realizou-se um deslocamento na variável umidade, visando obter melhores resultados e avaliou-se a casca de café Robusta, a polpa de café e borra de café.

A Tabela 17 apresenta o segundo delineamento experimental com valores codificados e reais das variáveis independentes.

Tabela 17 - Delineamento composto central rotacional com deslocamento

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	U (%)	pH	T (°C)
1	-1	-1	-1	35	4,4	27
2	+1	-1	-1	65	4,4	27
3	-1	+1	-1	35	5,6	27
4	+1	+1	-1	65	5,6	27
5	-1	-1	+1	35	4,4	33
6	+1	-1	+1	65	4,4	33
7	-1	+1	+1	35	5,6	33
8	+1	+1	+1	65	5,6	33
9	-1,68	0	0	25	5	30
10	+1,68	0	0	75	5	30
11	0	-1,68	0	50	4	30
12	0	+1,68	0	50	6	30
13	0	0	-1,68	50	5	25
14	0	0	+1,68	50	5	35
15	0	0	0	50	5	30
16	0	0	0	50	5	30
17	0	0	0	50	5	30

X₁, X₂, X₃: variáveis independentes; U: umidade inicial do meio; pH: pH do meio; T: temperatura de incubação.

O tratamento dos resultados realizou-se com o programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Oklahoma, EUA) como mencionado anteriormente.

Depois de estabelecidas as melhores condições para a obtenção de compostos fenólicos, realizou-se uma fermentação em maior escala para avaliar a capacidade antioxidante por diferentes métodos e identificar os compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Essas análises fazem parte da segunda etapa desta pesquisa e serão apresentadas nos capítulos seguintes.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Processo de fermentação utilizando o fungo *Penicillium purpurogenum* e como substrato a casca de café Robusta

Nesta pesquisa, observou-se o crescimento do fungo durante o processo de fermentação, demonstrando que a casca de café é um resíduo apropriado para atuar como substrato, pois, como apresentado na Tabela 3 (Capítulo 2), a casca Robusta contém teores significativos de proteínas e lipídeos, e açúcares em menores proporções. Por sua parte, o soro de queijo utilizado como meio de umidificação é soro desproteínizado, conhecido como permeado de soro, uma fração rica em lactose (4,5-5,0%), que se converte em uma fonte adicional de açúcares fermentescíveis. Desta forma, o sistema utilizado conteve um substrato atuando como suporte e fonte de nutrientes, e um meio líquido acrescentando açúcares e água, condições com as quais se criou um meio apropriado para o crescimento do fungo.

Foi realizada a cinética da fermentação por 14 dias, visando determinar o número de dias necessários para obter o maior teor de compostos fenólicos. Além disso, avaliou-se a presença de um meio nutriente como o soro de queijo e a adição somente de água, para estabelecer as diferenças na produção dos compostos de interesse. A suspensão de fungo dentro dos sacos de fermentação iniciou-se aproximadamente com uma concentração de $6,3 \times 10^6$ esporos/g de substrato.

A cada dia foi retirado um saco plástico da estufa de incubação e submetido à extração com acetona-água (80:20 v/v) em Shaker por 30 minutos a 40 °C. O extrato foi centrifugado e filtrado, e avaliou-se o sobrenadante.

Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 18 e são representados na Figura 7. A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que o objetivo da fermentação de aumentar o teor de compostos fenólicos liberados foi alcançado. Observou-se que, sob as condições estabelecidas, o fungo *Penicillium purpurogenum* permitiu o aumento do conteúdo dos compostos de interesse no extrato da casca de café Robusta (Tabela 18).

Os resultados da cinética mostraram que, ao ser usado o soro de queijo como meio de umidificação, foi possível obter o maior teor de compostos fenólicos, apresentando-se um incremento de 52,4% em relação à extração da casca *in natura*.

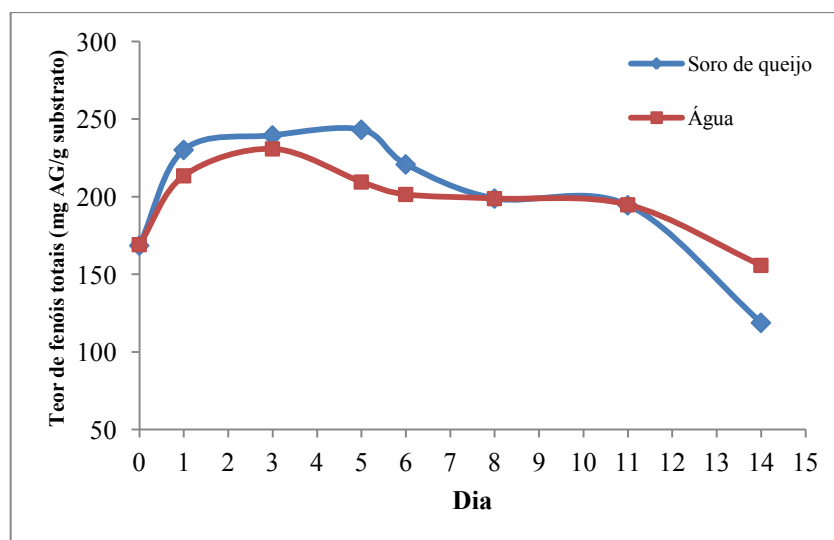
Tabela 18 - Comparação da cinética da fermentação utilizando dois meios de umidificação

Dia	Teor de fenóis totais (mg AG/g substrato)	
	Meio: água	Meio: soro
0	169,17 ± 2,24 ^E	168,58 ± 2,36 ^E
1	213,50 ± 5,29 ^B	230,17 ± 1,53 ^B
3	230,83 ± 4,16 ^A	239,50 ± 2,65 ^A
5	209,50 ± 2,65 ^{BC}	243,17 ± 4,04 ^A
6	201,50 ± 2,00 ^{CD}	220,83 ± 1,15 ^C
8	198,83 ± 1,53 ^D	198,83 ± 0,58 ^D
11	194,83 ± 2,31 ^D	194,50 ± 5,57 ^D
14	155,83 ± 3,51 ^F	118,83 ± 2,52 ^F
	Casca <i>in natura</i>	159,50 ± 1,06

Valores expressos em média ± desvio padrão, n = 3

Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si.

Figura 7 – Cinética da fermentação utilizando dois meios de umidificação



Observou-se um aumento destes compostos a partir do primeiro dia, atingindo o valor mais alto entre o terceiro e quinto dia, a partir do qual o conteúdo de compostos fenólicos diminuiu (Figura 7). A diminuição no teor estaria relacionada com a participação destes compostos em reações químicas ou enzimáticas não avaliadas no presente estudo.

Observa-se na Tabela 18 que, quando foi usada água como meio de umidificação, o teor de compostos fenólicos também aumentou a partir do primeiro dia, atingindo o valor máximo no terceiro dia, depois do qual estes compostos diminuíram. Utilizando água como meio de umidificação, o incremento nos compostos fenólicos foi de 44,7% no dia 3.

Pode-se concluir que a presença do permeado de soro e, conseqüentemente, de seus açúcares fermentescíveis, tem um papel importante no processo de fermentação, aumentando os compostos fenólicos no meio. A utilização de soro de queijo como meio de umidificação pode ser considerada uma importante vantagem, pois não foi necessária a adição de meios sintéticos.

Embora não tenham sido encontrados, na literatura pesquisada, resultados do mesmo processo no resíduo testado, Machado e outros (2012) encontraram que o fungo *Penicillium purpurogenum* liberou compostos fenólicos mediante fermentação em estado sólido, atingindo valores de 7,02 (mg g⁻¹ de borra) e 3,47 (mg g⁻¹ de tegumento), sugerindo que os fenóis são produtos da degradação dos resíduos de café utilizados como substrato.

Os resultados da cinética também mostraram um leve incremento no teor de fenóis no tempo zero quando comparado com a casca *in natura*, fazendo-se necessário verificar este acréscimo.

Assim, foram realizados testes no tempo zero (logo após inoculação) visando verificar esta questão.

- Teste com o soro:

Não foi possível avaliar o teor de compostos fenólicos do soro *in natura*, devido à turbidez que este apresenta. Foi necessário centrifugá-lo e diluí-lo.

A absorbância do soro centrifugado e diluído 10 vezes foi a mesma absorbância que apresentou o tubo de reação contendo o soro mais os reagentes utilizados para avaliar compostos fenólicos. Portanto, o soro não é responsável pelo aumento no teor de compostos fenólicos.

- Teste com o substrato (casca Robusta):

Foi avaliado o substrato com adição prévia de 10 mL de água e também com adição de água e Tween 80 (0,1%), nas mesmas proporções utilizadas na fermentação. Procedeu-se a realizar a extração com acetona/água (80:20 v/v) e a análise de fenóis totais. Nos dois testes o teor de compostos fenólicos foi o mesmo que o teor apresentado pela casca *in natura*.

- Teste com o fungo:

Não foi possível avaliar o fungo nas condições utilizadas na fermentação porque a suspensão do fungo em Tween 80 apresentou esporos em suspensão que não permitiram realizar a leitura espectrofotométrica. Por esta razão, foi realizada a extração do fungo nas mesmas condições

que foram extraídos os compostos fenólicos. Foram adicionados 20 mL de acetona-água (80:20 v/v) em Erlenmeyer contendo o fungo após crescimento de sete dias em meio BDA inclinado. Realizou-se a extração em um Shaker por 30 minutos a 40 °C, seguida de centrifugação do extrato, avaliando-se o sobrenadante.

Observou-se que o valor de compostos fenólicos da suspensão de esporos é similar ao valor da diferença obtida entre a casca *in natura* (sem fermentar) e o valor depois da inoculação (tempo zero). Portanto, conclui-se que a suspensão do fungo é a responsável pelo pequeno aumento de fenóis no tempo zero.

Levando em consideração os resultados obtidos na cinética, foi selecionado como melhor meio de umidificação o soro de queijo e o período entre três e cinco dias como o melhor tempo para obter o maior teor de compostos fenólicos.

3.4.2 Avaliação do efeito de diferentes concentrações da suspensão do fungo no teor de compostos fenólicos após cinco dias de fermentação

Estabelecido o melhor meio de umidificação e o período em que se apresenta maior produção de fenóis, avaliou-se a influência da concentração inicial da suspensão do fungo na obtenção dos compostos de interesse.

Na Tabela 19, observa-se que o aumento dos compostos fenólicos, ao final do quinto dia de cultivo, está influenciado pela concentração da suspensão do fungo, alcançando-se o maior teor de fenóis quando a suspensão dentro do saco plástico teve uma concentração inicial com valor de 10^6 . Observou-se que a concentração com valor de 10^4 , neste mesmo período, conseguiu apenas um pequeno aumento no teor de fenóis com respeito ao substrato no tempo zero apresentado na Tabela 18, enquanto que a concentração de 10^7 não apresentou variação em relação ao mesmo substrato. Presume-se que, com uma concentração de 10^7 , apresenta-se rapidamente exaustão dos nutrientes, não permitindo que o fungo complete a etapa de crescimento e a posterior liberação ou produção de fenólicos.

Tabela 19 - Teor de fenóis totais na casca de café após cinco dias de fermentação, utilizando diferentes concentrações da suspensão do fungo

Concentração da suspensão do fungo (esporos/g de substrato)	Teor de fenóis totais (mg AG/g substrato)
$1,15 \times 10^4$	$192,63 \pm 3,83^C$
$1,15 \times 10^5$	$221,79 \pm 1,88^B$
$1,15 \times 10^6$	$245,75 \pm 2,26^A$
$1,15 \times 10^7$	$165,96 \pm 0,25^D$

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão, n = 3

Médias, na mesma coluna, seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente entre si.

Levando em consideração que os fungos filamentosos crescem adequadamente em uma faixa de pH de 2,0 a 9,0, com uma região ótima entre 3,8 e 6,0, foi constatado que durante a fermentação observa-se um leve incremento no pH do meio e que não houve diferenças significativas de pH entre a fermentação com água e a fermentação com soro (Tabela 20).

Tabela 20 - Valores de pH do substrato

pH antes da fermentação	Tempo zero da fermentação		Após 5 dias de fermentação	
	Meio de fermentação	pH	Meio de fermentação	pH
5,61	H ₂ O	5,93	H ₂ O	6,36
	Soro	5,88	Soro	6,39

3.4.3 Metodologia de Superfície de Resposta

3.4.3.1 Casca Robusta (Experimento I)

Os resultados do teor de compostos fenólicos obtidos em cada ensaio experimental estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Teor de compostos fenólicos na casca de café Robusta
(planejamento inicial)

Ensaio	Umidade (%)	pH	Temperatura (°C)	Teor de fenóis totais* (mg AG/ g de substrato)
1	22	4,4	27	137,22 ± 0,75
2	43	4,4	27	185,92 ± 0,71
3	22	5,6	27	142,98 ± 1,16
4	43	5,6	27	185,81 ± 1,17
5	22	4,4	33	130,98 ± 0,75
6	43	4,4	33	184,37 ± 3,51
7	22	5,6	33	137,10 ± 0,91
8	43	5,6	33	184,84 ± 0,46
9	15	5	30	129,84 ± 2,78
10	50	5	30	216,42 ± 2,52
11	32,5	4	30	184,04 ± 0,48
12	32,5	6	30	190,23 ± 0,48
13	32,5	5	25	144,58 ± 1,49
14	32,5	5	35	152,83 ± 0,41
15	32,5	5	30	169,33 ± 1,49
16	32,5	5	30	170,98 ± 0,71
17	32,5	5	30	169,88 ± 1,04

* Valores expressos em média ± desvio padrão, n = 3

Os dados referentes ao teor de compostos fenólicos foram submetidos à análise de regressão múltipla para ajuste do modelo quadrático e a regressão foi submetida à análise de variância (ANOVA). Calcularam-se os coeficientes de regressão que são apresentados na Tabela 22. O termo linear da umidade (X_1) e o termo quadrático da temperatura (X_3X_3) foram estatisticamente significativos a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Tabela 22 - Regressão múltipla para ajuste do modelo quadrático e análise de variância da regressão para os dados de teor de compostos fenólicos em casca de café Robusta ($R^2 = 97,09\%$)

Fonte de variação	Coefficiente	Erro	t-estimativa	p-valor
Constante	170,611	3,777	45,168	<0,001
X ₁ (umidade)	24,769	1,774	13,964	<0,001
X ₂ (pH)	1,658	1,774	0,935	0,381
X ₃ (temperatura)	-0,056	1,774	-0,032	0,976
X ₁ X ₁	-0,800	1,952	-0,410	0,694
X ₂ X ₂	4,154	1,952	2,128	0,071
X ₃ X ₃	-9,434	1,952	-4,832	0,002
X ₁ X ₂	-1,441	2,318	-0,622	0,554
X ₁ X ₃	1,199	2,318	0,518	0,621
X ₂ X ₃	0,117	2,318	0,050	0,961
Regressão (ANOVA)	----	----	----	<0,0001
Falta de ajuste	----	----	----	0,012

A Equação 4 mostra o teor de compostos fenólicos previsto pelo modelo, em função das variáveis codificadas no modelo reparametrizado que contém os coeficientes (termos) estatisticamente significativos.

$$Y = 170,611 + 24,769X_1 - 9,434X_3^2 \quad (4)$$

em que:

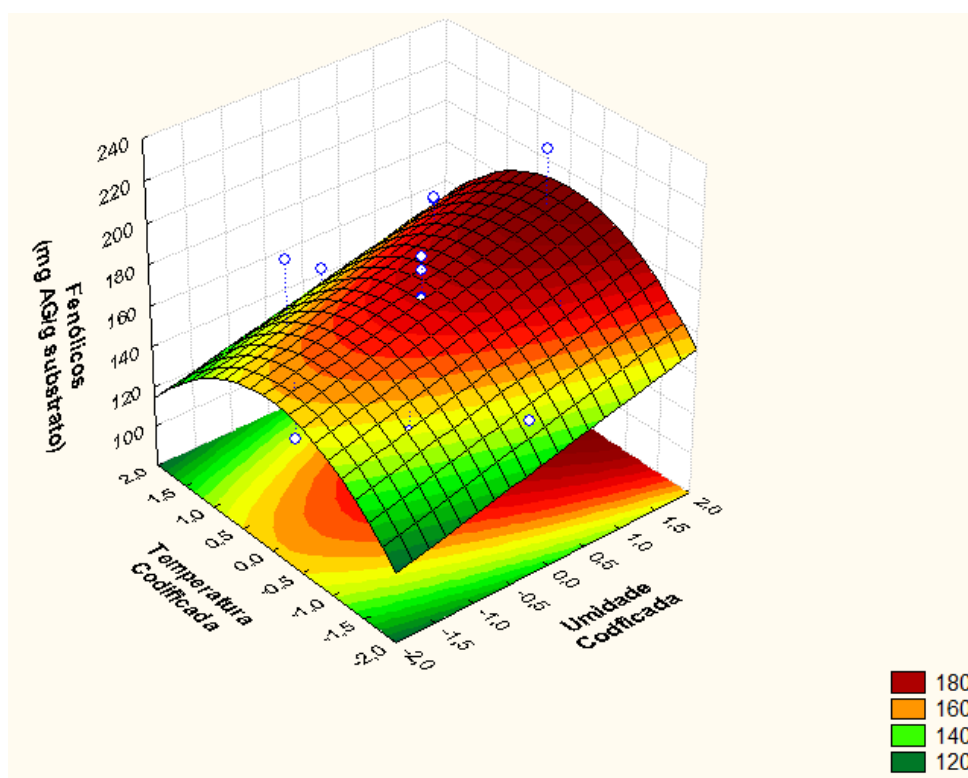
Y = teor de compostos fenólicos

X₁ = umidade inicial do meio codificada

X₃ = temperatura de incubação codificada

Analisando a Tabela 22 para a resposta Y, verifica-se que a regressão foi altamente significativa ($p < 0,0001$) com R^2 de 97,09%. A partir da equação pôde-se construir a superfície de resposta referente ao efeito da umidade e a temperatura sobre o teor de compostos fenólicos, como apresentada na Figura 8.

Figura 8 - Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos (mg AG/g de substrato) em casca de café Robusta em função da umidade inicial do meio e a temperatura de incubação



O teor de compostos fenólicos na casca de café Robusta depois da fermentação em estado sólido foi afetado pela umidade inicial do meio e a temperatura de incubação. O aumento no teor da umidade inicial do meio junto com a variação da temperatura no intervalo de 27 a 33 °C causou um incremento no conteúdo dos compostos fenólicos, encontrando-se o maior valor (216,42 mg AG/g substrato) quando a temperatura é 30 °C e a umidade inicial do meio é 50%. Porém, a região com melhores resultados encontra-se quando o fator umidade atinge seu valor máximo, sugerindo que o deslocamento desse fator para valores maiores pode apresentar melhores resultados. Dessa forma e levando em consideração que é necessário aumentar a porcentagem de umidade em materiais mais porosos como a borra de café, uma vez que este tipo de material apresenta maior absorção da água, foram realizados os seguintes experimentos com um novo planejamento experimental onde foi deslocado o fator umidade.

3.4.3.2 Casca Robusta (Experimento II)

Os resultados do teor de compostos fenólicos obtidos a partir dos ensaios experimentais com deslocamento de um dos fatores (umidade) apresentam-se na Tabela 23.

Tabela 23 - Teor de compostos fenólicos na casca de café Robusta
(segundo planejamento)

Ensaio	Umidade (%)	pH	Temperatura (°C)	Teor de fenóis totais* (mg AG/ g de substrato)
1	35	4,4	27	161,29 ± 1,12
2	65	4,4	27	181,60 ± 1,20
3	35	5,6	27	150,80 ± 1,61
4	65	5,6	27	174,70 ± 1,20
5	35	4,4	33	188,49 ± 1,85
6	65	4,4	33	252,71 ± 1,00
7	35	5,6	33	182,20 ± 1,61
8	65	5,6	33	237,57 ± 1,85
9	25	5	30	186,31 ± 0,22
10	75	5	30	237,81 ± 1,25
11	50	4	30	240,75 ± 2,00
12	50	6	30	158,75 ± 1,32
13	50	5	25	183,58 ± 1,53
14	50	5	35	230,58 ± 0,58
15	50	5	30	217,58 ± 1,04
16	50	5	30	216,42 ± 2,52
17	50	5	30	211,92 ± 2,47

* Valores expressos em média ± desvio padrão, n = 3

Calcularam-se os coeficientes de regressão que são apresentados na Tabela 24. Neste caso, os termos lineares dos três fatores foram estatisticamente significativos a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

A equação do modelo reparametrizado é a seguinte:

$$Y = 216,245 + 18,337X_1 - 12,940 X_2 + 19,889 X_3 \quad (5)$$

em que:

Y = teor de compostos fenólicos

X₁ = umidade inicial do meio codificada

X₂ = pH do meio codificado

X₃ = temperatura de incubação codificada

Tabela 24 - Regressão múltipla para ajuste do modelo quadrático e análise de variância da regressão para os dados de teor de compostos fenólicos em casca de café Robusta ($R^2 = 97,09\%$). Modelo deslocado

Fonte de variação	Coefficiente	Erro	t-estimativa	p-valor
Constante	216,245	10,680	20,247	<0,001
X ₁ (umidade)	18,337	5,016	3,656	0,008
X ₂ (pH)	-12,940	5,016	-2,580	0,036
X ₃ (temperatura)	19,889	5,016	3,965	0,005
X ₁ X ₁	-4,384	5,520	-0,794	0,453
X ₂ X ₂	-8,737	5,520	-1,583	0,158
X ₃ X ₃	-6,144	5,520	-1,113	0,302
X ₁ X ₂	-0,659	6,553	-0,101	0,923
X ₁ X ₃	9,422	6,553	1,438	0,194
X ₂ X ₃	-0,505	6,553	-0,077	0,941
Regressão (ANOVA)	----	----	----	0,029
Falta de ajuste	----	----	----	0,019

Verifica-se que a regressão foi significativa ($p < 0,05$) com R^2 de 85,36%. O valor de R^2 sugere que o modelo é adequado para avaliar o comportamento do teor de compostos fenólicos frente aos três fatores. A partir da equação pôde-se construir as superfícies de resposta referente ao efeito da umidade inicial, o pH do meio, e a temperatura de incubação, sobre o teor de compostos fenólicos, como apresentado na Figura 9.

Figura 9 - Superfícies de resposta para o teor de compostos fenólicos (mg AG/g substrato) em casca de café Robusta em função da umidade e o pH do meio (a); umidade do meio e temperatura de incubação (b); temperatura de incubação e pH do meio (c)

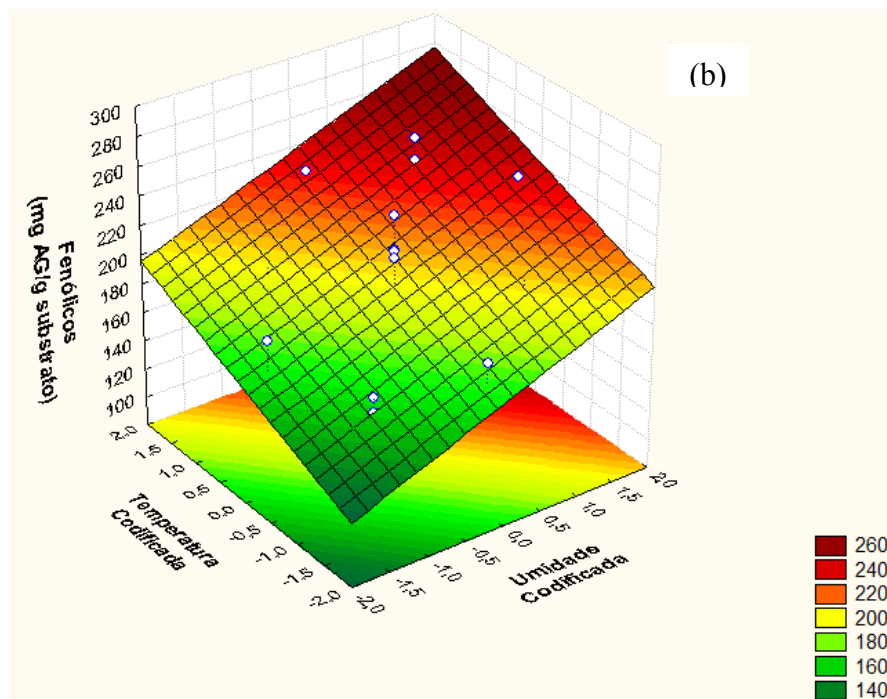
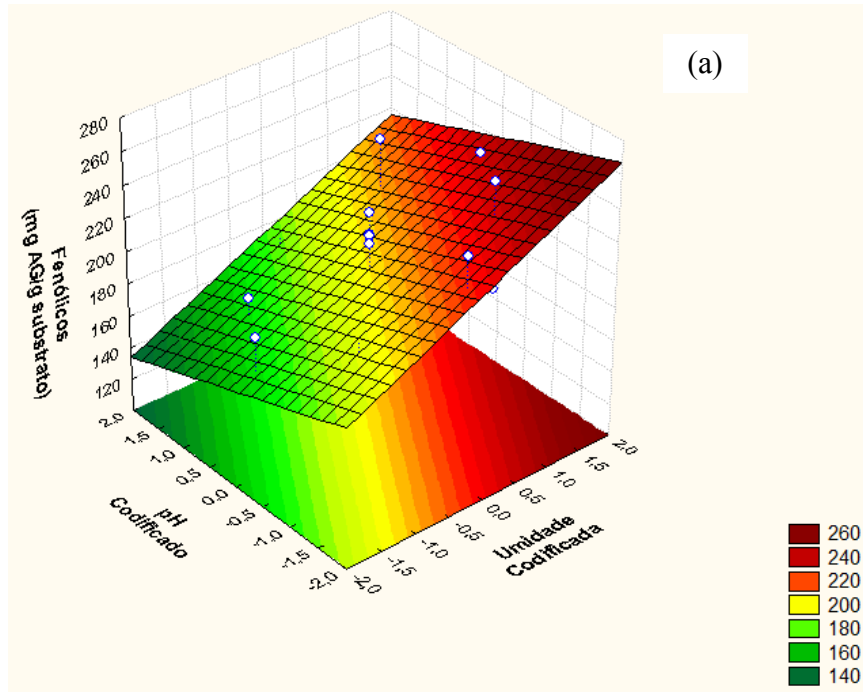
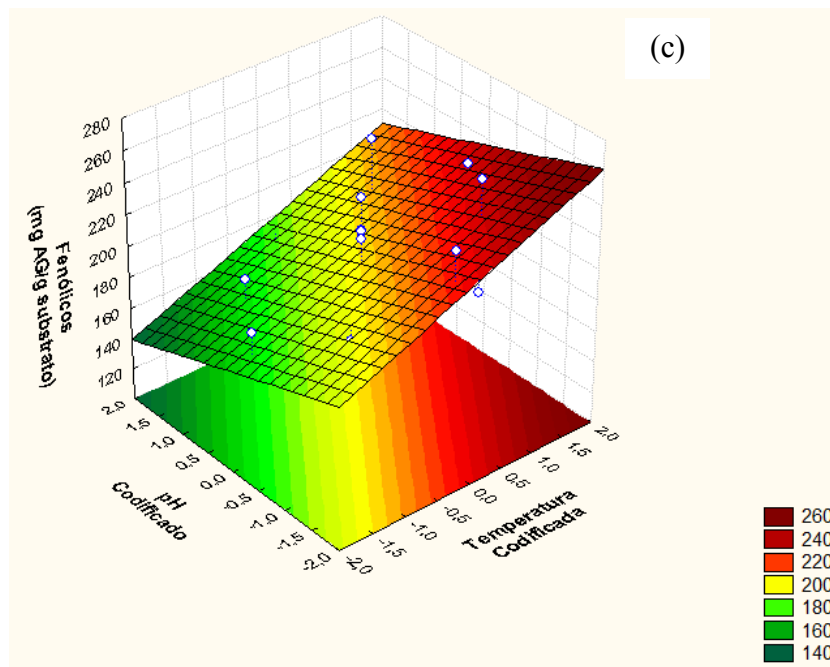


Figura 9 - Superfícies de resposta para o teor de compostos fenólicos (mg AG/g substrato) em casca de café Robusta em função da umidade e o pH do meio (a); umidade do meio e temperatura de incubação (b); temperatura de incubação e pH do meio (c)



Ao deslocar o fator umidade e trabalhar com o novo planejamento experimental, observou-se que o teor de compostos fenólicos na casca de café depois da fermentação em estado sólido foi afetado por todas as variáveis independentes. Observou-se que o aumento do teor inicial de umidade e da temperatura continua influenciando amplamente o processo.

A Figura 9a mostra o efeito do pH do meio e a umidade inicial do substrato no teor de compostos fenólicos da casca fermentada. Maiores porcentagens de umidade inicial no substrato têm maior influência no teor de polifenóis que o aumento do pH do meio. Umidade inicial entre 50 e 75% e pH do meio abaixo de 5 são as melhores condições para o aumento no teor de compostos fenólicos. Na Figura 9b pode-se observar que altas porcentagens de umidade inicial e altas temperaturas de incubação são as condições ideais para o aumento no teor de polifenóis. A Figura 9c apresenta o efeito do pH do meio e a temperatura de incubação, mostrando que temperaturas na faixa de 30 a 35 °C tem um efeito importante sobre o teor de polifenóis, e confirmando que o pH inicial do meio deve ser mantido abaixo de 5.

3.4.3.3 Polpa

Os resultados do teor de compostos fenólicos em cada ensaio experimental usando polpa de café como substrato estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 - Teor de compostos fenólicos na polpa de café

Ensaio	Umidade (%)	pH	Temperatura (°C)	Teor de fenóis totais* (mg AG/ g de substrato)
1	35	4,4	27	101,79 ± 0,43
2	65	4,4	27	113,21 ± 1,15
3	35	5,6	27	92,44 ± 1,53
4	65	5,6	27	113,01 ± 2,51
5	35	4,4	33	107,17 ± 1,49
6	65	4,4	33	117,40 ± 0,88
7	35	5,6	33	93,00 ± 0,65
8	65	5,6	33	113,75 ± 1,20
9	25	5	30	108,44 ± 1,30
10	75	5	30	170,31 ± 0,62
11	50	4	30	117,92 ± 0,76
12	50	6	30	119,92 ± 0,76
13	50	5	25	96,75 ± 1,00
14	50	5	35	95,75 ± 1,32
15	50	5	30	122,75 ± 1,50
16	50	5	30	122,75 ± 1,80
17	50	5	30	120,25 ± 2,29

* Valores expressos em média ± desvio padrão, n = 3

Para este experimento observou-se que o termo linear da umidade (X_1) e o termo quadrático da temperatura (X_3X_3) foram estatisticamente significativos a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (Tabela 26).

Tabela 26 - Regressão múltipla para ajuste do modelo quadrático e análise de variância da regressão para os dados de teor de compostos fenólicos em polpa de café ($R^2 = 83,52\%$)

Fonte de variação	Coefficiente	Erro	t-estimativa	p-valor
Constante	122,657	6,365	19,271	<0,001
X ₁ (umidade)	12,231	2,989	4,092	0,005
X ₂ (pH)	-1,757	2,989	-0,588	0,575
X ₃ (temperatura)	0,673	2,989	0,225	0,828
X ₁ X ₁	3,623	3,290	1,101	0,307
X ₂ X ₂	-3,610	3,290	-1,097	0,309
X ₃ X ₃	-11,624	3,290	-3,533	0,010
X ₁ X ₂	2,459	3,905	0,630	0,549
X ₁ X ₃	-0,128	3,905	-0,033	0,975
X ₂ X ₃	-1,032	3,905	-0,264	0,799
Regressão (ANOVA)	----	----	----	0,042
Falta de ajuste	----	----	----	0,012

A equação do modelo reparametrizado é a seguinte:

$$Y = 122,6577 + 12,231X_1 - 11,624 X_3^2 \quad (6)$$

em que:

Y = teor de compostos fenólicos

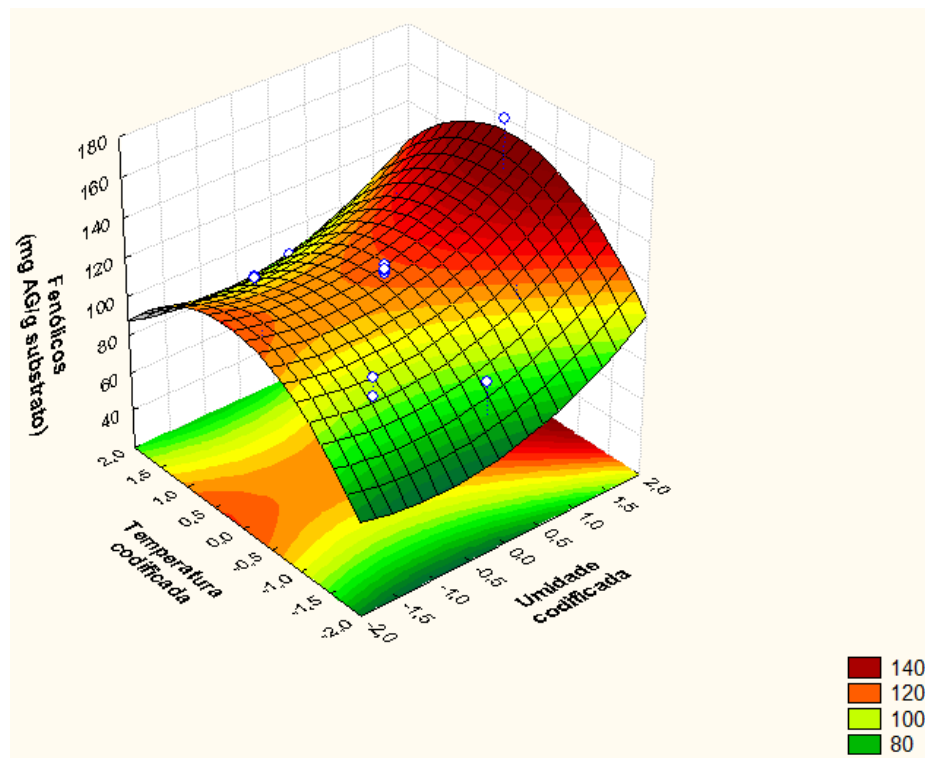
X₁ = umidade inicial do meio codificada

X₃ = temperatura de incubação codificada

Observa-se que a regressão foi significativa ($p < 0,05$) com R^2 de 83,52%. A partir desta equação pôde-se construir a superfície de resposta referente ao efeito da umidade, e a temperatura sobre o teor de compostos fenólicos, como apresentado na Figura 10.

A superfície de resposta permite observar que umidade inicial entre 65 e 75% e temperatura de incubação de aproximadamente 33 °C, constituem a região onde houve maior teor de polifenóis.

Figura 10 - Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos (mg AG/g de substrato) em polpa de café em função da umidade inicial do meio e a temperatura de incubação



3.4.3.4 Borra

Os resultados de cada experimento utilizando a borra de café como substrato na fermentação apresentam-se na Tabela 27.

Na Tabela 28 observa-se que o termo linear da umidade (X_1) e o termo quadrático da temperatura (X_3X_3) foram estatisticamente significativos a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Tabela 27 - Teor de compostos fenólicos na borra de café

Ensaio	Umidade (%)	Ph	Temperatura (°C)	Teor de fenóis totais* (mg AG/ g de substrato)
1	35	4,4	27	85,92 ± 0,49
2	65	4,4	27	100,34 ± 2,51
3	35	5,6	27	82,38 ± 2,34
4	65	5,6	27	103,79 ± 2,07
5	35	4,4	33	83,23 ± 1,61
6	65	4,4	33	95,55 ± 1,20
7	35	5,6	33	94,14 ± 1,85
8	65	5,6	33	102,06 ± 1,52
9	25	5	30	105,56 ± 1,30
10	75	5	30	142,81 ± 2,51
11	50	4	30	125,75 ± 0,50
12	50	6	30	126,25 ± 2,29
13	50	5	25	83,92 ± 0,76
14	50	5	35	82,58 ± 1,61
15	50	5	30	124,25 ± 0,50
16	50	5	30	123,75 ± 1,00
17	50	5	30	125,08 ± 0,74

* Valores expressos em média ± desvio padrão, n = 3

Tabela 28 - Regressão múltipla para ajuste do modelo quadrático e análise de variância da regressão para os dados de teor de compostos fenólicos em borra de café ($R^2 = 83,27\%$)

Fonte de variação	Coefficiente	Erro	t-estimativa	p-valor
Constante	125,452	6,886	18,220	<0,001
X ₁ (umidade)	8,693	3,234	2,688	0,031
X ₂ (pH)	1,331	3,234	0,412	0,693
X ₃ (temperatura)	0,023	3,234	0,007	0,995
X ₁ X ₁	-3,818	3,559	-1,073	0,319
X ₂ X ₂	-3,177	3,559	-0,893	0,402
X ₃ X ₃	-18,291	3,559	-5,139	0,001
X ₁ X ₂	0,325	4,225	0,077	0,941
X ₁ X ₃	-1,948	4,225	-0,461	0,659
X ₂ X ₃	2,190	4,225	0,518	0,620
Regressão (ANOVA)	----	----	----	0,044
Falta de ajuste	----	----	----	0,002

A equação do modelo reparametrizado é a seguinte:

$$Y = 125,452 + 8,693X_1 - 18,291 X_3^2 \quad (7)$$

em que:

Y = teor de compostos fenólicos

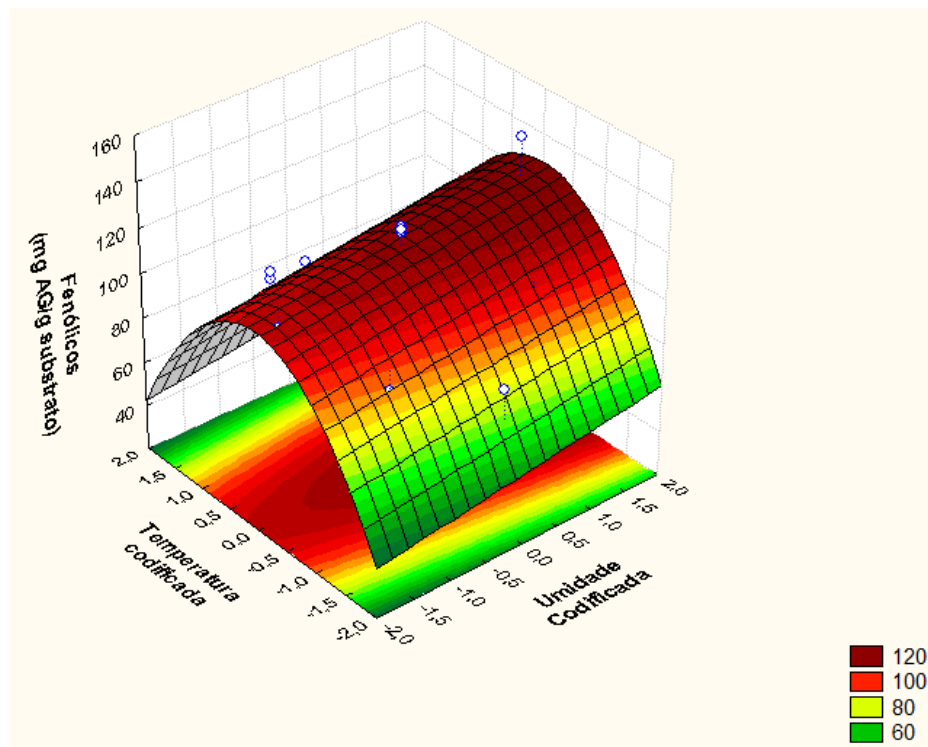
X_1 = umidade inicial do meio codificada

X_3 = temperatura de incubação codificada

Observa-se que a regressão foi significativa ($p < 0,044$) com R^2 de 83,27%. A partir desta equação pôde-se construir a superfície de resposta referente ao efeito da umidade, e a temperatura sobre o teor de compostos fenólicos, como apresentado na Figura 11.

Na superfície de resposta observa-se que os maiores teores de compostos fenólicos apresentam-se quando a umidade inicial tem valores no intervalo de 50 a 75%, e a temperatura varia entre 27 e 33 °C.

Figura 11 - Superfície de resposta para o teor de compostos fenólicos (mg AG/g de substrato) em borra de café em função da umidade inicial do meio e a temperatura de incubação



Diferentes metodologias de FES têm reportado que a variável mais importante do processo é o teor inicial de umidade. Neste estudo verificou-se que para os três processos de fermentação, o conteúdo inicial de umidade foi um fator determinante tanto no crescimento do fungo quanto no teor de compostos fenólicos que são liberados no meio, sendo recomendável trabalhar entre 50 e 75%. Porém, o limite máximo dessa umidade depende do tipo de processo de fermentação de interesse. Nesta pesquisa, observou-se que umidade inicial de 75%, principalmente na casca e na polpa de café, era o limite entre uma fermentação em estado sólido e uma em estado líquido. Já na borra de café essa porcentagem pode ser ampliada, devido às características do material, o qual absorve maior conteúdo de água.

Verificou-se que, junto com o teor inicial de umidade, a temperatura de incubação é outra variável importante no processo. Para a casca, os melhores resultados na extração de polifenóis obtiveram-se quando a temperatura de incubação esteve entre 33 e 35 °C, e no caso da polpa, quando a temperatura esteve próxima dos 33 °C. Para a borra de café, apresentou-se um intervalo ótimo de temperatura entre 27 e 33 °C.

As variações pequenas no pH inicial do meio não exercem uma influência importante no processo, desde que seja mantido no intervalo ideal de crescimento para os fungos filamentosos, entre 4 e 6.

Tomando os maiores valores de teor de compostos fenólicos das Tabelas 23, 25 e 27, calculou-se o incremento destes compostos com respeito aos extratos *in natura*. As porcentagens de aumento foram de 58,44 %, 84,87 % e 133,69 % para a casca, a polpa e a borra, respectivamente. Assim, observa-se viável o aproveitamento destes resíduos na implementação de um processo de fermentação em estado sólido cujo objetivo seja a recuperação de compostos fenólicos.

Finalmente, realizou-se uma nova fermentação com cada substrato, onde os valores dos parâmetros já avaliados estivessem dentro das regiões onde houve maior teor de compostos fenólicos, e assim, identificar os principais polifenóis e avaliar a capacidade antioxidante dos extratos.

3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

O fungo filamentoso *Penicillium purpurogenum* cresceu na casca de café Robusta, na polpa e na borra de café, todos eles umidificados com permeado de soro. Entre o terceiro e o quinto dias da fermentação, evidenciou-se aumento de compostos fenólicos nos resíduos, quando comparado com os resíduos *in natura*.

Foi comprovado que a presença de soro de queijo como meio de umidificação influenciou positivamente o aumento dos compostos fenólicos. Além disso, as análises demonstraram que a concentração da suspensão de esporos também influenciou o processo de fermentação. Obteve-se maior teor de compostos fenólicos quando a concentração dessa suspensão teve valor de 10^6 .

Verificou-se que a porcentagem inicial de umidade do meio e a temperatura de incubação são os fatores mais importantes tanto para o crescimento do fungo, quanto no teor de compostos fenólicos que são liberados no meio, porém o intervalo ideal destes dois fatores depende do tipo de resíduo utilizado na fermentação.

O pH inicial, desde que mantido no intervalo de 4 a 6 considerado ideal para o crescimento de fungos filamentosos, não influencia no processo de fermentação.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-MENDONÇA, L. **Desempenho do Delineamento Composto Central em experimentos com alto coeficiente de variação**, 2012. 68f. Dissertação. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. p. 414.

BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: John Wiley & Sons, 1987. p. 669.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 1–45, 1951.

BRAND, D. et al. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 27, n. 1-2, p. 127–133, 2000.

MACHADO, C. M. M. et al. Gibberellic acid production by solid-state fermentation in coffee husk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 102-103, n. 1-6, p. 179–91, 2002.

MACHADO, E. M. S. et al. Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 60, p. 87–90, 2012.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 29, n. 3, p. 365–73, 2011.

MITCHELL, D. A. Microbial basis of processes. In: DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. (Eds.). **Solid Substrate Cultivation**. London: Elsevier Applied Science, 1992. p. 17–28.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Production and Application of Xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 5, n. 2, p. 657–664, 2012.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. New York: John Wiley & Sons, 1995. p. 700

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153–162, 2000.

SHANKARANAND, V. S.; LONSANE, B. K. Coffee husk: an inexpensive substrate for production of citric acid by *Aspergillus niger* in a solid-state fermentation system. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 165–168, 1994.

SOARES, M. et al. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n. 8, p. 857–861, 2000.

CAPÍTULO 4 - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS PRESENTES NOS EXTRATOS DOS RESÍDUOS DE CAFÉ ANTES E APÓS FERMENTAÇÃO

4.1 INTRODUÇÃO

4.1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

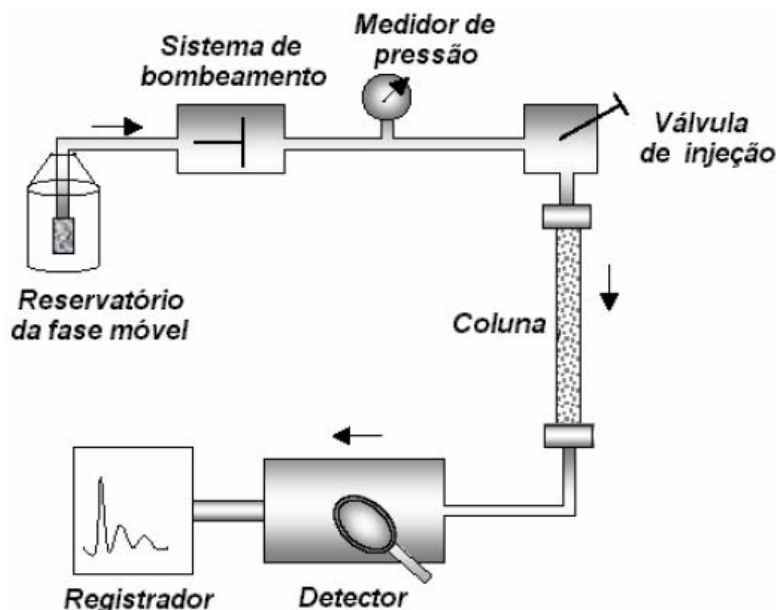
A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a técnica preferida tanto para a separação quanto para a quantificação de compostos fenólicos (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013).

As razões para a popularidade deste método devem-se à sua grande versatilidade, o que permite o emprego desta técnica para uma larga variedade de amostras não voláteis, além de reprodutibilidade, estabilidade, sensibilidade, precisão e exatidão (MCNAIR; LANÇAS, 1985).

A Cromatografia Líquida consiste em um processo físico utilizado na separação dos componentes de uma mistura. A base para esta separação é a distribuição dos analitos entre duas fases: uma fase estacionária e a fase móvel (um líquido). Quando a fase estacionária contém grupos polares (ciano propil ou aminopropil quimicamente ligados à sílica), o sistema opera em Fase Normal, e o eluente é, usualmente, menos polar, do tipo hexano, diclorometano, éter de petróleo. O processo é denominado Fase Reversa quando são empregadas fases estacionárias contendo grupos apolares como octadecil (C-18), octil (C-8), hexil (C-6); neste caso a fase móvel será mais polar, como metanol ou acetonitrila em diferentes proporções com água (LANÇAS, 2009a).

A Figura 12 ilustra um diagrama esquemático de um cromatógrafo líquido. Os componentes básicos de um sistema para CLAE consistem em: um reservatório de solvente, o qual contém a fase móvel; a bomba, usada para impulsionar o solvente a um fluxo constante; o controlador de pressão, para monitorar a pressão da bomba antes da coluna, o injetor, que pode ser uma válvula manual ou um injetor automático; a coluna, contendo a fase estacionária e a qual é considerada o coração do sistema cromatográfico; o detector e o sistema de dados para aquisição, tratamento de dados e emissão de relatórios (LANÇAS, 2009b; ZERAIK, 2010).

Figura 12- Diagrama esquemático de um cromatógrafo líquido



FONTE: Collins, Braga e Bonato (1990)

Neste trabalho utilizou-se a CLAE-UV/DAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta por arranjo de diodos) com o objetivo de identificar os compostos fenólicos que foram quantificados mediante o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu nos extratos *in natura* dos resíduos de café, e também nos resíduos que foram utilizados no estudo da fermentação em estado sólido com os parâmetros ajustados que foram estabelecidos no Capítulo 3.

4.1.2 Validação do método analítico

Após o desenvolvimento de um método analítico, e antes de sua aplicação na análise de amostras de interesse, o mesmo precisa ser validado de forma a assegurar que, nas condições em que será utilizado, gere os resultados esperados (LANÇAS, 2009a).

Utilizando-se a técnica CLAE há necessidade de se avaliar a qualidade das medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis sobre uma amostra, este deve sofrer uma avaliação que se designa por validação (RIBANI et al., 2004).

De maneira geral, é possível distinguir dois tipos de validação. O primeiro chamado de validação laboratorial (*in house validation*) consiste de etapas de validação dentro de um único laboratório. O segundo tipo, a validação completa (*full validation*), avalia a reprodutibilidade da metodologia em um estudo interlaboratorial. Uma metodologia somente pode ser aceita como oficial se for submetida a um processo de validação total ou completa (RIBANI et al., 2004, DE ALMEIDA-FRANCISCO, 2008).

Apesar da ausência de consenso sobre quais parâmetros devem ser incluídos no processo de validação de um método analítico, os seguintes são, normalmente, estudados (HARTMANN et al., 1998; LANÇAS, 2009a):

- Exatidão: expressa a concordância entre o valor encontrado e o valor aceito como verdadeiro ou como referência.
- Precisão: é a expressão de concordância, entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra. A precisão pode ser avaliada em três níveis: o estudo da repetibilidade ou estudo intra-dia, a precisão intermédia e a reprodutibilidade.
- Linearidade: é a capacidade de obter resultados linearmente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo determinado.
- Limite de detecção: corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente, quantificada como um valor exato.
- Limite de quantificação: corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão.

4.2 OBJETIVOS

- Desenvolver um método por CLAE-UV/DAD para a determinação quantitativa dos compostos fenólicos dos extratos acetônicos dos resíduos de café, obtidos antes e após fermentação.
- Identificar e quantificar os principais compostos fenólicos presentes nos extratos acetônicos da casca de café Robusta, da polpa e da borra de café, sem fermentar.
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nos extratos acetônicos obtidos com as condições de fermentação estabelecidas no Capítulo 3.
- Comparar a concentração dos compostos fenólicos presentes antes e após a fermentação.

4.3 PARTE EXPERIMENTAL

4.3.1 Materiais, reagentes e padrões analíticos

Materiais: cartuchos de extração em fase sólida com fase reversa tipo octadecil silano (C_{18}) e 500 mg de adsorvente (Chromabond[®]); membranas para filtração (nylon, Allcrom) com poros de 0,22 μ m.

Reagentes: metanol e acetonitrila grau HPLC (J.T.Baker, EUA); etanol, acetona e ácido acético glacial grau analítico da Synth; ácido trifluoroacético (TFA) $\geq 98\%$ da Sigma (St. Louis, EUA); água deionizada purificada em sistema Milli-Q (Millipore[®]).

Padrões: ácido clorogênico $\geq 95\%$ e ácido cafeico $\geq 98\%$ fornecidos pela Sigma (St. Louis, EUA), rutina $\geq 97\%$ da Acros Organics (New Jersey, USA).

4.3.2 Preparo dos extratos para análise por CLAE-UV/DAD

Foi realizado o seguinte procedimento de extração: pesaram-se 10,0 g de cada substrato antes e após a fermentação, adicionando-se 200 mL de etanol-água (80:20 v/v) ou acetona-água (80:20 v/v). As amostras foram colocadas em frascos de Erlenmeyer em uma incubadora Shaker (Lucadema, modelo LUCA-222) a 40 °C e 120 rpm por 30 min. O sobrenadante foi filtrado e o material sólido submetido a uma segunda extração com 200 mL de solvente. A seguir juntaram-se os sobrenadantes, centrifugando-os por 20 min a 5000 rpm e 0 °C em uma centrífuga (Hettich[®], modelo Rotina 420R), filtrando-se em seguida. O sobrenadante foi concentrado em evaporador rotatório (Tecnal Brasil, modelo TE-211) até um volume de aproximadamente 50 mL. A amostra resultante foi ainda liofilizada em um liofilizador Liotop (Liobras, modelo L101) para posterior armazenamento na forma sólida antes de ser avaliada por CLAE.

Os extratos foram submetidos à extração em fase sólida (EFS), empregando-se cartucho de fase reversa C_{18} e a metodologia de Ramirez-Coronel et al. (2004). Pesaram-se 15 mg de extrato, adicionando-se 4 mL de ácido acético (2,5% v/v), e a seguir colocou-se a amostra em ultrassom por 10 min.

Primeiramente efetuou-se o condicionamento do cartucho com 4 mL de metanol, seguido de 5 mL de ácido acético; a amostra foi introduzida no cartucho e eluída, a seguir foram adicionados 8 mL de ácido acético (2,5% v/v) para remover os açúcares. Os polifenóis foram eluídos com 4 mL de acetona/água (6:4) contendo 2,5% de ácido acético. A fração de polifenóis foi coletada e evaporada. Finalmente, a amostra foi solubilizada em 1,5 mL de metanol/água (7:3) e filtrada utilizando-se membranas de nylon para posteriormente ser analisada por CLAE-UV/DAD.

4.3.3 Análise por CLAE-UV/DAD

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico) modelo LC-10AD (Shimadzu), acoplado a um detector ultravioleta em arranjo de fotodiodos, modelo SPD-M10A (Shimadzu), com sistema de aquisição e tratamento de dados LCsolution (Shimadzu). Foi utilizada coluna tipo octadecil silano (C₁₈) modelo LUNA (Phenomenex[®]) de 250 mm x 4,6 mm d.i., com partículas de tamanho médio de 5 µm.

O método para a identificação dos principais compostos fenólicos em resíduos de café baseou-se na metodologia exposta por Murthy e Naidu (2012) com modificações. O sistema de eluição consistiu em ACN/H₂O (5:95 v/v) (solvente A) e ACN/H₂O (80:20 v/v) (solvente B), sendo as duas fases acidificadas com 0,035% e 0,025% de ácido trifluoroacético (TFA), respectivamente. Foi utilizada eluição por gradiente, incrementando o solvente B de 0 a 20% em 20 min, e atingindo 50% de B em 50 min. A detecção foi realizada em $\lambda = 230$ e 330 nm.

4.3.4 Parâmetros analíticos avaliados

4.3.4.1 Construção das curvas analíticas e linearidade

Solução estoque contendo a mistura de ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina, cada padrão na concentração de 500,0 µg mL⁻¹, foi preparada e solubilizada em MeOH/H₂O (7:3 v/v). A solução estoque foi armazenada em *vial* âmbar e mantida em geladeira a 5 °C.

As soluções-padrão cobrindo intervalos lineares com nove níveis de concentração (1; 2; 5; 10; 25; 50; 75; 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram feitas a partir de diluições da solução estoque e o volume final das soluções ajustados para 5 mL.

As soluções-padrão foram injetadas em triplicata no CLAE-UV/DAD e a resposta de absorção obtida em $\lambda = 330 \text{ nm}$. As curvas analíticas foram construídas usando as áreas dos picos *versus* a concentração. Todos os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio das injeções.

4.3.4.2 Precisão

A repetibilidade (precisão intra-corrida) foi avaliada em um mesmo dia, com o mesmo equipamento, mediante análises em triplicata dos padrões com diferentes níveis de concentração, contemplando o intervalo linear do método: 10, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (nível baixo, médio e alto da curva analítica).

A precisão intermediária (precisão inter-corridas) foi avaliada em dois dias diferentes, com o mesmo equipamento, mediante análises em triplicata de três níveis de concentração dos padrões: 10, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A precisão foi determinada em termos dos coeficientes de variação (CV), segundo a Equação 8:

$$\text{CV (\%)} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100 \quad (8)$$

Em que:

Concentração média determinada = média aritmética das respostas

4.3.4.3 Exatidão

A exatidão foi obtida pelo teste de recuperação. O teste foi realizado adicionando padrões em diferentes concentrações em uma amostra branco, resultando nas concentrações 10, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A adição foi feita antes da extração em fase sólida. Foram realizadas 9 determinações, ou seja, cada concentração foi avaliada em triplicata.

A porcentagem de recuperação foi obtida pela Equação 9:

$$\% \text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração fortificada}} \times 100 \quad (9)$$

Em que:

Concentração fortificada = concentração da amostra branco adicionada do padrão

4.3.4.4 Análise quantitativa dos compostos majoritários presentes nos extratos dos resíduos de café

As análises quantitativas para determinação dos principais compostos fenólicos nos extratos de resíduos de café foram realizadas através do método do padrão externo, utilizando-se as curvas analíticas construídas com os três padrões, ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina. A quantidade de cada metabólito foi obtida analisando-se as triplicatas dos cromatogramas dos extratos de cada resíduo, obtidos em $\lambda=330$ nm. Os valores de área de cada pico identificado através dos espectros UV/DAD, foram interpolados nas curvas analíticas, para obtenção do valor correspondente de concentração de cada composto usando regressão linear.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levando em consideração os principais compostos reportados em extratos de resíduos de café (RAMIREZ-CORONEL et al., 2004; RAMIREZ-MARTINEZ, 1988; MURTHY; NAIDU, 2012), realizou-se inicialmente uma corrida exploratória com uma mistura de sete padrões analíticos (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido gálico, rutina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e quercetina), para determinar o método com adequada resolução dos picos e assim usá-lo nas análises seguintes.

A fase móvel composta de acetonitrila gera picos mais estreitos e mais separados, com um número maior de pratos teóricos devido a sua baixa viscosidade (0,37 cP) quando comparada ao metanol (0,6 cP) (NOLLET, 2000; ZERAIK, 2010). O pH desempenha um papel crucial na determinação da retenção e da seletividade, e em controlar a reprodutibilidade e a robustez de um método de separação de compostos fenólicos por CLAE. Uma alteração no pH que ocasiona o aumento da ionização de uma amostra, poderia reduzir a retenção em uma separação em fase reversa (NOLLET, 2000). Assim, pequenas quantidades de ácido trifluoroacético, como as usadas nestas análises, suprimem a ionização dos compostos fenólicos e/ou dos grupos carboxílicos, melhorando a resolução e a reprodutibilidade nas análises sucessivas. Além disso, a presença de ácido na fase móvel elimina a cauda dos picos que se origina pela interação com os sítios residuais da sílica (NOLLET, 2000; ZERAIK, 2010).

Foi necessário otimizar o gradiente de eluição cromatográfica, realizando várias corridas com variação do tempo e a porcentagem do solvente B. Em todas as análises o fluxo foi de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, o volume injetado foi de $10 \text{ }\mu\text{L}$ e a detecção monitorada na região do UV, principalmente em 230 e 330 nm. Assim, o sistema de eluição utilizado (ACN/ H_2O) apresenta-se na Tabela 29.

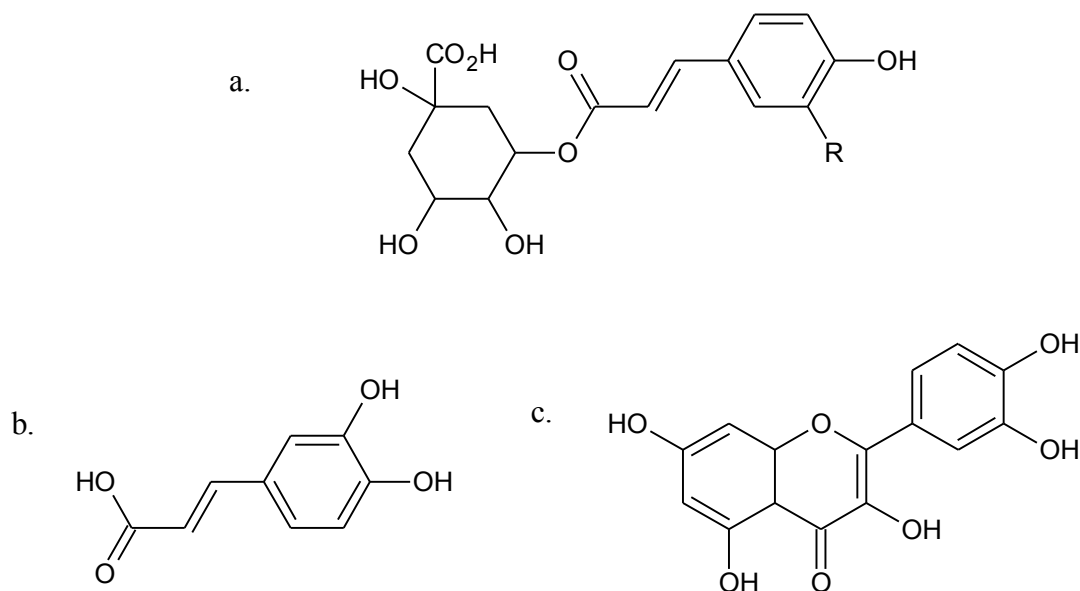
Tabela 29 – Gradiente de eluição usado na separação dos compostos fenólicos

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	%B
ACN/ H_2O (5:95)	ACN/ H_2O (8:2)	0	0
		30	20
		50	50
		55	0
		65	0

Os padrões presentes nos extratos estudados foram verificados com o auxílio dos espectros de UV, após estabelecido o método cromatográfico.

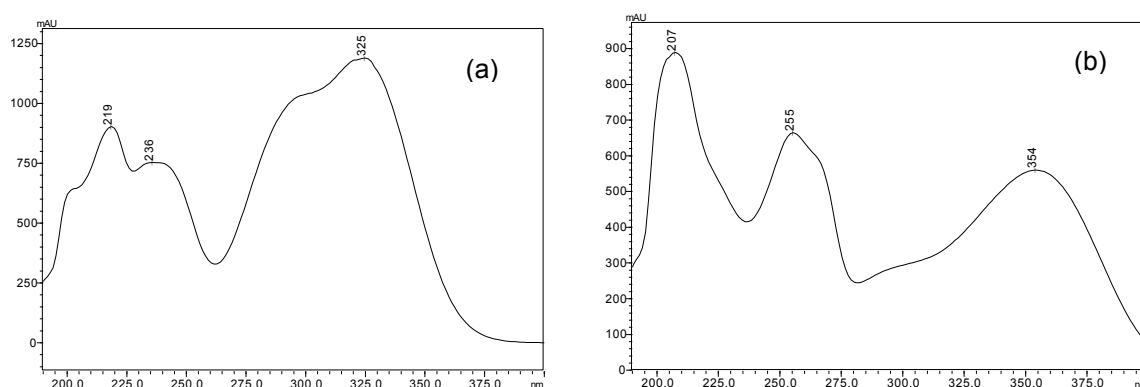
Ao injetar os extratos sob a condição de eluição descrita na Tabela 29, foram facilmente identificados, com base nos seus espectros de absorção na região do UV e pela comparação dos tempos de retenção com os dos padrões comerciais, três compostos: ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina. Estes compostos estiveram presentes nos extratos da casca de café Robusta e da polpa de café, e suas estruturas são mostradas na Figura 13.

Figura 13 – Estruturas dos compostos identificados por UV/DAD nos resíduos de café: a) ácido clorogênico; b) ácido cafeico; c) rutina



O ácido clorogênico ($t_r = 21,16$ min) e o ácido cafeico ($t_r = 24,93$ min) apresentaram duas bandas de máximo de absorção intensas nas regiões de 219 e 325 nm e dois ombros nas regiões 245 e 295 nm (NOLLET, 2000; ROHR, MEIER, STICHER, 2000) (Figura 14a). A rutina ($t_r = 35,04$ min) apresentou as duas bandas de absorção características deste flavonol, a primeira com um máximo de absorção em 255 nm, e a segunda em torno de 354 nm (RODRIGUES, 2007) (Figura 14b).

Figura 14 - Espectros UV/DAD dos ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico (a) e a rutina (b)



Sendo assim, não foi necessário construir as curvas de calibração para os sete padrões propostos inicialmente, pois os extratos da casca Robusta e da polpa de café somente apresentaram três deles. Nos extratos da borra de café não foi possível identificar nenhum dos padrões disponíveis.

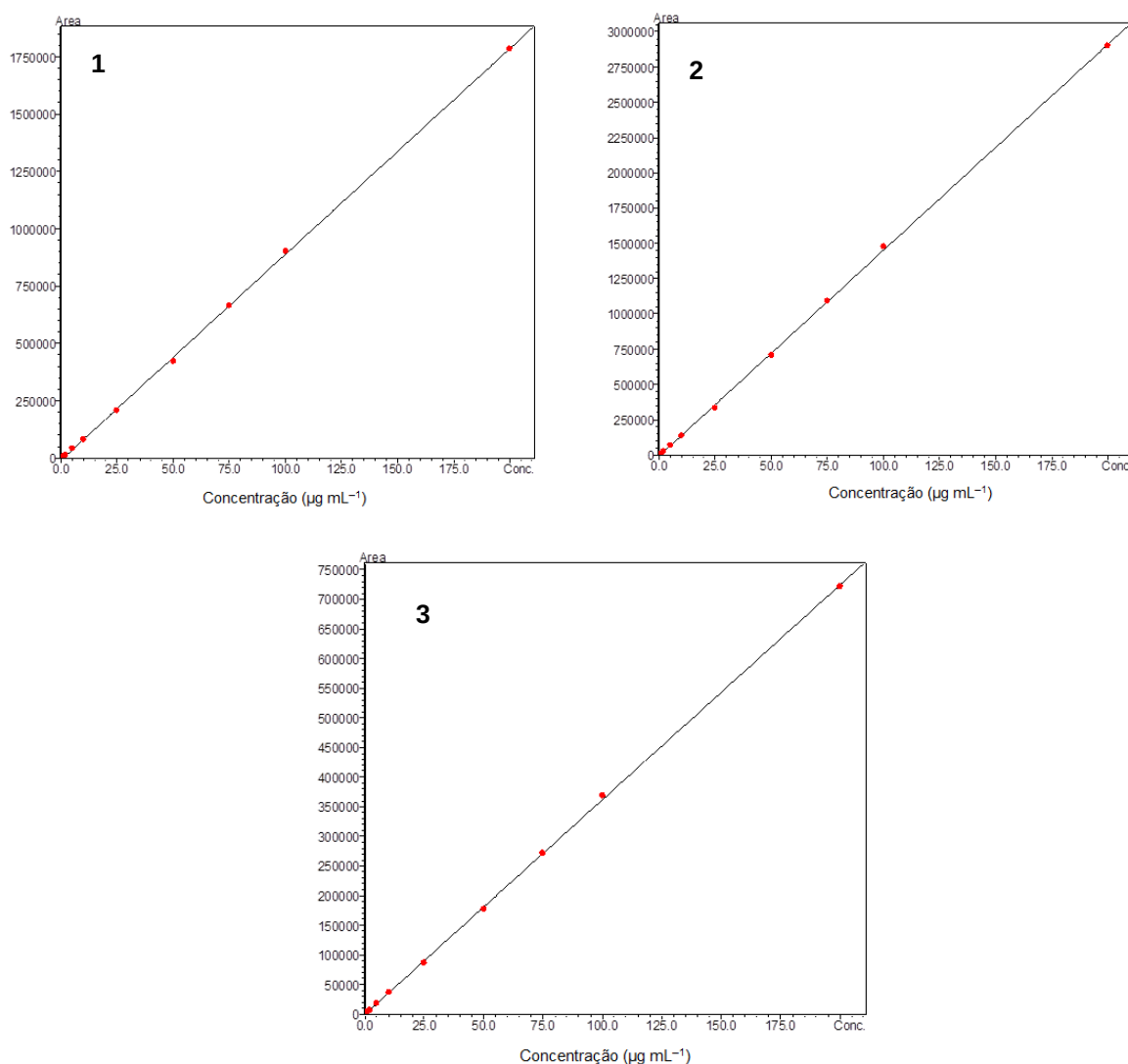
4.4.1 Construção das curvas analíticas e linearidade

Para a avaliação da linearidade, as equações das retas foram obtidas através de estudos de regressão linear, entre a concentração de cada padrão e suas respectivas respostas, obtendo-se coeficientes de determinação com valores superiores a 0,99 (Tabela 30), o que se caracteriza linear e adequado para tal uso. A Figura 15 mostra as curvas analíticas construídas para os três padrões.

Tabela 30 – Parâmetros referentes às curvas analíticas dos padrões

Padrão	Equação da reta ($y = a + bx$)	Coefficiente de determinação
Ácido clorogênico	$y = 8968,21 x - 8563,07$	0,999
Ácido cafeico	$y = 14595,22 x - 7786,38$	0,999
Rutina	$y = 3621,85 x - 357,98$	0,999

Figura 15 - Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata de soluções padrões de: **1** ácido clorogênico, **2** ácido cafeico, **3** rutina



A partir dos resultados obtidos, conclui-se que as curvas analíticas podem ser utilizadas para quantificação dos valores de ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina nos extratos, visto que os coeficientes de determinação foram maiores que 0,99, atestando a qualidade das curvas analíticas obtidas, pela baixa dispersão do conjunto de pontos experimentais.

4.4.2 Precisão

A precisão e a exatidão são dois dos parâmetros principais a serem avaliados, pois determinam a aceitação do método.

A precisão representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (RIBANI et al., 2004). A precisão pode ser avaliada em três níveis: o estudo da repetibilidade ou estudo intra-dia, a precisão intermediária e a reprodutibilidade (HARTMANN et al., 1998). Nesta pesquisa, a precisão foi avaliada mediante a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade foi verificada mediante nove determinações em um mesmo dia, injetando os padrões em três concentrações diferentes, cada um em triplicata. A precisão intermediária foi avaliada verificando a concordância entre os resultados obtidos em dois dias diferentes, porém com os mesmos equipamento e analista, e os resultados foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR) (Tabela 31).

Tabela 31 – Resultados dos ensaios de precisão para os padrões

Padrão	Concentração final	Repetibilidade (mesmo dia, n=9) DPR (%)	Precisão intermediária (2 dias diferentes) DPR (%)
Ácido clorogênico	10	3,39	2,62
	100	0,42	2,31
	200	0,39	1,93
Ácido cafeico	10	1,15	2,09
	100	0,31	2,27
	200	0,31	1,99
Rutina	10	2,38	2,02
	100	0,36	2,28
	200	0,33	1,76

Todos os valores de DPR na repetibilidade e precisão intermediária foram abaixo de 5%, que é o valor máximo estabelecido pela ANVISA (BRASIL, 2003) e, portanto, o método foi considerado preciso.

4.4.3 Exatidão

A recuperação (ou fator de recuperação) R é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, adicionada na porção analítica do material-teste, que é extraída e que pode de ser quantificada (RIBANI et al., 2004).

Utilizou-se o método de fortificação, em que o padrão é adicionado a uma matriz isenta da substância; neste caso usou-se um dos extratos da borra de café que não apresentaram

nenhum dos padrões analisados. Os resultados percentuais de exatidão do método obtidos estão dispostos na Tabela 32. Os valores foram satisfatórios, pois todas as percentagens de recuperação ficaram entre 92 e 108%, estando dentro do intervalo aceitável de recuperação (70-120%), com precisão de até $\pm 20\%$ (RIBANI et al., 2004). Em vista disso, o método apresenta uma boa exatidão.

Tabela 32 – Resultados dos ensaios de exatidão para os padrões

Padrão	Concentração final	R (%)	Desvio Padrão Relativo (DPR %)
Ácido clorogênico	10	108,60	4,59
	100	92,92	0,72
	200	98,70	0,58
Ácido cafeico	10	107,11	4,78
	100	92,86	0,80
	200	96,50	0,41
Rutina	10	103,13	4,73
	100	96,82	0,77
	200	102,08	0,11

As porcentagens de recuperação maiores que 100% se devem à limitação do procedimento, pois a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra. Outros componentes da matriz podem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, e isso pode implicar, em melhor detecção, ocasionando avaliações excessivamente otimistas da recuperação (RIBANI et al., 2004).

Como a eficiência do método varia em função da concentração da substância, observa-se que a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração.

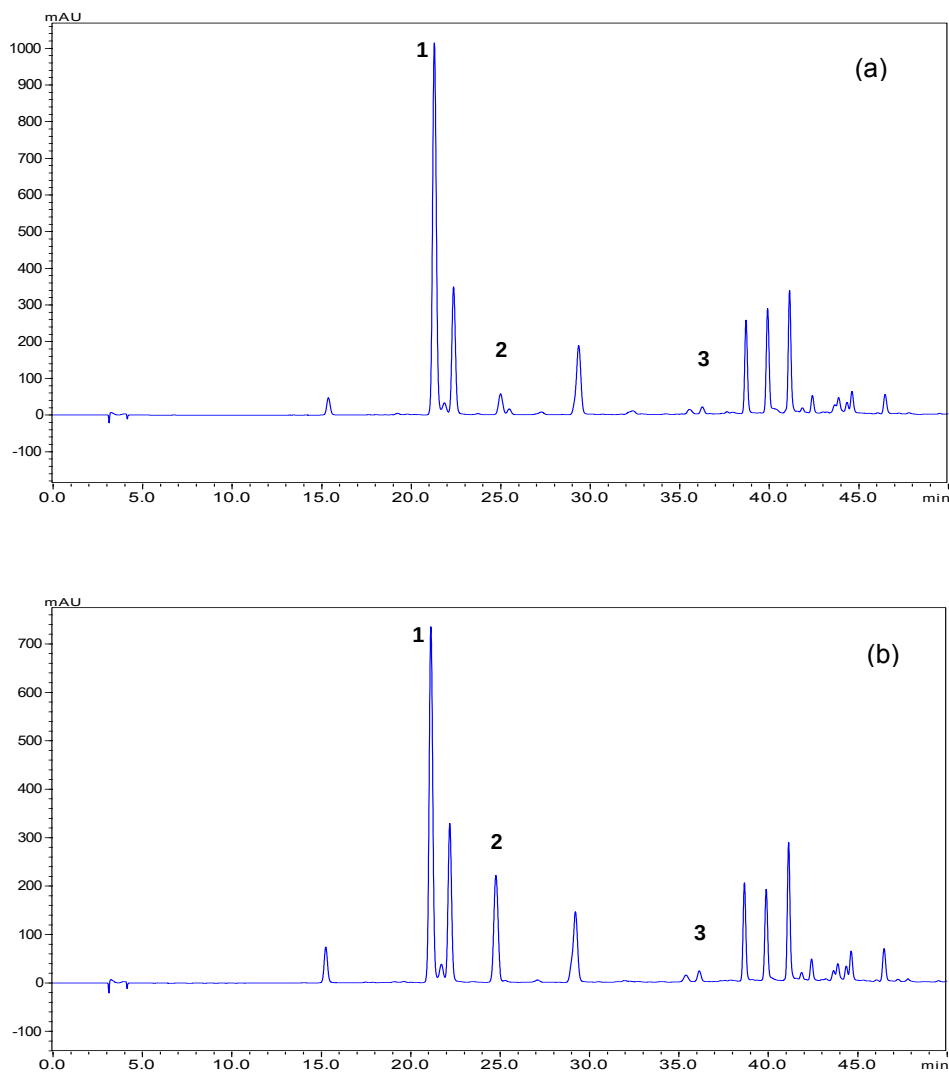
4.4.4 Análise quantitativa

Depois de realizar a extração em fase sólida de cada extrato, procedeu-se a injetá-los em triplicata para realizar a quantificação.

A quantificação de ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina nos extratos, foi realizada por meio do método de padrão externo. Utilizaram-se as curvas analíticas para determinar a correlação entre o sinal medido, neste caso a área, e a concentração da espécie a ser quantificada. Além disso, foram observados os espectros UV dos picos identificados,

comprovando assim sua identidade. Nas Figuras 16 e 17 apresentam-se os perfis dos extratos da casca Robusta e da polpa de café, nas condições cromatográficas estabelecidas.

Figura 16 - Perfil cromatográfico em $\lambda = 330$ nm dos extratos da casca Robusta (a) antes da fermentação e (b) após fermentação, submetidos a EFS em C_{18} . **1** ácido clorogênico; **2** ácido cafeico; **3** rutina. (Para condições de eluição veja Tabela 29)



O pico 1 foi identificado como ácido clorogênico, o pico 2 como o ácido cafeico, e o pico 3 como a rutina.

As quantificações foram realizadas em triplicata e a concentração de cada composto expressa em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Os dados da Tabela 33 mostram que o composto mais abundante nos extratos acetônico e etanólico da casca Robusta é o ácido clorogênico. Depois do processo de fermentação observou-se diminuição em seu conteúdo. Os teores do ácido cafeico e da rutina aumentaram

depois da fermentação em estado sólido. Pode-se observar que o solvente usado para a extração influencia o teor dos compostos fenólicos, sendo mais eficiente a extração com acetona. A diminuição no teor de ácido clorogênico após a fermentação pode ser consequência da hidrólise da molécula, causada pelas enzimas produzidas pelo fungo, o que resulta em resíduos de ácido cafeico e ácido quínico, explicando, assim, o aumento do ácido cafeico depois da fermentação. O aumento de aproximadamente 10% na concentração da rutina é um fato interessante, pois se trata de um bioflavonoide de reconhecidas propriedades biológicas, que apresenta propriedades tanto como agente sequestrador de radicais livres como quelante de metais, atuando de forma positiva como anti-inflamatório e em doenças como isquemia, anemia e artrite (AFANAS'EV et al., 1989; GUARDIA et al., 2001; KESSLER; UBEAUD; JUNG, 2003). Infere-se que o fungo possa fazer com que as moléculas de açúcares presentes na rutina sejam liberadas e o microrganismo possa aproveitá-las para seu crescimento. Desta forma, moléculas de rutina totalmente glicosiladas que não tenham sido detectadas nos extratos antes da fermentação, podem ser quantificadas ao serem liberadas das moléculas de açúcar, depois da fermentação. Uma análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas deve ser o seguinte passo para identificar a presença dos possíveis açúcares na molécula, antes do processo de fermentação, e a ausência dos mesmos, depois da fermentação.

Sendo assim, observa-se que o processo de fermentação tem um efeito positivo na liberação de compostos fenólicos, e que este resultado concorda com o estudo de Machado et al. (2012) que indica que uma cepa de *P. purpurogenum* foi capaz de crescer e liberar compostos fenólicos a partir de tegumento e borra de café.

Tabela 33 - Determinação quantitativa por CLAE-UV/DAD dos compostos fenólicos nos extratos da casca de café Robusta

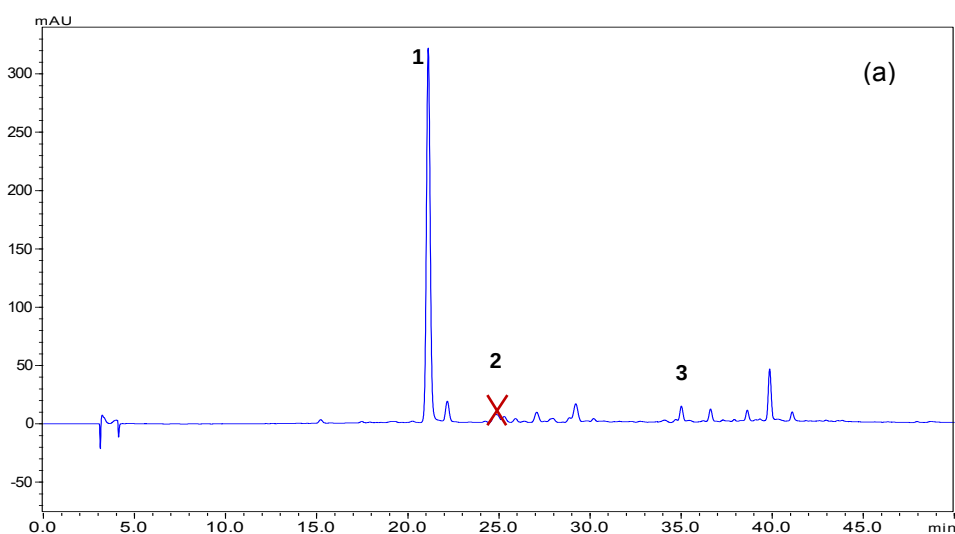
Amostra	Ácido clorogênico ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\pm$ d.p.	Ácido cafeico ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\pm$ d.p.	Rutina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\pm$ d.p.
RA	1927,63 $\pm$ 0,7	76,20 $\pm$ 2,07	74,51 $\pm$ 2,01
RAF	1325,0 $\pm$ 6,68	282,66 $\pm$ 6,25	82,62 $\pm$ 3,16
RE	1343,0 $\pm$ 5,88	65,99 $\pm$ 0,67	52,76 $\pm$ 1,31
REF	944,54 $\pm$ 4,10	231,66 $\pm$ 9,93	58,40 $\pm$ 1,18

RA: extrato acetônico da casca sem fermentar; RAF: extrato acetônico da casca após fermentação
RE: extrato etanólico da casca sem fermentar; REF: extrato etanólico da casca após fermentação

Observa-se na Figura 17 e na Tabela 34 que os extratos acetônico e etanólico provenientes da polpa de café não contêm ácido cafeico antes de serem submetidos à

fermentação em estado sólido. Este composto apresentou-se nos extratos depois da fermentação. O ácido clorogênico e a rutina presentes nos extratos da polpa de café, diminuíram depois do processo de fermentação. A extração com acetona foi mais eficiente na recuperação dos compostos fenólicos presentes. A diminuição do ácido clorogênico e o aumento do ácido cafeico depois da fermentação atribui-se da mesma forma que no caso da casca Robusta, a uma hidrólise catalisada pelas enzimas produzidas pelo fungo *P. purpurogenum*. Sugere-se que a diminuição da rutina pode ser causada por uma biotransformação, e que depois de serem liberadas as moléculas de açúcares presentes na rutina, o microrganismo continua a aproveitá-las para seu crescimento, e consegue ainda uma modificação na molécula. Porém, fazem-se necessárias análises adicionais para confirmar essa hipótese.

Figura 17 - Perfil cromatográfico em $\lambda = 330$ nm dos extratos da polpa de café (a) antes da fermentação e (b) após fermentação, submetidos a EFS em C_{18} . **1** ácido clorogênico; **2** ácido cafeico; **3** rutina. (Para condições de eluição veja Tabela 29)



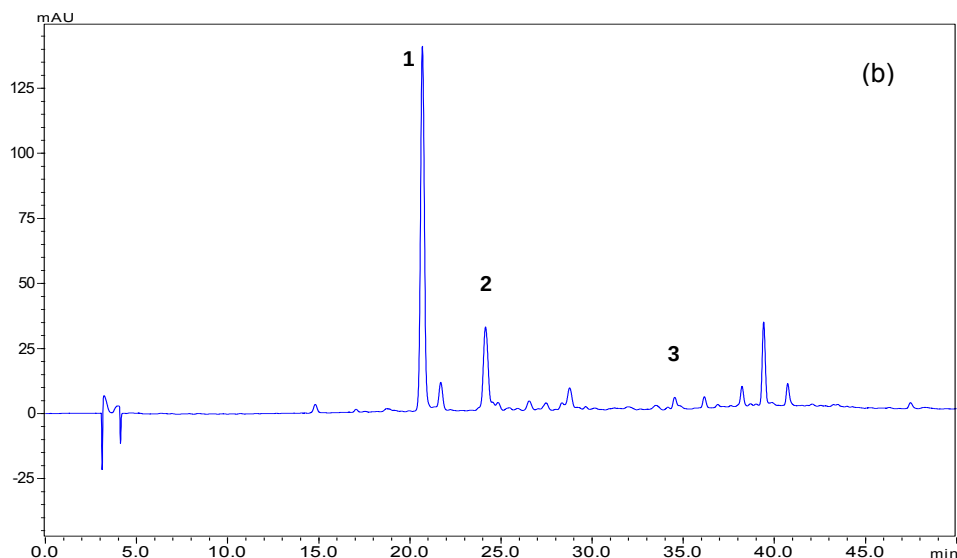


Tabela 34 - Determinação quantitativa por CLAE-UV/DAD dos compostos fenólicos nos extratos da polpa de café

Amostra	Ácido clorogênico ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\pm$ d.p.	Ácido cafeico ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\pm$ d.p.	Rutina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\pm$ d.p.
PA	516,83 $\pm$ 1,50	-	45,16 $\pm$ 2,75
PAF	228,28 $\pm$ 1,61	42,92 $\pm$ 2,44	19,48 $\pm$ 2,72
PE	428,22 $\pm$ 1,12	-	44,73 $\pm$ 3,26
PEF	201,22 $\pm$ 1,55	20,42 $\pm$ 0,20	14,30 $\pm$ 2,01

PA: extrato acetônico da polpa sem fermentar; PAF: extrato acetônico da polpa após fermentação
PE: extrato etanólico da polpa sem fermentar; PEF: extrato etanólico da polpa após fermentação

Os resultados anteriores mostraram que após a fermentação houve aumento da concentração do bioflavonoide rutina na casca de café, e diminuição do mesmo na polpa de café. Esse fato pode ser explicado levando em consideração a concentração inicial de açúcares redutores presentes nos resíduos (Tabela 3). A Tabela 3 mostrou maior conteúdo de açúcares na polpa de café que na casca Robusta. Infere-se que esse maior teor de açúcares presentes na polpa permite ao fungo fazer um processo de consumo-liberação-biotransformação, o que pode consistir de consumo inicial dos açúcares presentes no resíduo, posterior liberação dos açúcares da molécula de rutina e, ainda, biotransformação da rutina em outra molécula. O menor conteúdo de açúcares presentes na casca Robusta não permite que o mesmo processo seja completado, assim, somente as etapas consumo e liberação são executadas.

4.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

O método desenvolvido mediante CLAE-UV/DAD mostrou-se adequado e confiável para a análise quantitativa dos compostos fenólicos presentes na polpa e na casca de café. Os parâmetros analíticos avaliados mostraram que o método possui boa linearidade na faixa escolhida, exatidão e precisão dentro dos limites aceitos.

Na casca e na polpa de café, foram identificados e quantificados três compostos fenólicos, o ácido clorogênico, o ácido cafeico e a rutina, verificando-se quantidades significativas deles.

O ácido clorogênico é o composto mais abundante nos dois resíduos, o qual diminui após a fermentação, resultando em aumento do teor do ácido cafeico.

Infere-se que o teor inicial de açúcares redutores nos resíduos de café influencie a concentração do bioflavonoide rutina durante e após a fermentação.

Na borra de café, não foram identificados nenhum dos padrões disponíveis para a análise de CLAE-UV/DAD.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANAS'EV, I. B. et al. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 3, n. 11, p. 1763–1769, 1989.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 02 jun. 2003. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/733b4100474586a1900fd43fbc4c6735/Consolidado+de+normas+COBIO.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 19 maio 2014.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 4a. ed. Campinas, SP: Unicamp, 1990. p. 279.

DE ALMEIDA-FRANCISCO, A. **Estudo da Lamotrigina em doentes epiléticos submetidos a monitorização vídeo-electroencefalográfica**, 2008. Tese (Doutorado). Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.

GUARDIA, T. et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **II Farmaco**, Pavia, v. 56, n. 9, p. 683–687, 2001.

HARTMANN, C. et al. Validation of bioanalytical chromatographic methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 193–218, 1998.

KESSLER, M.; UBEAUD, G.; JUNG, L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 55, n. 1, p. 131–42, 2003.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 2, p. 2328–2375, 2013.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas, SP: Átomo, 2009a. p. 382

LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas : finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, São Carlos, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009b.

MACHADO, E. M. S. et al. Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 60, p. 87–90, 2012.

MCNAIR, H. M.; GALHIANE, M. S.; LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). **Revista de Química Industrial**, Rio de Janeiro, v. 54, n. 643, p. 21–26, 1985.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Recovery of phenolic antioxidants and functional compounds from coffee industry by-products. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 5, n. 3, p. 897–903, 2012.

NOLLET, L. HPLC Analysis of Phenolics Compounds. In: _____. **Food Analysis by HPLC**. New York: Marcel Dekker, Inc, 2000. p. 775–824.

RAMIREZ-CORONEL, M. A. et al. Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by Thiolytic-High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 5, p. 1344–1349, 2004.

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.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RODRIGUES, C. M. **Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais**. 2007. 197f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2007.

ROHR, G. E.; MEIER, B.; STICHER, O. Evaluation of different detection modes for the analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus spp.* Part I. Diode array and electrochemical detection. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 11, n. 2, p. 106–112, 2000.

ZERAIK, M. L. **Estudo analítico dos flavonoides dos frutos do maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener)**. 2010. 189f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2010.

CAPÍTULO 5 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

5.1 INTRODUÇÃO

Têm sido descritos numerosos métodos de mensuração da capacidade antioxidante de substâncias e alimentos, mas todos eles têm em comum a presença de um agente oxidante, um substrato adequado e uma estratégia de medida do ponto final. De forma geral os métodos que determinam a capacidade antioxidante são classificados em dois grandes grupos: o primeiro se baseia na captura de radicais livres, e o segundo, na determinação da oxidação de uma molécula alvo (LIMA, 2008).

Levando em consideração o mecanismo químico, as definições de antioxidante estão geralmente focadas na habilidade de uma molécula ser doadora de hidrogênio ou doadora de elétrons. Assim, a maioria dos ensaios citados para avaliar a capacidade antioxidante pode ser amplamente classificada como ensaios de transferência de hidrogênio ou ensaios baseados na reação de transferência de um único elétron. Estes ensaios medem a capacidade sequestradora de radicais ou a habilidade redutora, respectivamente, mas não medem a ação preventiva antioxidante da amostra (MACDONALD-WICKS; WOOD; GARG, 2006).

Ainda, segundo os mesmos autores, atividade antioxidante e capacidade antioxidante são termos frequentemente usados como sinônimos, mas deve-se reconhecer que eles têm significados diferentes. Atividade refere-se à constante de velocidade de uma reação entre um antioxidante e um oxidante específicos. Capacidade é uma medida da quantidade (em moles) de um radical livre eliminado por uma amostra.

Na escolha de qualquer método, deve-se levar em consideração que o método tenha sido usado por um período de tempo suficiente e em um amplo número de laboratórios diferentes, e desse modo os pontos fortes e fracos tenham se tornado evidentes e as questões tenham sido resolvidas. Um método padronizado para a avaliação da capacidade antioxidante deve atender os seguintes requisitos ideais: (1) medir quimicamente o que realmente ocorre; (2) utilizar uma fonte radicalar biologicamente relevante; (3) ser simples; (4) ter ponto final e mecanismo químico definidos; (5) ter instrumentação facilmente disponível; (6) ter reprodutibilidade intra-ensaio e entre-dia; (7) ser adaptável para testar antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos e usar diferentes fontes radicalares; (8) ser adaptável a análises rotineiras de controle de qualidade (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

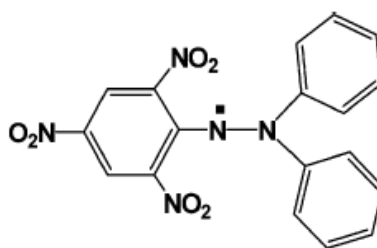
5.1.1 Método do radical DPPH[•]

O radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) (Figura 18), que possui uma cor púrpura, é um dos poucos radicais orgânicos nitrogenados estáveis. O ensaio consiste em determinar a habilidade redutora dos antioxidantes diante do DPPH[•]. Essa habilidade pode ser avaliada via ressonância do *spin* eletrônico, ou pela medida da diminuição da absorbância (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

O radical livre DPPH[•] apresenta um máximo de absorbância a 515 nm. Após a adição do antioxidante, produz-se a diminuição da absorbância, proporcional à concentração e à capacidade antioxidante da amostra (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

O teste é simples e rápido, e é necessário apenas um espectrofotômetro UV-Vis para executá-lo, o que explica sua ampla utilização. No entanto, a interpretação é complicada quando a amostra contém compostos como os carotenoides, cujos espectros se sobrepõem em 515 nm (NORUMA; KIKUCHI; KAWAKAMI, 1997). A cor do DPPH[•] pode diminuir como consequência da inibição dos radicais livres (mecanismo HAT) ou pelo mecanismo de redução (SET), e o impedimento estérico é um fator determinante na reação. Assim, moléculas pequenas com maior acesso ao sítio radical apresentam maior capacidade antioxidante com este teste (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Figura 18 – Estrutura química do radical DPPH[•]



5.1.2 Método para avaliar a ação redutora do radical peroxila

Entre as metodologias de avaliação da capacidade antioxidante, existem várias que empregam um composto de referência cujo consumo é inibido por uma substância capaz de sequestrar os radicais livres. Como substâncias de referência ou sondas, têm sido utilizados pigmentos proteicos (C-ficocianina, r-ficoeritrina), fluoresceína e piranina, cuja descoloração

pode ser facilmente acompanhado por determinações de absorbância e/ou fluorescência (PINO; CAMPOS; LISSI, 2003; CAMPOS et al., 2004; PÉREZ-CRUZ, 2014).

Pino, Campos e Lissi (2003) desenvolveram uma metodologia que utiliza o branqueamento da piranina pelos radicais peroxila gerados a partir da termólise do dicloridrato de 2,2'-azobis(2-metilpropanimidamida) (AAPH). Segundo os autores, a piranina cumpre os requisitos para ser uma substância de referência ideal: (1) é solúvel em água e reativa frente a radicais peroxila; (2) é consumida na reação com os radicais e o consumo conduz ao branqueamento que pode ser monitorado espectroscopicamente; (3) absorve luz e/ou emite em comprimentos de onda de fluorescência compatíveis com a utilização de azo-compostos; (4) tem apenas um centro reativo. Por sua parte o AAPH é a fonte mais amplamente utilizada de radicais peroxila em solução aquosa.

A piranina reage rapidamente com os radicais peroxila gerados na pirólise aeróbia do AAPH. No processo, pode ser monitorada a diminuição da absorbância da piranina (460 nm) ou a fluorescência (excitação: 460 nm; emissão: 510 nm). O processo de descoloração é totalmente evitado pela adição de Trolox (PINO; CAMPOS; LISSI, 2003).

5.2 OBJETIVOS

- Detectar e quantificar a capacidade redutora de radicais dos extratos dos resíduos de café, usando o método modificado do reagente DPPH[•] proposto por Brand-Williams e outros (1995).
- Avaliar a ação redutora dos extratos de café sobre radicais peroxila, utilizando a sonda piranina e o AAPH como oxidante.
- Comparar a capacidade antioxidante dos resíduos de café antes e depois de serem submetidos à fermentação em estado sólido.

5.3 PARTE EXPERIMENTAL

5.3.1 Reagentes e padrões analíticos

Solventes e reagentes: etanol e metanol grau HPLC (J.T.Baker, EUA). 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), dimetilsulfóxido (DMSO) grau espectrofotométrico, dicloridrato de 2, 2'-azobis(2-metilpropanimidamida) (AAPH) 97%, sal trissódico do ácido-8-hidroxipireno-1,3,6-trissulfônico (piranina) foram fornecido pela Sigma (St. Louis, EUA).

Padrões: rutina 97,0 – 102,0% foi adquirida da Acros Organics (New Jersey, USA), quercetina $\geq 95\%$ da Sigma (St. Louis, EUA) e o ácido gálico foi fornecido pela Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

A solução do tampão fosfato salino (PBS) a pH 7,4 foi preparada com a adição de 8,0 g de NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 e 0,24 g KH_2PO_4 em 1,0 L de água.

5.3.2 Preparo de amostras (soluções estoque)

Levando em consideração os resultados obtidos por CLAE, as amostras utilizadas para a avaliação da capacidade antioxidante foram os extratos acetônicos.

Os extratos secos obtidos como mencionado no item 4.3.2 do Capítulo 4 foram ressuspendidos em DMSO, na concentração final de $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e armazenados em geladeira a 5°C .

5.3.3 Teste da capacidade redutora de radicais dos extratos (método do DPPH')

Alíquotas das soluções estoque dos extratos foram diluídas em etanol nas concentrações de $10 \text{ }\mu\text{g/mL}$ a $200 \text{ }\mu\text{g/mL}$. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada segundo o método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações. Na placa de 96 poços adicionou-se $35 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra e $215 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de DPPH ($8,6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$). A placa foi incubada no escuro e à temperatura ambiente por 30 minutos, a seguir foi realizada a medida da absorbância no UV-Vis na Leitora de Microplacas Multidetecção Synergy HT

(BioTek), a $\lambda=515$ nm. Foram realizadas medidas das soluções de diferentes concentrações de cada extrato, todas em triplicata. O mesmo procedimento foi realizado com as soluções etanólicas dos padrões rutina e quercetina, na faixa de concentração de 0,4 a 8,0 $\mu\text{g/mL}$, para posterior comparação da capacidade antioxidante. O controle conteve todos os reagentes, exceto o extrato fenólico. A capacidade sequestradora do radical DPPH $^{\bullet}$ foi calculada com a seguinte equação:

$$\% \text{ de DPPH}^{\bullet} \text{ sequestrado} = \left(\frac{A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{branco}}} \right) \times 100 \quad (10)$$

Onde A_{branco} é a absorbância do controle e A_{amostra} a absorbância em presença do extrato fenólico.

Foi calculado o parâmetro CE_{50} (concentração efetiva média) que representa a concentração de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH $^{\bullet}$. O CE_{50} foi obtido através do gráfico %DPPH $^{\bullet}$ reduzido *versus* concentração.

5.3.4 Ação redutora sobre radicais peroxila

A ação redutora dos extratos sobre radicais peroxila foi avaliada segundo o método de Pino, Campos e Lissi (2003) com modificações. Este se baseia no decaimento da fluorescência da piranina quando submetida à oxidação por radicais peroxila.

A partir das soluções estoque dos extratos foram preparadas diferentes diluições etanólicas com concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 40 $\mu\text{g/mL}$. Um volume de 150 μL da solução do composto fluorescente piranina (5 μM) foi incubado em placa preta de leitura de fluorescência, com 125 μL da solução de AAPH (40 μM) em PBS a 37 $^{\circ}\text{C}$, na ausência ou presença de 25 μL das soluções dos extratos. O decaimento da fluorescência da piranina foi monitorado utilizando os comprimentos de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 528 nm, em uma Leitora de Microplacas Multidetecção Synergy HT (BioTek). A capacidade antioxidante foi avaliada em função do tempo de atraso no decaimento da fluorescência da piranina provocado pela presença dos extratos. A leitura foi realizada para cada concentração em triplicata, e o controle da leitora foi feito com o software de análises de dados Gen5. O mesmo procedimento foi realizado com as soluções etanólicas do padrão ácido gálico, na

faixa de concentração de 0,5 a 50 µg/mL. Foram avaliados dois controles, o controle branco que conteve piranina, etanol e PBS, e o controle positivo contendo piranina, etanol e AAPH.

A porcentagem do radical peroxila sequestrado foi calculada com a seguinte equação:

$$\% \text{ Radical peroxila sequestrado} = \left(\frac{\text{Área}_{\text{amostra}} - \text{Área}_{\text{controle positivo}}}{\text{Área}_{\text{controle branco}} - \text{Área}_{\text{controle positivo}}} \right) \times 100 \quad (11)$$

O CE₅₀ foi obtido através do gráfico de %Radical peroxila sequestrado *versus* concentração.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Análise da capacidade redutora de radicais DPPH[•]

Através das leituras de absorbância para cada amostra, os valores de %DPPH[•] reduzidos foram calculados (Tabela 35) para obtenção dos valores de CE₅₀. Vários testes foram realizados a fim de avaliar o intervalo de concentração adequado para cada extrato atingir o valor de CE₅₀. Para esta avaliação considerou-se que concentrações maiores do que 100,0 µg mL⁻¹ nos extratos indicam baixa capacidade antioxidante. Assim, o extrato da borra de café antes do processo de fermentação não atingiu o valor CE₅₀ porque a maior concentração avaliada (400,0 µg mL⁻¹) foi considerada muito alta para atribuir-lhe uma capacidade antioxidante.

Tabela 35 - Porcentagem de DPPH[•] reduzido pelas amostras e padrões

Amostras	Concentração (µg mL ⁻¹)	%DPPH [•] reduzido
RA	10,0 – 60,0	23,1 – 78,0
RAF	10,0 – 80,0	34,8 – 82,6
PA	20,0 – 100,0	25,8 – 67,6
PAF	10,0 – 80,0	26,0 – 77,9
BA	40,0 – 400,0	15,1 – 28,6
BAF	20,0 – 120,0	24,4 – 71,6
Quercetina (padrão)	0,4 – 8,0	6,5 – 85,3
Rutina (padrão)	0,4 – 8,0	6,0 – 62,8

RA: extrato acetônico da casca sem fermentar; RAF: extrato acetônico da casca após fermentação
 PA: extrato acetônico da polpa sem fermentar; PAF: extrato acetônico da polpa após fermentação
 BA: extrato acetônico da borra sem fermentar; BAF: extrato acetônico da borra após fermentação

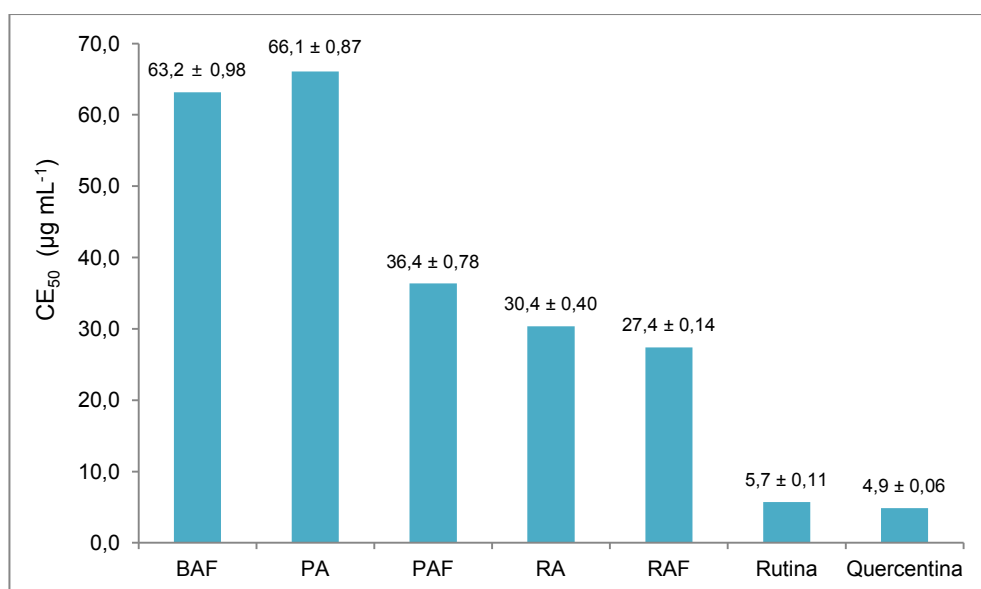
A capacidade antioxidante foi avaliada por meio do gráfico de %DPPH[•] reduzido em função da concentração dos extratos. Os valores dos CE₅₀ dos extratos foram calculados usando a equação de primeira ordem obtida do gráfico de cada amostra.

Foi obtido o valor de CE₅₀ = 30,4 ± 0,40 para o extrato da casca de café Robusta antes da fermentação, e observou-se que o CE₅₀ diminuiu depois do processo de fermentação, apresentando um valor de CE₅₀ = 27,4 ± 0,14. Quanto menor o valor de CE₅₀, maior é o consumo do radical DPPH[•] pela amostra e, por conseguinte, maior é a capacidade antioxidante. O mesmo comportamento foi observado nos extratos da polpa de café, apresentando-se maior capacidade antioxidante no extrato obtido depois do processo de

fermentação: o valor de CE_{50} diminuiu de $66,1 \pm 0,87$ antes da fermentação, até $36,4 \pm 0,78$ depois da fermentação. Por sua parte, o extrato da borra de café, que apresentou $CE_{50} > 100$ antes da fermentação, exibiu $CE_{50} = 63,2 \pm 0,98$ depois de submetido à fermentação.

Verificou-se que a capacidade antioxidante dos extratos e padrões segue a seguinte ordem: quercetina > rutina > casca Robusta após fermentação > casca Robusta antes da fermentação > polpa de café depois da fermentação > polpa de café antes da fermentação > borra de café depois da fermentação (Figura 19).

Figura 19 - Representação gráfica do CE_{50} obtido pelo método do DPPH para os extratos e os padrões



RA: extrato acetônico da casca sem fermentar; RAF: extrato acetônico da casca após fermentação
 PA: extrato acetônico da polpa sem fermentar; PAF: extrato acetônico da polpa após fermentação
 BAF: extrato acetônico da borra após fermentação

O aumento da capacidade antioxidante nos extratos depois de realizada a fermentação pode ser correlacionada com o aumento no teor de compostos fenólicos que foi demonstrado no Capítulo 3. Porém, não se pode atribuir exclusivamente aos três compostos fenólicos que foram quantificados por CLAE (Capítulo 4), pois os extratos podem apresentar, além desses, outros tipos de moléculas com capacidade antioxidante e que não foram identificadas neste estudo. Os perfis obtidos por CLAE evidenciaram a presença de outros picos nos cromatogramas, o que confirma a existência de outras moléculas.

Além disso, o aumento na concentração da rutina, que foi evidenciado quantitativamente nos extratos da casca depois da fermentação, pode explicar a maior capacidade antioxidante do extrato. Por sua vez, a possível biotransformação que pode ter

acontecido com a molécula de rutina, nos extratos da polpa de café após a fermentação, explicaria também o aumento na capacidade antioxidante, uma vez que se pode inferir que os produtos da biotransformação apresentaram maior capacidade em sequestrar o radical DPPH[•].

5.4.2 Análise da ação redutora sobre radicais peroxila

Neste ensaio avaliou-se a reatividade das moléculas antioxidantes presentes nos extratos com os radicais peroxila derivados do AAPH. Foi calculada a porcentagem de radical peroxila sequestrado e posteriormente obtidos os valores de CE₅₀. Vários testes foram realizados a fim de avaliar o intervalo de concentração adequado para cada extrato atingir o valor de CE₅₀.

Tabela 36 - Porcentagem de radical peroxila sequestrado pelas amostras e padrões

Amostras	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%Radical peroxila sequestrado
RA	1,0 – 10,0	14,5 – 70,5
RAF	1,0 – 10,0	18,3 – 72,7
PA	1,0 – 10,0	9,7 – 57,3
PAF	1,0 – 20,0	18,0 – 58,5
BA	5,0 – 40,0	7,9 – 13,5
BAF	5,0 – 40,0	15,2 – 52,5
Ácido gálico (padrão)	5,0 – 50,0	8,3 – 109,3

RA: extrato acetônico da casca sem fermentar; RAF: extrato acetônico da casca após fermentação

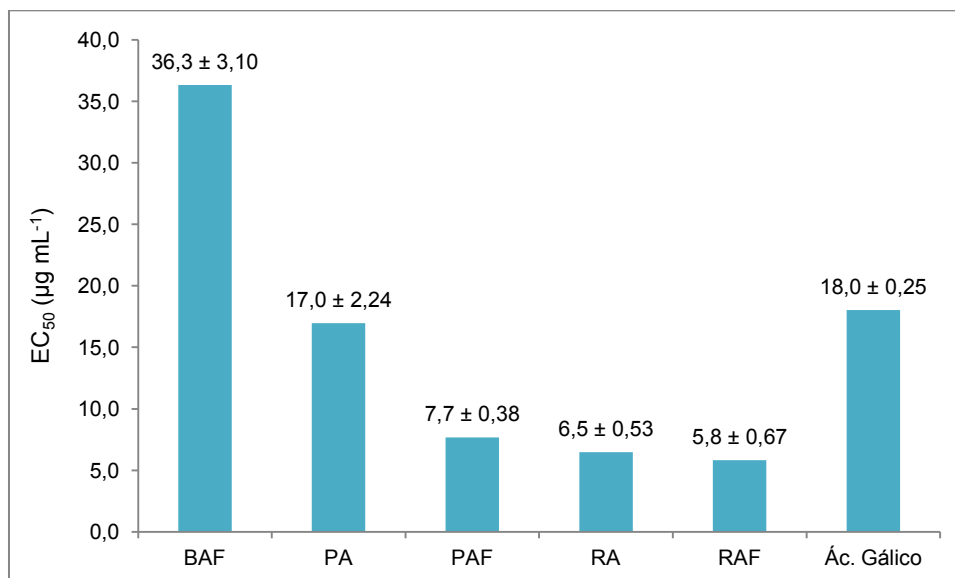
PA: extrato acetônico da polpa sem fermentar; PAF: extrato acetônico da polpa após fermentação

BA: extrato acetônico da borra sem fermentar; BAF: extrato acetônico da borra após fermentação

A capacidade antioxidante foi avaliada por meio do gráfico de %Radical peroxila sequestrado em função da concentração dos extratos. Os valores de CE₅₀ dos extratos foram calculados usando a equação de primeira ordem obtida do gráfico de cada amostra.

Segundo a Figura 20, a capacidade antioxidante dos extratos e o padrão segue a seguinte ordem: casca Robusta após fermentação > casca Robusta antes da fermentação > polpa de café depois da fermentação > polpa de café antes da fermentação > ácido gálico > borra de café após fermentação.

Figura 20 - Representação gráfica do CE_{50} obtido pelo método da piranina para os extratos e os padrões



RA: extrato acetônico da casca sem fermentar; RAF: extrato acetônico da casca após fermentação
 PA: extrato acetônico da polpa sem fermentar; PAF: extrato acetônico da polpa após fermentação
 BAF: extrato acetônico da borra após fermentação

Deve-se ressaltar que a maioria dos extratos estudados apresentou melhor capacidade antioxidante que o padrão ácido gálico, evidenciando sua efetividade em sequestrar radicais peroxila. O valor de CE_{50} nos extratos da casca Robusta não apresentou diferenças antes e após a fermentação, observando-se valores de $CE_{50} = 6,5 \pm 0,53$ antes da fermentação, e $5,8 \pm 0,67$ depois da fermentação. No caso da polpa de café, o aumento na capacidade antioxidante foi maior, pois, antes da fermentação, obteve-se $CE_{50} = 17,0 \pm 2,24$ e depois da fermentação o valor diminuiu até $CE_{50} = 7,7 \pm 0,38$. O extrato da borra de café apresentou a menor capacidade antioxidante.

Os resultados da ação redutora sobre radicais peroxila concordam com os obtidos para o radical DPPH $\cdot$: em ambos os casos o extrato com maior capacidade antioxidante foi o da casca Robusta obtido depois do processo de fermentação. Esse fato pode-se correlacionar com a quantificação feita mediante CLAE, na qual o extrato apresentou os maiores teores de ácido cafeico e rutina.

A capacidade antioxidante evidenciada pelos extratos *in natura* e pelos extratos após fermentação pode-se correlacionar também com a elevada concentração de ácido clorogênico presente neles. O ácido clorogênico faz parte do grupo de ácidos fenólicos os quais se caracterizam por terem um anel benzênico, um grupo carboxílico, e um ou mais grupos de hidroxila e/ou metoxila na molécula (Figura 13a), o que lhes confere propriedades

antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo (SOARES, 2002). A ação antioxidante do ácido clorogênico atribui-se à presença de um grupo orto-di-hidroxila no anel aromático do ácido cafeico, que atuaria como um receptor de radicais livres (LUZIA et al., 1998).

A posição e o grau de hidroxilação têm uma grande importância na capacidade antioxidante das moléculas. Tem sido estabelecida a relação entre a estrutura de vários ácidos fenólicos e sua capacidade antioxidante. Assim, a esterificação do ácido cafeico com o ácido quínico diminui sua atividade; consequentemente, o ácido clorogênico é menos ativo que o ácido cafeico (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001). Esse fato explica os resultados obtidos neste trabalho, que mostraram que os extratos antes da fermentação, embora tivessem maiores quantidades de ácido clorogênico, apresentaram menor atividade antioxidante que os extratos depois da fermentação, pois nestes últimos e através de uma possível hidrólise houve uma quebra da ligação de esterificação, dando como resultado maior quantidade de ácido cafeico.

Em ambos os métodos avaliados, os extratos mais ativos foram aqueles nos quais foi quantificada a maior concentração de ácido cafeico junto com presença da rutina. Ao avaliar a capacidade redutora, estes extratos apresentaram CE_{50} ainda menor que o CE_{50} do ácido gálico como padrão de comparação. Pode-se considerar que existe sinergia entre estes compostos fenólicos, o que se traduz em um extrato altamente ativo.

A capacidade antioxidante do ácido clorogênico tem sido demonstrada em diferentes estudos. Por exemplo, isômeros do ácido clorogênico isolados da ameixa seca demonstraram ação antioxidante quando avaliados em ensaios de eliminação de radicais superóxido e inibição contra oxidação do metil linoleato (NAKATANI et al., 2000). O ácido clorogênico, encontrado em extratos de cenoura, bardana, damasco e ameixa preta, mostrou ser um potente inibidor da peroxidação lipídica *in vitro* e evidenciou uma possível ação anticarcinogênica também *in vivo* (KASAI et al., 2000). Isômeros derivados do ácido clorogênico isolados das folhas de bambu apresentaram alta capacidade de eliminar radicais livres, radicais superóxido, além de inibirem a peroxidação lipídica (KWEON et al., 2001).

A capacidade antioxidante do ácido cafeico atribui-se a sua estrutura química, pois o maior potencial antioxidante dos ácidos cinâmicos é encontrado quando há duas hidroxilas nas posições 3 e 4 (SOARES 2002). O ácido cafeico tem se mostrado como um antioxidante eficaz em diferentes ensaios *in vitro*. Gülçin (2006) avaliou seu poder antioxidante utilizando os métodos do tiocianato férrico, do poder redutor, do sequestro dos radicais $ABTS^{\bullet+}$ e

DPPH[•], de eliminação do ânion radical superóxido, e da atividade quelante de metais, demonstrando que o ácido cafeico foi efetivo quando comparado com antioxidantes convencionais como o BHA e o BHT, e com antioxidantes naturais como o α -tocoferol.

A rutina é um bioflavonoide de reconhecidas propriedades biológicas, que apresenta as propriedades tanto como agente sequestrador de radicais livres como quelante de metais, atuando de forma positiva como anti-inflamatório e em doenças como isquemia, anemia e artrite (AFANAS'EV et al., 1989; GUARDIA et al., 2001; KESSLER et al., 2003).

Estes resultados sugerem a possibilidade de reutilizar os resíduos da indústria cafeeira para a obtenção de compostos antioxidantes, pois tais compostos têm inúmeras aplicações nas áreas de alimentos, de cosméticos e farmacêutica (AO et al., 2011; BALLESTEROS et al., 2014).

5.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

O extrato acetônico obtido a partir da casca de café Robusta foi mais ativo que o extrato proveniente da polpa de café, pois apresentou maior capacidade sequestradora do radical DPPH[•] e maior poder redutor sobre radicais peroxila.

A fermentação em estado sólido teve um efeito positivo na capacidade antioxidante dos extratos. Uma vez que, todos os extratos dos resíduos submetidos ao processo de fermentação apresentaram menor CE₅₀ que os extratos *in natura*.

O extrato mais ativo dentre os avaliados foi o obtido das cascas de café Robusta após o processo de fermentação com o fungo *P. purpurogenum*.

A capacidade antioxidante dos extratos pode-se correlacionar com o teor de compostos fenólicos que foi quantificado mediante o método de Folin-Ciocalteu, e com a quantificação destes compostos mediante CLAE. Evidentemente, ácidos fenólicos e flavonoides presentes nestes resíduos conferem atividade sequestradora e poder redutor de radicais aos extratos.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANAS'EV, I. B. et al. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 3, n. 11, p. 1763–1769, 1989.

AO, C. et al. Antioxidant phenolic compounds from *Smilax sebeana* Miq. **LWT - Food Science and Technology**, Waltham, v. 44, n. 7, p. 1681–1686, 2011.

BALLESTEROS, L. F.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. **Food and Bioprocess Technology**, New York, v. 7, n. 12, p. 3493–3503, 2014.

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

CAMPOS, A. M. et al. A pyranine based procedure for evaluation of the total antioxidant potential (TRAP) of polyphenols . A comparison with closely related Methodologies. **Biological Research**, Santiago de Chile, v. 37, p. 287–292, 2004.

GUARDIA, T. et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **II Farmaco**, Pavia, v. 56, n. 9, p. 683–687, 2001.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, Limerick, v. 217, n. 2-3, p. 213–20, 2006.

KASAI, H. et al. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in a rat carcinogenesis model. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 467–471, 2000.

KESSLER, M.; UBEAUD, G.; JUNG, L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 55, n. 1, p. 131–42, 2003.

KWEON, M. H.; HWANG, H. J.; SUNG, H. C. Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 10, p. 4646–4655, 2001.

LIMA, A. DE. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**, 2008. 182f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LUZIA, M. R. et al. Effect of 5-caffeoilquinic acid in the presence of metal chelators on soybean oil oxidative stability. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 31, p. 64–68, 1998.

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, p. 2046–2056, 2006.

NAKATANI, N. et al. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 5512–5516, 2000.

NORUMA, T. et al. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH). **Biochemistry and Molecular Biology International**, Marrickville, v. 42, n. 2, p. 361–370, 1997.

PÉREZ-CRUZ, F. R. **Estudio de la capacidad antioxidante de derivados de hidroxycumarina en sistemas homogéneos y en modelos de membrana lipídica**, 2014. 143f. Tese (Doutorado). Universidad de Chile, Santiago de Chile, 2014.

PINO, E.; CAMPOS, A. M.; LISSI, E. 8-Hydroxy-1,3,6-pyrene trisulfonic acid (pyranine) bleaching by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) derived peroxy radicals. **International Journal of Chemical Kinetics**, New York, v. 35, n. 10, p. 525–531, 2003.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 10, p. 4290–302, 2005.

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

YANISHLIEVA-MASLAROVA, N. V. Inhibiting oxidation. In: _____. **Antioxidants in Food**. First ed. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., 2001.

CAPÍTULO 6 – PERFIS QUÍMICOS DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS DO CULTIVO DE *P. PURPUROGENUM* EM CZAPEK E CDB

6.1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos representam uma rica fonte de substâncias biologicamente ativas com aplicações como agroquímicos, antibióticos, imunossupressores, antiparasitários, agentes anticancerígenos, entre outros. Historicamente, de todos os microrganismos estudados, Actinomicetos e fungos têm sido identificados como os mais prolíficos produtores de metabólitos secundários. Recentemente, tem se demonstrado o potencial de uma única cepa de apresentar uma ampla variedade de metabólitos secundários por alteração sistemática dos parâmetros de cultivo, o que se conhece como OSMAC (*one strain, many compounds*) (GUNATILAKA, 2006).

Estudos dos aspectos químicos e das propriedades biológicas dos metabólitos fúngicos têm sido alvo de crescente interesse de indústrias e pesquisadores. Especialmente a indústria farmacêutica tem se voltado ao potencial dos metabólitos fúngicos para o desenvolvimento de novos fármacos (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

Algumas das classes de fungos com maior produção de metabólitos de interesse são endófitos, fitopatogênicos, entomopatogênicos, rizosféricos, leveduriformes, de solo e isolados de organismos marinhos. Fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* são amplamente estudados, devido a sua ubiquidade e a sua formação abundante de esporos (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

A manipulação das condições de fermentação aliada à capacidade biossintética dos microrganismos podem alterar a produção quali e quantitativa dos metabólitos secundários. A biossíntese desses metabólitos é ativada quando o crescimento do microrganismo está limitado pela exaustão de um dos nutrientes essenciais (carbono, nitrogênio ou fonte de fosfatos) e/ou quando a divisão celular e a produção de biomassa ocorrem em níveis muito baixos (BARRIOS-GONZALES et al., 2005; TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

Levando em consideração que, a variedade estrutural de metabólitos biossintetizados por um microrganismo pode ser aumentada com pequenas variações do meio de cultivo, nesta parte do trabalho, objetivou-se cultivar o fungo *P. purpurogenum* em dois meios líquidos de diferentes composições e obter os perfis químicos dos extratos brutos, como um prognóstico inicial da produção de metabólitos secundários. Desta forma, pretende-se ampliar o

conhecimento deste microrganismo em meios líquidos, permitindo a perspectiva de novas pesquisas.

6.2 OBJETIVOS

- Verificar a produção de metabólitos secundários por *P. purpureogenum* em diferentes meios de cultivo líquidos.
- Cultivar o fungo *P. purpureogenum* em pequena escala nos meios líquidos Czapek e CBD (Caldo Batata Dextrose), para obtenção dos extratos brutos.
- Analisar o perfil químico dos extratos brutos por técnicas cromatográficas (CLAE-UV/DAD) e espectrométricas (RMN de ^1H).

6.3 PARTE EXPERIMENTAL

6.3.1 Materiais e reagentes

Meios de cultivo do microrganismo:

Tabela 37 – Meios de cultura utilizados para o cultivo do fungo *P. purpurogenum*

Meio de cultura	Tipo	Composição	Fabricante
Czapek	Líquido	Sacarose, NaNO ₃ , Na ₂ (PO ₄) ₃ , MgSO ₄ , KCl, FeSO ₄	HIMEDIA
CBD	Líquido	Fécula de batata, dextrosa	Acumedia

Solventes: para a obtenção dos extratos brutos foi utilizado acetato de etila (AcOEt). Nas análises de CLAE foi utilizado metanol e acetonitrila grau HPLC (J.T.Baker, EUA), ácido trifluoroacético (TFA) ≥98% da Sigma (St. Louis, EUA) e água deionizada purificada em sistema Milli-Q (Millipore®). Em análises em RMN de ¹H utilizou-se DMSO deuterado da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

6.3.2 Cultivo do fungo em diferentes meios de cultivo líquido

O fungo *P. purpurogenum* primeiramente foi cultivado em BDA (placas de Petri) durante sete dias e posteriormente incubado em dois meios líquidos diferentes (Czapek e CBD), para obtenção dos extratos brutos. O fungo foi cultivado em cinco frascos de Erlenmeyer (500 mL), totalizando 1,5 L de cada meio de cultura. Os meios líquidos foram incubados durante 28 dias a 25 °C em modo estático.

6.3.3 Obtenção do extrato bruto de *P. purpurogenum*

Após 28 dias de incubação o caldo fermentado foi separado do micélio por filtração a vácuo e submetido à partição líquido/líquido com AcOEt (3 x 0,5 L). O solvente foi evaporado fornecendo 81 mg de extrato bruto a partir do meio Czapek, e 59 mg a partir do

meio CBD. Os extratos brutos foram submetidos à análise do perfil químico em RMN de ^1H e em CLAE-UV/DAD.

6.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV/DAD)

Os perfis químicos em CLAE-UV/DAD analítico foram realizadas em um cromatógrafo modelo LC-10AD (Shimadzu), acoplado a um detector ultravioleta em arranjo de fotodiodos, modelo SPD-M10A (Shimadzu), com sistema de aquisição e tratamento de dados LCsolution (Shimadzu). Foi utilizada coluna tipo octadecil silano (C_{18}) modelo LUNA (Phenomenex[®]) de 250 mm x 4,6 mm d.i., com partículas de tamanho médio de 5 μm .

O sistema de eluição consistiu em ACN/ H_2O (5:95 v/v) (solvente A) e ACN/ H_2O (80:20 v/v) (solvente B), sendo as duas fases acidificadas com 0,035% e 0,025% de ácido trifluoroacético (TFA), respectivamente. Foi utilizada eluição por gradiente, incrementando o solvente B de 0 a 20% em 20 min, e atingindo 50% de B em 50 min.

6.3.5 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Os perfis químicos em RMN de ^1H foram realizados em espectrômetro Ascend 600, operando a 600 MHz para o núcleo de ^1H e TMS como referência interna. As amostras foram realizadas em DMSO deuterado (Sigma-Aldrich).

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1 Perfil Cromatográfico dos extratos brutos em CLAE-UV/DAD

Os cromatogramas dos extratos brutos de *P. purpurogenum* em Czapek e em CBD apresentaram vários picos com diferentes absorbâncias e boa resolução cromatográfica.

Pode-se observar a variação metabólica de cada meio de cultivo em dois comprimentos de onda $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 330$ nm (Figuras 21 e 22). Constatou-se a presença de inúmeros picos variando de baixa a média polaridade, com absorbâncias e tempos de retenção distintos em cada comprimento de onda, sugerindo a produção de metabólitos secundários diferentes.

O cromatograma do extrato bruto obtido em Czapek (Figura 21) apresentou maior número de picos que o cromatograma em CBD (Figura 22), indicando que o meio de cultivo interfere na produção de metabólitos secundários. Estas observações sugerem, que o meio líquido Czapek, classificado como quimicamente definido, propicia a produção de substâncias que absorvem na região do UV nos λ 254 e 330 nm. O fato pode ser explicado pela presença de diferentes componentes nutricionais em cada meio de cultivo que podem ser fundamentais para o desenvolvimento do fungo e que possibilitam a produção dos metabólitos secundários.

Figura 21 - Cromatograma do extrato bruto de *P. purpurogenum* em Czapek

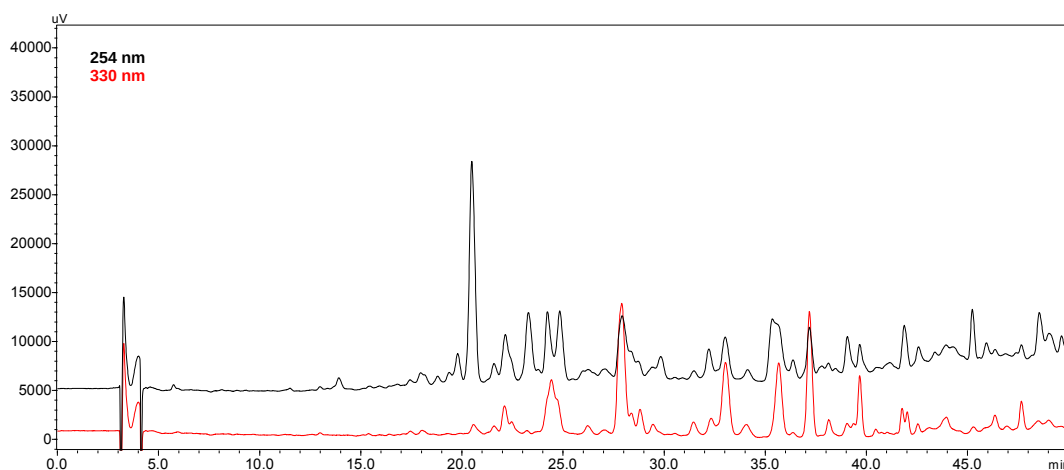
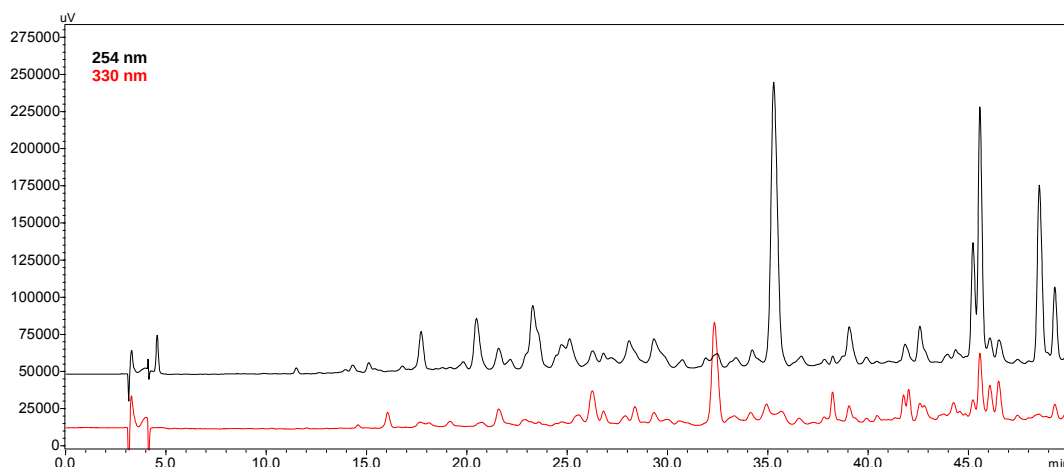


Figura 22 - Cromatograma do extrato bruto de *P. purpurogenum* em CBD

6.4.2 Perfil químico dos extratos brutos em RMN de ^1H

Os espectros de RMN de ^1H destes extratos evidenciaram sinais de δ_{H} 0,8 até aproximadamente δ_{H} 8,5 com a presença de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos.

Análise do extrato bruto em CBD (Figura 23) evidencia muitos sinais bem intensos e resolvidos por toda largura espectral, sugerindo inúmeras classes de substâncias. Observou-se uma região complexa com sinais variando de δ_{H} 6,0 a 8,5 ppm sugerindo várias classes de substâncias aromáticas e sinais de hidrogênios olefinicos e carbinólicos entre δ_{H} 3,0 a 6,0.

Quanto ao espectro de RMN de ^1H do extrato obtido em Czapek (Figura 24) observou-se uma região rica em hidrogênios carbinólicos, que podem ser vestígios de sacarose. Na região de aromáticos, observaram-se alguns sinais, no entanto, de baixa intensidade, sugerindo que as substâncias responsáveis por estes sinais foram produzidas em pequena quantidade.

Os perfis químicos obtidos pelas análises de RMN de ^1H dos extratos brutos corroboraram as informações obtidas dos perfis de CLAE-UV/DAD indicando que o meio de cultivo interfere na produção de metabólitos secundários. Com estas análises, pode-se constatar que *P. purpurogenum* é altamente produtivo, e que a produção metabólica é dependente do meio de cultivo.

Figura 23 – Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *P. purpurogenum* em CBD (DMSO- d_6 , 600 MHz)

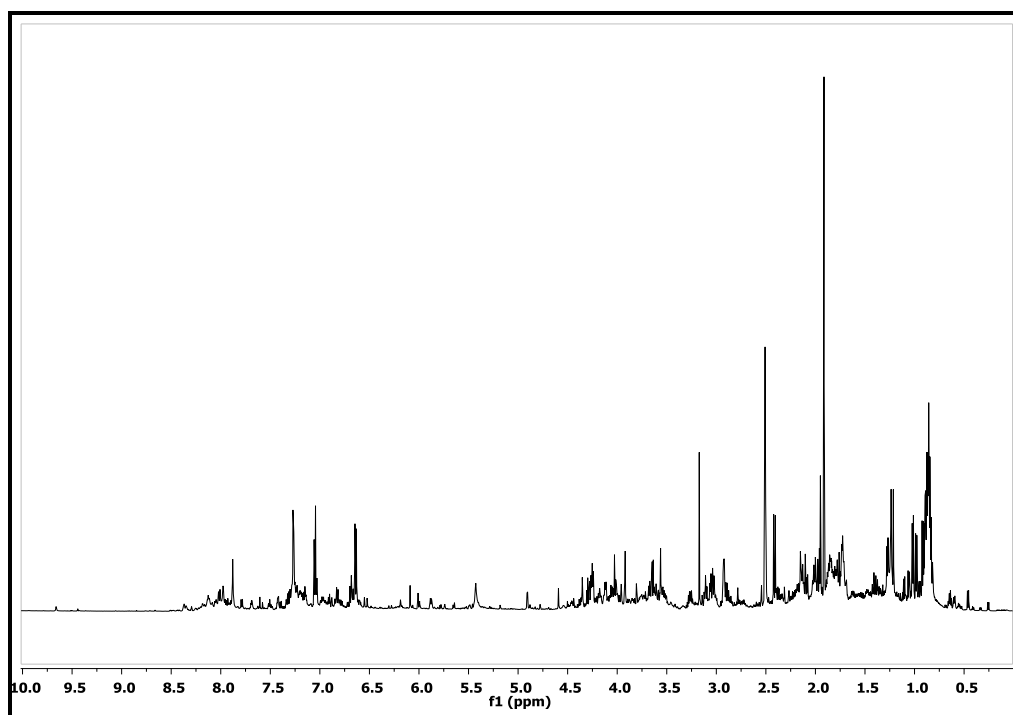
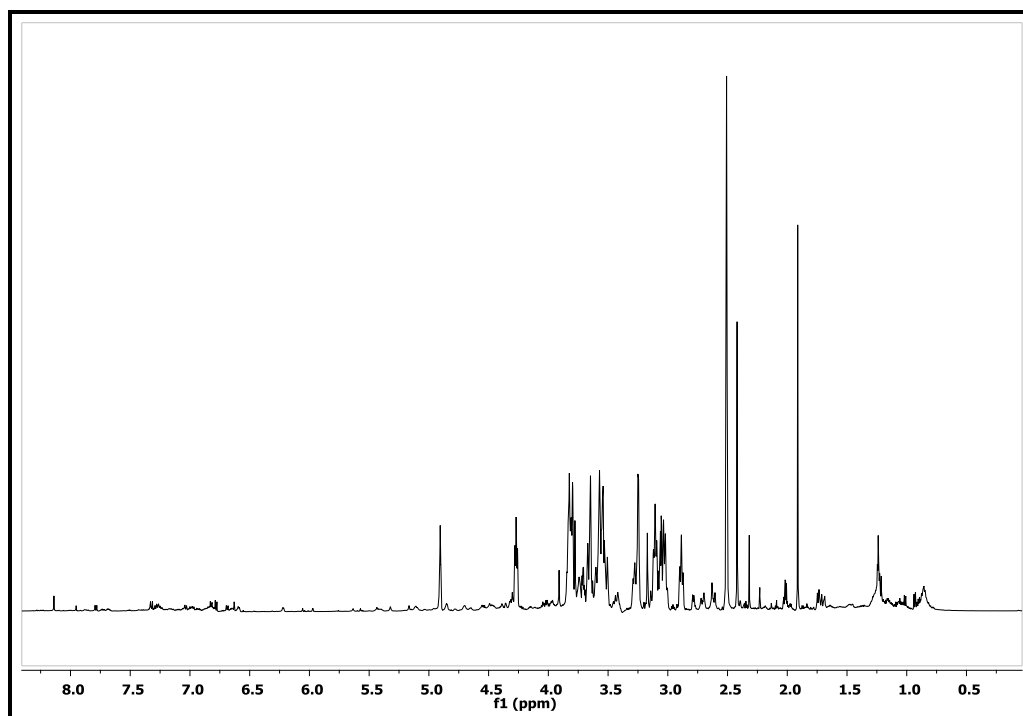


Figura 24 – Espectro de RMN de ^1H do extrato bruto de *P. purpurogenum* em Czapek (DMSO- d_6 , 600 MHz)



6.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

O trabalho realizado com o fungo *P. purpurogenum*, em fermentação submersa, permitiu a avaliação da potencialidade deste microrganismo na produção de metabólitos secundários.

O extrato bruto em Czapek apresentou um perfil químico promissor, sugerindo uma produção metabólica muito rica, quando analisado por CLAE-UV/DAD e RMN de ^1H .

O extrato obtido em CBD apresentou menos sinais no perfil químico por CLAE-UV/DAD quando comparado com o de Czapek, porém, o seu perfil de RMN de ^1H também sugere muita produção metabólica, com presença de compostos aromáticos que podem ser de interesse em futuros estudos.

O meio de cultura Czapek rendeu massa de extrato bruto maior que o meio CBD.

O fungo *P. purpurogenum* é um microrganismo altamente produtivo e o meio de cultivo interfere na produção dos metabólitos secundários, como também no crescimento micelial.

6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRIOS-GONZÁLES, J. et al. Secondary metabolites production by solid-state fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, Minden, v.1, n.1, p. 1–6, 2005.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 69, n. 3, p. 509–526, 2006.

TAKAHASHI, J. A.; FERREIRA LUCAS, E. M. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1807–1813, 2008.

CONCLUSÕES GERAIS

A presença de proteína, lipídeos e açúcares redutores nos resíduos de café permitiu sua adequação em um processo de fermentação em estado sólido com o fungo *Penicillium purpurogenum*. Os resíduos atuaram simultaneamente como suporte e como fonte de nutrientes.

Estabeleceu-se uma metodologia de extração de compostos fenólicos nos resíduos de café, em que foram testadas várias misturas aquosas de solventes. Ao avaliar o teor de fenóis pelo método de Folin Ciocalteu, comprovou-se que os resíduos de café contêm quantidades apreciáveis destes compostos, os quais podem ser extraídos de forma mais eficiente com um solvente aprótico como a acetona.

Os resultados sugerem que depois de cinco dias de fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *Penicillium purpurogenum*, consegue-se aumentar o teor de compostos fenólicos nos extratos obtidos a partir dos resíduos de café.

A metodologia de superfície de resposta, utilizada para avaliar as interações entre os fatores que influenciam o processo de fermentação, permitiu estabelecer que a FES influencia positivamente a obtenção de compostos fenólicos a partir de resíduos de café, principalmente quando o teor inicial de umidade encontra-se entre 50 e 75% e a temperatura de incubação é aproximadamente 33 °C. O pH inicial do meio não foi um fator relevante.

Mediante CLAE-UV/DAD, identificaram-se o ácido clorogênico, o ácido cafeico e a rutina como os compostos fenólicos majoritários presentes nos extratos da casca Robusta e da polpa de café. O teor destes compostos variou depois da fermentação em estado sólido.

Os extratos de casca Robusta, polpa e borra de café mostraram capacidade de sequestrar radicais livres, que aumentou depois do processo de fermentação.

O cultivo do fungo *P. purpurogenum* em meios líquidos permitiu observar que o fungo é altamente produtivo, apresentando perfis químicos com numerosos metabólitos secundários.

Este estudo fornece suporte para novas pesquisas nesta área e abre novas possibilidades para o aproveitamento dos resíduos da indústria cafeeira, levando em consideração a importância dos compostos fenólicos nas indústrias de alimentos e farmacêutica, e a grande quantidade disponível de casca e de polpa de café como resíduos da indústria cafeeira.

APÊNDICE – Curva de Calibração de Ácido Gálico**Figura 25** - Curva de calibração de ácido gálico (µg/mL)