

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E
MUCURI
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JULIANA MARTINS RIBEIRO

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS EXTRAÍDOS DOS
GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica*) CRU E TORRADO

DIAMANTINA

2015

JULIANA MARTINS RIBEIRO

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS
EXTRAÍDOS DOS GRÃOS DE CAFÉ (*Coffea arabica*) CRU E
TORRADO

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós – Graduação em Química, área de concentração em Química Orgânica, para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nísia Andrade Villela Dessimoni Pinto

DIAMANTINA

2015

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário: Rodrigo Martins Cruz CRB6-2886

R484e
2015 Ribeiro, Juliana Martins.
 Estudo da composição química e das atividades antioxidante e antibacteriana dos óleos extraídos dos grãos de café (*Coffea arabica*) cru e torrado / Juliana Martins Ribeiro. – Diamantina, 2015.
 56 p. : il., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nísia Andrade Villela Dessimoni Pinto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.
Área de concentração: Química orgânica.

1. *Coffea arabica*. 2. Óleos de café. 3. Tocoferóis. 4. Fitoesteróis.
I. Pinto, Nísia Andrade Villela Dessimoni. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Química. VI. Título.

CDD 547.3

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE
E ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS EXTRAÍDOS DOS GRÃOS DE CAFÉ
(*Coffea arabica*) CRU E TORRADO**

JULIANA MARTINS RIBEIRO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Química, nível
de Mestrado, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre.

APROVADO EM 04 / 08 / 2015

PROF. DR. LUIZ CARLOS COUTO – UFVJM

PROF. DR. PAULO HENRIQUE FIDÊNCIO – UFVJM

PROF^a. DR^a. ADRIANA AKEMI OKUMA – CEFETMG

PROF^a. DR^a. NÍSIA ANDRADE VILLELA DESSIMONI PINTO – UFVJM
Presidente

DIAMANTINA
2015

*Aos meus queridos pais, irmãs,
sobrinhos e meu namorado.*

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre ilumina meu caminho, me abençoando.

Aos meus pais, Geraldo e Raquel e, às minhas irmãs, Mariana e Poliana, pelo apoio, incentivo e amor.

Ao meu namorado, José Walter, pelo carinho, paciência e incentivo.

À professora Nísia, pela orientação e oportunidade de realização desse trabalho.

À Rosa e ao Ismael da EMBRAPA Cenargen pela extração dos óleos.

À Mércia, pelo apoio, ajuda e amizade.

À Kéllen e ao Martinez, por toda a ajuda.

À Clináscia, pelas análises no CG-FID.

À Silvia e ao Milton pela constante ajuda.

Ao professor Luiz Carlos Couto pelo moinho.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri pela minha formação profissional e, pela bolsa de mestrado.

“O sonho é uma fonte infinita de inspiração.”

Luiz Tambucci

RESUMO

O café é grão composto por uma variedade de substâncias, as quais conferem sabor e aroma à bebida, dentre os quais, podem-se citar proteínas, carboidratos e lipídios. Essa fração lipídica, quando extraída do grão de café cru, é utilizada, por exemplo, como emoliente em formulações farmacêuticas e, quando do grão torrado, como aditivos em alimentos, para conferir aroma e sabor. Assim, o objetivo do presente estudo foi o de caracterizar quimicamente e avaliar as atividades antioxidante e antibacteriana dos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado. Para isso, os grãos foram submetidos a uma extração em aparato Soxhlet, durante seis horas, utilizando éter de petróleo como solvente extrator. Após o tempo decorrido, evaporou-se o solvente remanescente com nitrogênio gasoso, obtendo-se os óleos, que foram acondicionados e armazenados em geladeira até o momento das análises. Observou-se que os grãos de café torrado apresentaram maior teor de óleo que o grão de café cru, 26,01% e 4,64 %, respectivamente. Apresentando o primeiro, cheiro e cor característicos de café e, o segundo, uma coloração verde e cheiro de vegetação. As características físico-químicas avaliadas, mostraram que os óleos estudados apresentaram resultados comparáveis a outros óleos convencionais. Com relação ao teor de ácidos graxos, os óleos obtiveram como majoritários, os ácidos linoleico (C18:2), palmítico (C16:0) e oleico (C18:1) e, ambos são fontes ácidos graxos insaturados. O óleo de café cru apresentou maior quantidade de fitoesteróis totais, sendo que nos dois, a ordem foi β -sitosterol > estigmasterol > campesterol > brassicasterol. Ao contrário, o óleo de café torrado foi o que se mostrou com maior concentração de tocoferóis, com predominância do isômero γ -tocoferol. O óleo de café cru apresentou maior quantidade de β -tocoferol. Os compostos fenólicos totais também foram quantificados, e o óleo de café torrado foi o com maior concentração. Com relação à atividade antioxidante, o óleo de café cru foi mais eficiente na captura do radical DPPH, enquanto que o torrado, frente aos métodos ABTS e FRAP. A atividade antibacteriana evidenciou que, dentre as bactérias testadas, a *P. aeruginosa* foi a mais sensível frente aos óleos testados, apresentando halos de inibição pelo método de difusão em ágar, mas quando analisada, foi resistente aos óleos. A CIM foi determinada e observou-se que as menores concentrações foram as que tiveram inibição do crescimento bacteriano. Diante do exposto, pode-se concluir que os óleos de café cru e torrado são boas fontes de compostos bioativos, e suas composições, justificam seus usos nas indústrias de vários segmentos.

Palavras – chave: *Coffea arabica*, óleos de café, tocoferóis, fitoesteróis.

ABSTRACT

Coffee beans is composed of a variety of substances, which give flavor and aroma to the drink, among which may be mentioned proteins, carbohydrates and lipids. This lipid fraction, when extracted from raw coffee beans, is used, for example, in pharmaceutical formulations as an emollient and when the roasted grain, as additives in foods for imparting aroma and flavor. The objective of this study was to characterize chemically and evaluate the antioxidant and antibacterial activities of the oils extracted from raw and roasted coffee beans. To this end, the grains were subjected to a Soxhlet extraction apparatus for six hours using petroleum ether as solvent extractor. After the elapsed time, it evaporates the remaining solvent with nitrogen gas to give oils which were packed and stored in refrigerator until analysis of memento. It has been observed that roasted coffee beans had higher oil content than the raw coffee beans, 26.01% and 4.64%, respectively. Introducing the first and characteristic smell of coffee color, and the second, a green color and smell of vegetation. The physico-chemical characteristics evaluated showed that the oils studied showed results comparable to other conventional oils. With respect to the content of fatty acids, oils obtained as the major, linoleic (C18: 2), palmitic (C16: 0) and oleic (C18: 1), and both are unsaturated fatty acids sources. The green coffee oil showed a higher amount of total phytosterols, and in both, the order was β -sitosterol > stigmasterol > campesterol > brassicasterol. Rather, the roasted coffee oil was found that with higher concentrations of tocopherols, predominantly γ -tocopherol isomer. The green coffee oil had higher amounts of β -tocopherol. The phenolic compounds have also been quantified, and the roasted coffee oil was the highest concentration. With respect to the antioxidant activity, the raw coffee oil was more efficient in capturing the DPPH radical, while the roasted, compared to ABTS and FRAP methods. The antibacterial activity showed that among the tested bacteria, *P. aeruginosa* was the most sensitive against the tested oils, with halos of inhibition by agar diffusion method, but when analiada, was resistant to oils. The MIC was determined and it was observed that lower concentrations were those who had bacterial growth inhibition. Given the above, it can be concluded that raw and roasted coffee oils are good sources of bioactive compounds and their compositions, justify their use in industries of several segments.

Key – words: *Coffea arabica*, coffee oils, tocopherols, phytosterols.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cafeeiro e seus frutos. FONTE: Elízio Carlos Cotrim.....	3
Figura 2. Estruturas químicas dos ácidos graxos <i>cis</i> -linoléico (n-6) e α -linolênico (n-3).....	6
Figura 3. Estrutura dos principais fitoesteróis presentes em alimentos e do colesterol.	8
Figura 4. Estrutura química do tocoferol.....	9
Figura 5. Estrutura química de alguns compostos fenólicos.	11
Figura 6. Estabilização do radical livre DPPH.....	13
Figura 7. Estabilização do radical ABTS.+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de sódio.....	13
Figura 8. Redução do complexo TPTZ com Fe^{3+}	14
Figura 9. Extração dos óleos de café em extrator de Soxhlet.....	17
Figura 10. Esquema de diluição para determinação da CIM.....	25
Figura 11. Óleos extraídos dos grãos de café torrado e cru.....	27
Figura 12. Cromatograma da análise, por cromatografia gasosa, de ácidos graxos em óleo extraído do grãos de café cru.....	31
Figura 13. Cromatograma da análise, por cromatografia gasosa, de ácidos graxos em óleo extraído do grãos de café torrado.	31
Figura 14. Cromatograma da análise, por cromatografia gasosa, de fitoesteróis, em óleo extraído do grãos de café cru. Tempos de retenção (min): 16.501: colestano (padrão interno); 20.408: campesterol; 20.836: estigmasterol; 21.681: β -sitosterol.	35
Figura 15. Cromatograma da análise, por cromatografia gasosa, de fitoesteróis, em óleo extraído do grãos de café torrado. Tempos de retenção (min): 16.494: colestano (padrão interno); 20.395: campesterol; 20.826: estigmasterol; 21.677: β -sitosterol.	35
Figura 16. Cromatograma de análise, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, de tocoferóis no óleo extraído dos grãos de café cru. Tempos de retenção: 3,967: α -tocoferol; 6,367: β -tocoferol; 6,800: γ -tocoferol.....	37
Figura 17. Cromatograma de análise, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, de tocoferóis no óleo extraído dos grãos de café torrado. Tempos de retenção: 3,333: α -tocoferol; 5,567: β -tocoferol; 6,400: γ -tocoferol.....	37
Figura 18. Cromatograma de análise, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, de tocoferóis no óleo extraído dos grãos de café torrado. Tempo de retenção: 9,833: δ -tocoferol	38
Figura 19. Halos de inibição obtidos para a <i>P. aeruginosa</i> pela ação dos óleos de café cru e torrado.....	43
Figura 20. Placas de microdiluição utilizadas na determinação da CIM, para os óleos de café cru e torrado.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração dos ácidos linoleico e α -linolênico em alguns óleos vegetais.....	6
Tabela 2. Conteúdo de fitosteróis em diferentes alimentos.	7
Tabela 3. Concentração de tocoferóis em óleos vegetais.	9
Tabela 4. Teor de fenóis totais em alguns alimentos.....	10
Tabela 5. Concentrações obtidas nas colunas nas placas, em % e mg/mL.....	24
Tabela 6. Teor de óleo de café obtido dos grãos de cru e torrado.	27
Tabela 7. Composição físico – química dos óleos.....	28
Tabela 8. Composição em ácidos graxos dos óleos.....	30
Tabela 9. Quantidade total em porcentagem de ácidos graxos insaturados, monoinsaturados, poliinsaturados e saturados dos óleos de café cru e torrado.	32
Tabela 10. Coeficientes de correlação entre os índices de refração (IR), iodo (II) e saponificação (IS) e a composição de ácidos graxos insaturados totais (AGIT), monoinsaturados (AGM), poliinsaturados (AGP) e saturados (AGS), do óleo extraído do grão de café cru.....	33
Tabela 11. Coeficientes de correlação entre os índices de refração (IR), iodo (II) e saponificação (IS) e a composição de ácidos graxos insaturados totais (AGIT), monoinsaturados (AGM), poliinsaturados (AGP) e saturados (AGS), do óleo extraído do grão de café torrado..	33
Tabela 12. Composição de fitosteróis dos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado. .	34
Tabela 13. Composição de tocoferóis dos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado....	36
Tabela 14. Concentração de compostos fenólicos nos óleos de café cru e torrado.	39
Tabela 15. Atividade antioxidante, CE50 e eficiência antirradical dos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado.....	40
Tabela 16. Atividade antioxidante pelos métodos ABTS ⁺ e FRAP nos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado.....	40
Tabela 17. Coeficientes de correlação entre tocoferóis totais, α -, β -, γ - tocoferol e compostos fenólicos totais e, os métodos de determinação da atividade antioxidante DPPH, ABTS ⁺ e FRAP, do óleo extraído do grão de café cru.....	41
Tabela 18. Coeficientes de correlação entre tocoferóis totais, α -, β -, γ - e δ -tocoferol e compostos fenólicos totais e, os métodos de determinação da atividade antioxidante DPPH, ABTS ⁺ e FRAP, do óleo extraído do grão de café torrado.	41
Tabela 19. Halos de inibição dos óleos de café cru e torrado e controles, frente às <i>bactérias B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	42
Tabela 20. Concentrações inibitórias e bactericidas mínimas dos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado frente às bactérias <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	444

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Teor de óleo em porcentagem	17
Equação 2. Índice de Saponificação	18
Equação 3. Índice de Iodo	18
Equação 4. Ácidos graxos livres	19

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS - 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ATTC – american type culture collection

CBM – concentração bactericida mínima

CIM – concentração inibitória mínima

CG-DIC – cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização em chama

°C - graus Celsius

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power

g – grama

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos

mm – milímetro

mg – miligrama

mL- mililitro

min – minuto

µg - micrograma

µL - microlitro

µm - micrômetro

nm – nanômetro

N – normalidade

rpm - rotações por minuto

s – segundo

TTC – cloreto de trifeniltetrazólio

TPTZ - 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina

UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	2
2.1	OBJETIVOS GERAIS	2
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1	CAFÉ	3
3.2	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	4
3.3	ÓLEO DE CAFÉ	4
3.4	ÁCIDOS GRAXOS	5
3.5	FITOESTERÓIS	7
3.6	TOCOFERÓIS	8
3.7	COMPOSTOS FENÓLICOS	10
3.8	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	11
3.9	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	14
4	METODOLOGIA	16
4.1	LOCAIS DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	16
4.2	MATÉRIA – PRIMA	16
4.3	EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS	16
4.4	ANÁLISES DOS ÓLEOS EXTRAÍDOS	17
4.4.1	Características físicas	17
4.4.2	Teor de óleo	17
4.4.3	Características físico-químicas	17
4.4.3.1	<i>Índice de refração</i>	18
4.4.3.2	<i>Índice de Saponificação</i>	18
4.4.3.3	<i>Índice de Iodo</i>	18
4.4.3.4	<i>Ácidos graxos livres e índice de acidez</i>	19
4.4.4	Composição química	19
4.4.4.1	<i>Ácidos Graxos</i>	19
4.4.4.2	<i>Fitoesteróis</i>	20
4.4.4.3	<i>Tocoferóis</i>	20
4.4.4.4	<i>Compostos fenólicos totais</i>	21
4.4.5	Atividades biológicas	21
4.4.5.1	<i>Atividade Antioxidante in vitro</i>	21
4.4.5.1.1	<i>Método de Captura do Radical Livre DPPH</i>	21

4.4.5.1.2	<i>Método de Captura do Radical Livre ABTS. +</i>	22
4.4.5.1.3	<i>Método de Redução do Ferro – FRAP</i>	22
4.4.5.2	<i>Atividade Antibacteriana in vitro</i>	23
4.4.5.2.1	<i>Teste de difusão em ágar</i>	23
4.4.5.2.2	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)</i>	24
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA	27
5.2	TEOR DE ÓLEO	27
5.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	28
5.4	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	30
5.4.1	Ácidos graxos	30
5.4.2	Fitoesteróis	34
5.4.3	Tocoferóis	36
5.4.4	Compostos fenólicos totais	38
5.5	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	39
5.5.1	Atividade antioxidante	39
5.5.2	Atividade antibacteriana	42
6	CONCLUSÃO	46
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
	ANEXO – CURVAS ANALÍTICAS DOS PADRÕES	55

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais aceitas e apreciadas por diversos países no mundo, por ser um produto natural, com aroma e sabores distintos. Considerado como uma das grandes riquezas brasileiras, o café acelerou o desenvolvimento e a inserção do Brasil no comércio internacional. Além de fomentar o surgimento das cidades, construções de ferrovias e portos para o escoamento do grão, trouxeram imigrantes para o país e intensificou movimentos culturais (PIMENTA, 2003).

O grão de café possui uma mistura complexa de compostos químicos de ocorrência natural e, de compostos formados durante o processo de torração (DAGLIA et al., 1998). Essa complexidade se deve tanto pela presença de uma grande quantidade de compostos químicos, como pela possível reação e interação desses compostos durante o processamento (CLARKE; MACRAE, 1989). Dentre as variedades de compostos presentes no café, destacam-se proteínas, carboidratos e lipídios.

Os óleos vegetais, dentre eles os óleos de café, constituem uma das principais fontes de compostos biologicamente ativos e de ácidos graxos poliinsaturados. Além desses, pode-se citar a presença de compostos fenólicos, ácidos graxos, tocoferóis, carotenóides, fitoesteróis, dentre outros. Esses compostos exercem várias funções do ponto de vista biológico, tais como: atividade antioxidante, estimulação do sistema imune, atividade antibacteriana e antiviral, entre outras mais (COSTA; JORGE, 2011).

A espécie botânica, a qualidade dos grãos, o tamanho da partícula após a moagem, o tempo de extração e o solvente influenciam o rendimento, o perfil e as propriedades do óleo de café. Durante o procedimento de extração devem-se prevenir a degradação térmica e oxidações em geral, os principais problemas quando se trata da qualidade do óleo de café (PIMENTA, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho objetivou caracterizar quimicamente os óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado e, avaliar as atividades antioxidante e antibacteriana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar as características físico-químicas dos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado (índice de refração, índice de saponificação, índice de iodo, ácidos graxos livres e índice de acidez), bem como, caracterizar quimicamente os óleos, quanto à composição em ácidos graxos, tocoferóis, fitoesteróis e compostos fenólicos totais.
- Avaliar a atividade antioxidante dos óleos pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP.
- Avaliar a atividade antibacteriana dos óleos extraídos pelo método de difusão em ágar e microdiluição.
- Comparar os óleos a partir das características e compostos analisados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CAFÉ

O cafeeiro (Figura 1) é uma planta perene de porte arbustivo e, faz parte do grupo das plantas Fanerógamas, classe Angiosperma, subclasse Dicotiledôneas, ordem Rubiales, família das *Rubiaceae*, tribo *Coffeae*, subtribo *Coffeinae* e gênero *Coffea* (MATTIELLO et al., 2005). Das 100 espécies descritas do gênero *Coffea*, somente duas produzem frutos que têm importância econômica no mercado internacional: *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Seus produtos são designados como café arábica e café robusta, respectivamente (PIMENTA, 2003).



Figura 1. Cafeeiro e seus frutos. FONTE: Elízio Carlos Cotrim.

A espécie *C. arabica* é cultivada em regiões montanhosas, preferencialmente em altitudes superiores a 500 metros e temperatura entre 18-24°C. Essa espécie é sensível a doenças, geadas e temperaturas muito elevadas fazendo com seja difícil de ser cultivada. O café arábica produz um café fino, de aroma e sabor mais apreciados, representando aproximadamente 70% do café produzido no mundo. Já a *C. canephora* é mais resistente que a *C. arabica*, pode ser cultivada em regiões com altitude até 450 metros e temperatura entre 22-26°C, porém, sua bebida não é tão apreciada, o que a torna uma espécie mais barata e que responde menos de 30% da produção mundial (SILVA; MENDES; KAGEYAMA, 2008). A

espécie e variedade do café influenciam fortemente na sua composição química, mas outros fatores, como as condições de cultivo, o grau de maturação e as condições de armazenamento, também devem ser considerados (SMITH, 1989).

3.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

No Brasil, a contribuição da produção cafeeira para a formação econômica foi uma constante ao longo do tempo, porém sua participação relativa diminuiu gradativamente, dada a contínua diversificação da pauta de exportações brasileiras. Mesmo assim, o café continua sendo importante gerador de divisas para o país, contribuindo com 2,9% do valor total das exportações brasileiras, em 2014 (CECAFE, 2015).

Minas Gerais, dentre os estados brasileiros produtores de café, destaca-se como maior produtor, sendo que em 2014 o estado produziu mais de 50% de toda a safra brasileira, equivalente a 22,6 milhões de sacas de café. Das quais, 10,7 milhões são provenientes do Sul e Centro-Oeste do Estado; 5,8 milhões do Cerrado Mineiro (Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba e Noroeste); 5,3 milhões da Região da Zona da Mata, Rio Doce e Central; e 762 mil do Norte de Minas, Jequitinhonha e Mucuri (EPAMIG, 2015).

A importância da cafeicultura pode ser avaliada não apenas como fonte de produção e renda, mas pelo seu papel no mercado de trabalho, como geradora de empregos e como fator de fixação de mão – de – obra no meio rural (SAES et.al, 2002).

3.3 ÓLEO DE CAFÉ

Os óleos vegetais são amplamente utilizados em aplicações industriais (especialmente pelas indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentícia), devido ao seu papel importante na composição dos produtos. Os lipídios podem atuar como emolientes, emulsionantes, veículos, modificadores de viscosidade, espalhando agentes, ligantes e lubrificantes em muitos produtos cosméticos. As aplicações específicas dependem das características do óleo, que pode também variar de acordo com as sementes utilizadas (AZEVEDO et al., 2008).

Os lipídios são componentes importantes da bebida e aroma do café, embora a maioria seja perdida durante a preparação. Estes são expelidos com a torrefação, ficando na superfície do grão e, formando uma camada impede a volatilização dos compostos (MAZZAFERA et al., 1998). O café arábica contém maior quantidade de óleo que o robusta, variando de 10,5 a 17,7% e de 8 a 10%, respectivamente (ARAÚJO, 2012).

O óleo de café cru é utilizado na indústria de cosméticos por sua propriedade emoliente fornecida pelos ácidos graxos e sua capacidade de bloquear a luz solar prejudicial à pele do ser humano. Por ser rico em fitoesteróis, promovem excelente hidratação, rápida penetração e boa aderência em aplicações cosméticas (ALVAREZ; RODRIGUEZ, 2000).

O óleo de café torrado é utilizado como aromatizante em vários alimentos e bebidas industrializados. É utilizado na fabricação de café instantâneo, sendo adicionado ao final do processo para compensar as perdas dos compostos voláteis ocorridas na sua obtenção (ARAÚJO, 2012).

Os óleos vegetais são constituídos principalmente por triacilgliceróis, que é uma substância formada a partir da reação de uma molécula de glicerina e três moléculas de ácidos graxos, cujo comprimento da cadeia carbônica e grau de insaturação determinam suas propriedades físicas e químicas. Estão presentes, também, esteróis, vitaminas lipossolúveis, tocoferóis, compostos fenólicos, ácidos graxos livres e mono e diacilgliceróis (KAMAL-ELDIN, 2006).

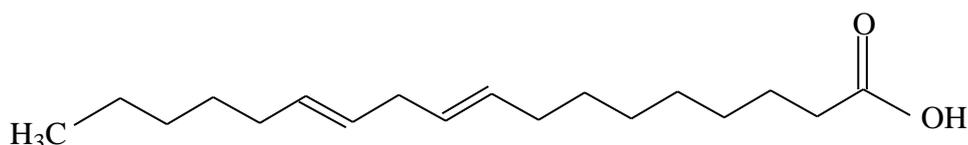
3.4 ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos ocorrem como componentes de óleos e gorduras e, possuem um grupamento carboxílico na extremidade polar e uma cadeia de hidrocarbonetos na cauda apolar ($\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_x - \text{COOH}$). Normalmente, possuem número par de átomos de carbono e a cadeia de hidrocarbonetos não é ramificada. São subdivididos em cadeia carbônica curta (C_4 a C_{10}), média (C_{12} a C_{14}), longa (C_{16} a C_{22}) e muito longa ($>\text{C}_{22}$). E, são classificados em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, dependendo da presença e número de ligações duplas na cadeia de ácidos graxos (ARAÚJO, 2012).

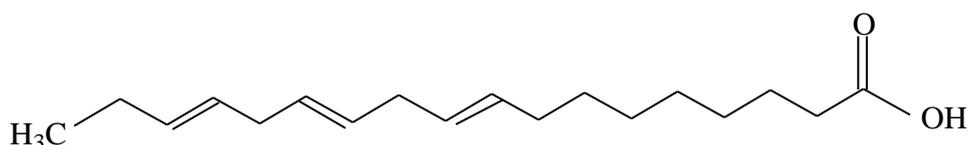
Alguns ácidos graxos insaturados produzem efeitos especiais no organismo vivo e são denominados ácidos graxos essenciais. Estes ácidos não são sintetizados pelo organismo humano, sendo sintetizados biologicamente a partir dos precursores oferecidos na dieta (CURI et.al., 2002).

Há duas subclasses de ácidos graxos essenciais – os ômega 6 e os ômega 3. Os primeiros são derivados do ácido *cis*-linoléico e, os segundos, do ácido α -linolênico, representados na Figura 2. As famílias ôegas 6 e 3 abrangem ácidos graxos que apresentam insaturações separadas apenas por um carbono metilênico, com a primeira insaturação no sexto e terceiro carbonos, respectivamente, enumerado a partir do grupo metila terminal. A essencialidade de um ácido graxo depende da distância da primeira dupla ligação em relação à

metila terminal. Durante a formação de um ácido graxo, as enzimas biossintéticas humanas podem inserir duplas ligações na posição n-9 ou superior, entretanto, estas enzimas não podem inserir duplas ligações em nenhuma posição mais próxima ao grupo metila terminal. Por essa razão, ácidos graxos com duplas ligações nas posições n-6 e n-3 são considerados essenciais, devendo ser obtidos de vegetais e de outros organismos que possuam vias enzimáticas para sua construção (JONES; KUBOW, 2003).



Ácido *cis*-linoléico (n-6)



Ácido α -linolênico (n-3)

Figura 2. Estruturas químicas dos ácidos graxos *cis*-linoléico (n-6) e α -linolênico (n-3).

Os ácidos *cis*-linoleico e α -linolênico estão presentes tanto em espécies vegetais como animais empregados na alimentação humana (MARTIN et.al., 2006). Os óleos vegetais se destacam como fonte desses ácidos graxos essenciais, como o óleo de linhaça, rico em ácido α -linolênico e o óleo de milho, rico em ácido *cis*-linoleico. A tabela 1 apresenta as suas concentrações em alguns óleos vegetais.

Tabela 1. Concentração dos ácidos *cis*-linoleico e α -linolênico em alguns óleos vegetais

Óleo	n-6 (mg/g)	n-3 (mg/g)
Canola	203,0	93,0
Linhaça	127,0	533,0
Milho	523,0	11,6
Oliva	97,6	7,60
Soja	510,0	68,0

FONTE: MARTIN et.al., 2005.

Os ácidos graxos ômega 6 têm efeito sobre a pele, evitando que a mesma sofra ressecamento e surgimento de feridas. Já os ácidos ômega 3 são importantes no desenvolvimento do sistema nervoso central e no funcionamento ideal do mesmo. Apesar do aparente papel preponderante dos ácidos graxos essenciais na pele e no sistema nervoso, tais ácidos graxos estão também implicados no funcionamento de diversos órgãos e sistemas, basicamente pela sua conversão em eicosanóides, mediadores lipídicos farmacológicos que

incluem, entre outros, as prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas e lipoxinas (CURI et al., 2002).

3.5 FITOESTERÓIS

Os fitoesteróis (esteróis vegetais) são componentes presentes em todos os alimentos vegetais e, contribuem para a estabilização das bicamadas fosfolipídicas nas membranas das células vegetais (LAGARDA et.al., 2006). No organismo humano, possuem capacidade de reduzir o colesterol total plasmático e LDL-colesterol. Essa capacidade ocorre pelo fato de que os fitoesteróis competem com o colesterol na entrada das micelas intestinais. Embora a absorção dos fitosteróis seja menor que a do colesterol, uma boa parte é introduzida nas micelas intestinais, acarretando diminuição do colesterol (PATEL; THOMPSON, 2005).

Os fitoesteróis possuem estrutura formada por 28 ou 29 átomos de carbono, se assemelhando à estrutura do colesterol (C-27). Os primeiros diferem do colesterol pela presença de grupos metil ou etil no carbono C-24 e /ou pela presença de dupla ligação no carbono C-22 (BRUFAU et.al., 2008). Os fitoesteróis ocorrem naturalmente em produtos vegetais (como frutas e nozes), cereais e em óleos vegetais, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Teor de fitoesteróis em diferentes alimentos.

Alimento	Teor (mg/100g)
Óleo de milho	809-1557
Óleo de girassol	374-725
Óleo de soja	229-459
Óleo de oliva	144-150
Óleo de palma	71-117
Milho	178
Trigo	60,3-69
Alface	38
Banana	17
Maçã	13
Laranja	7

FONTE: ARAÚJO, 2012.

Diferenças entre espécies, fatores genéticos, condições de crescimento, de armazenamento e de processamento, são fatores que podem afetar o teor de fitoesteróis nesses produtos (BRUFAU et.al., 2008). São reportados mais de 200 tipos diferentes de fitoesteróis, mas os mais abundantes são o β -sitosterol, campesterol e o stigmasterol e, em média, compreendem 65, 30 e 3% da ingestão na dieta (LAGARDA et.al., 2006; PATEL; THOMPSON, 2005). A Figura 3 (pág. 8) ilustra a estrutura dos principais fitoesteróis e do colesterol.

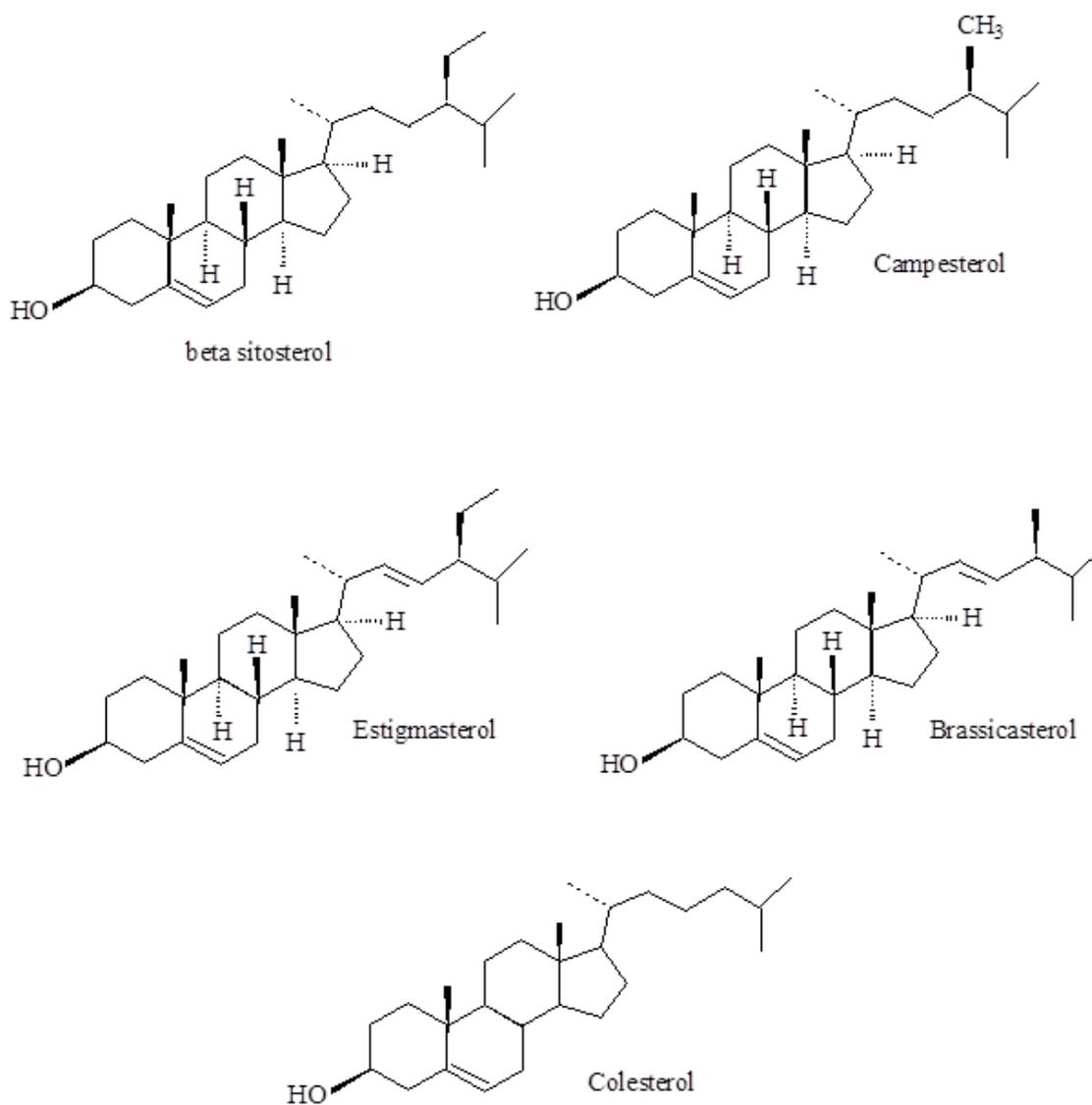
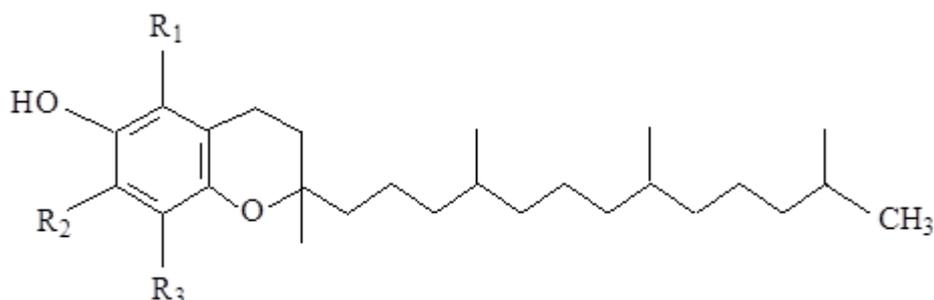


Figura 3. Estrutura dos principais fitoesteróis presentes em alimentos e do colesterol.

3.6 TOCOFERÓIS

Os tocoferóis consistem de um núcleo básico constituído por dois anéis, um fenólico e outro heterocíclico, ligados a uma cadeia lateral saturada formada por 16 átomos de carbono. Dependendo do número e da posição dos grupos metila ligados ao anel aromático, os tocoferóis apresentam-se como quatro compostos homólogos, denominados α , β , γ e δ -tocoferol (COSTA; JORGE, 2011), conforme a Figura 4.



Onde:

α -tocoferol- $R_1=R_2=R_3= -CH_3$

β -tocoferol- $R_1= -CH_3$; $R_2= H$; $R_3=-CH_3$

γ -tocoferol- $R_1=H$; $R_2=R_3=-CH_3$

δ -tocoferol- $R_1=R_2=H$; $R_3=-CH_3$

Figura 4. Estrutura química do tocoferol.

Estes compostos apresentam atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Nos óleos vegetais, protegem os ácidos graxos insaturados da oxidação lipídica e no organismo humano apresentam atividade biológica de vitamina E (COSTA; JORGE, 2011). A Tabela 3 apresenta a concentração de tocoferóis em óleos vegetais.

Tabela 3. Concentração de tocoferóis em óleos vegetais.

Óleo (mg/100g)	α -tocoferol	β -tocoferol	γ -tocoferol	δ -tocoferol
Girassol	56,4	2,45	0,43	0,087
Amendoim	14,1	0,396	13,1	0,922
Soja	17,9	2,80	60,4	37,1
Algodão	40,3	0,196	38,3	0,457
Milho	27,2	0,214	56,6	2,52
Oliva	9,0	0,16	0,471	0,043

FONTE: DAMODARAN et.al., 2010.

A atividade antioxidante dos tocoferóis varia em função da temperatura e do grau de impedimento estereoquímico. O grupo hidroxila livre no anel é responsável pelas propriedades antioxidantes sendo os hidrogênios fenólicos doados aos radicais livres lipídicos, formando produtos estáveis e interrompendo a propagação em cadeia da oxidação lipídica (COSTA; JORGE, 2011). Em condições fisiológicas, ou seja, a 37°C, a atividade antioxidante é a da seguinte maneira: $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, similar à atividade biológica. À temperatura elevada, entre 50 e 100°C, é observada a atividade antioxidante na ordem inversa: $\delta > \gamma > \beta > \alpha$. O α -tocoferol é o mais abundante dos tocoferóis, e sua atividade biológica é duas vezes mais que o β e γ e 100 vezes o δ (ARAÚJO, 2012).

3.7 COMPOSTOS FENÓLICOS

Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Existem cerca de cinco mil fenóis de ocorrência natural, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis. Englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes em vários produtos de origem natural na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (ANGELO; JORGE, 2006). A Tabela 4 mostra o teor de fenóis totais em alguns alimentos.

Tabela 4. Teor de fenóis totais em alguns alimentos.

Alimento	Fenóis totais (mg/100g)
Aveia	8
Sorgo	170-10.260
Cebola	100-2000
Ervilha	78-230
Maçã	27-298
Morango	38-218
Acerola	861-888

FONTE: ARAÚJO, 2012.

Embora apresentem uma grande diversidade estrutural, os compostos fenólicos são classificados em dois grandes grupos: os flavonoides e não flavonoides. Os primeiros são os que apresentam estrutura química $C_6-C_3-C_6$ e, os segundos, são os C_6-C_1 (ácidos hidroxibenzóico, gálico e elágico), C_6-C_3 (ácidos caféico e p-cumárico) e $C_6-C_2-C_6$ (*trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol-glucosídico) (VERONEZI; JORGE, 2012). A Figura 5 mostra a estrutura de alguns compostos fenólicos.

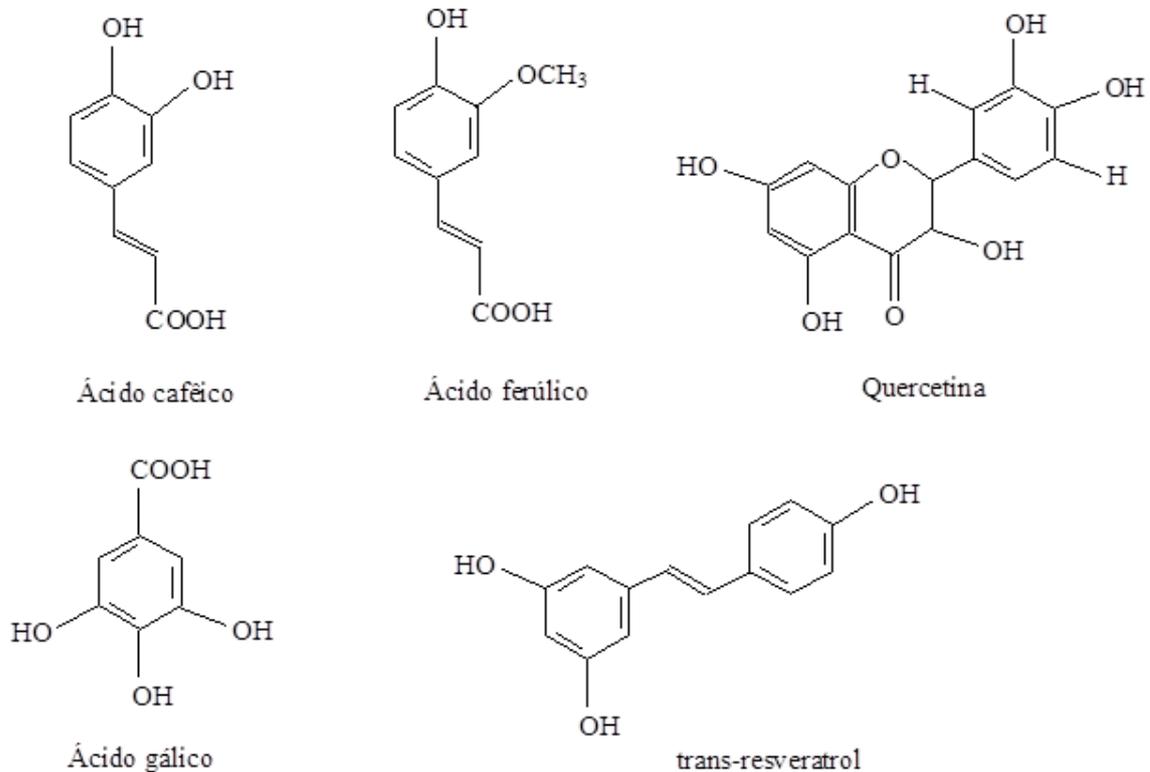


Figura 5. Estrutura química de alguns compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos têm recebido atenção nos últimos anos por sua ação antioxidante. Os antioxidantes fenólicos reagem com os radicais por doação de um átomo de hidrogênio (ou de um elétron), detendo a reação de propagação em cadeia pela formação de compostos inativos e o radical do antioxidante é estabilizado por ressonância. Os fatores que influenciam essa atividade antioxidante incluem posição e número de hidroxilas, polaridade, solubilidade, potencial de redução, estabilidade do composto fenólico a operações de processamento do alimento e estabilidade do radical fenólico (DAMODARAN et.al., 2010).

Os compostos fenólicos encontrados naturalmente em alimentos vegetais e óleos são importantes para sua estabilidade oxidativa endógena. Os níveis de fenólicos em plantas e alimentos podem variar em função da maturidade, do tipo de tecido, das condições de crescimento, da pós-colheita e das condições de armazenamento (DAMODARAN et.al., 2010).

3.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), podem ser definidas como espécies químicas moleculares que contêm um ou mais elétrons não emparelhados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O elétron livre favorece a reação com

outras moléculas, o que torna os radicais livres extremamente reativos. Essas espécies reativas são produtos do metabolismo celular e desempenham papel dual, como espécies tanto benéficas quanto prejudiciais aos sistemas biológicos. Os efeitos benéficos ocorrem em concentrações baixas ou moderadas de radicais livres e envolvem funções fisiológicas, tais como a defesa contra agentes infecciosos e participação nos sistemas de sinalização celular. Já os efeitos danosos decorrem da superprodução (VALKO et al., 2006), culminando com danos ao DNA e/ou oxidação de lipídios e proteínas.

O excesso de radicais no organismo é combatido por antioxidantes endógenos, destacando-se as superóxido dismutases, consideradas como a linha de frente de defesa antioxidante, a catalase e as glutatona peroxidases; ou absorvidos da dieta, como as vitaminas C, E e A, carotenóides, flavonoides, outros polifenóis, furanóides e tióis e produtos sintéticos (BARREIROS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

A definição do termo antioxidante é definida como “qualquer substância que, presente em baixa concentração quando comparada ao substrato oxidável, atrasa, previne ou repara os danos oxidativos a uma molécula” (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Diversas técnicas têm sido empregadas para avaliar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e materiais potencialmente interessantes. A realização de mais um ensaio é altamente recomendado, uma vez que os princípios dos métodos variam de acordo com a matriz de reação. Além disso, antioxidantes podem se comportar de diferentes maneiras em resposta a diferentes radicais ou fontes antioxidantes (ALVES, 2010).

O método DPPH é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. O DPPH é um radical cromóforo muito estável de coloração violeta, quando é reduzido, por antioxidantes doadores de hidrogênio ou elétron, adquire coloração amarela (Figura 6). Esse radical pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

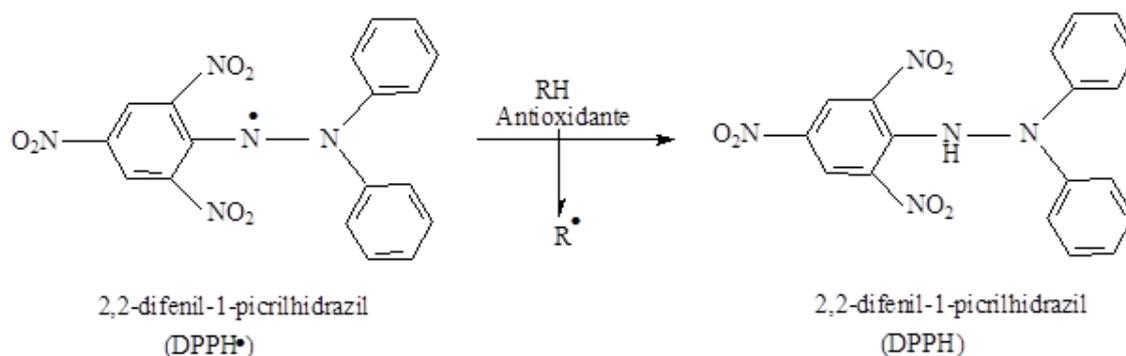


Figura 6. Estabilização do radical livre DPPH.

O método da captura do radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ($\text{ABTS}^{\cdot+}$), também é um dos mais utilizados para medir a atividade antioxidante. Esse radical pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSK et al., 2005), já que o radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ pode ser solubilizado tanto em solventes orgânicos quanto aquosos. A geração do radical cromóforo esverdeado dá-se por meio da reação do $\text{ABTS}^{\cdot+}$ com persulfato de sódio. O radical apresenta absorção máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815 nm. O radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ é reduzido na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, perdendo sua coloração verde-escuro, em intensidade e escala de tempo dependentes da atividade antioxidante, da concentração e da duração da reação (RE et.al., 1999). A Figura 8 mostra a reação do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ com um antioxidante.

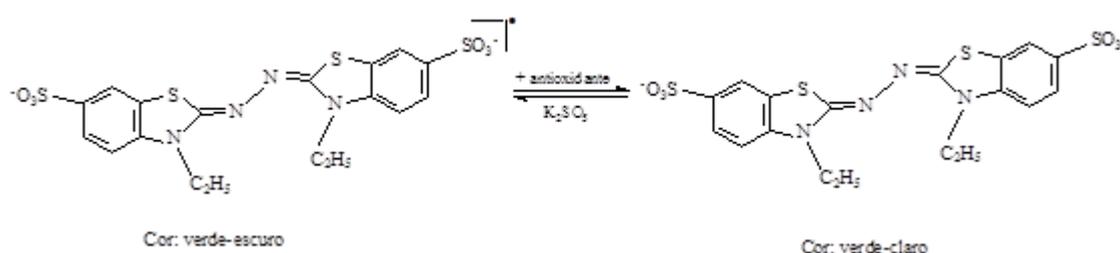


Figura 7. Estabilização do radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de sódio.

O método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) – Poder Antioxidante de Redução do Ferro, é baseado na redução do Fe^{3+} e, avalia capacidade de compostos reduzirem esse íon, com consequente formação de um complexo colorido com Fe^{2+} (ROGINSKY; LISSI, 2005). Quando um complexo Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) é reduzido a Fe^{2+} por um antioxidante em condições ácidas, desenvolve-se uma intensa coloração púrpura com absorção máxima a 593 nm. Assim, a capacidade antioxidante pode ser avaliada pelo monitoramento da formação do complexo Fe^{2+} -TPTZ espectrofotometricamente. Esse método necessita que o sistema seja aquoso e, detecta compostos que agem por meio da doação de elétrons (PRIOR et.al., 2005).

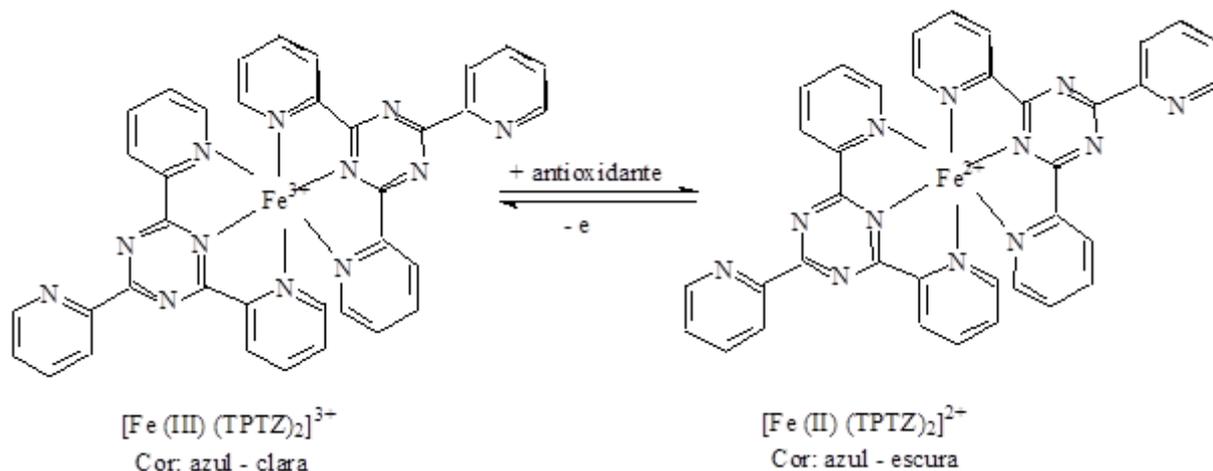


Figura 8. Redução do complexo TPTZ com Fe³⁺.

3.9 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

As bactérias são seres procarióticos relativamente simples, e a grande diversidade de espécies desses microrganismos pode ser diferenciada por diversos fatores como morfologia, composição química, as necessidades nutricionais, atividades bioquímicas e a fonte de energia (TRABULSI et.al., 2004).

As bactérias podem ser divididas em gram-positivas e gram-negativas, de acordo com a constituição da parede celular. Nas primeiras, a parede celular consiste em muitas camadas de peptidoglicano, formando uma estrutura espessa e rígida. E, nas segundas, a parede consiste de uma ou poucas camadas de peptidoglicano e uma membrana externa. Essa última, consiste em lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolípídeos (TORTORA et.al., 2012).

Os antimicrobianos ou antibióticos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações, devem possuir atividade letal ou inibitória contra espécies microbianas, e além de prevenir o desenvolvimento de micro-organismos, devem apresentar estabilidade, não devem apresentar efeitos indesejáveis, dentre outras características (BARBOSA, 2008).

Os estudos da ação antimicrobiana de compostos naturais são de extrema importância, pois o surgimento de cepas bacterianas resistentes aos mais diversos tipos de antibióticos é cada vez maior. Além disso, os antibióticos utilizados atualmente apresentam efeitos colaterais tais como diarreias, vômitos e o aparecimento de manchas dentárias (VALLILO et. al., 2006).

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas no descobrimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos de plantas e outros produtos naturais, para serem aplicados em produtos farmacêuticos e cosméticos. Existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana de extratos e óleos vegetais. Os mais conhecidos incluem o método de difusão em ágar e o método de microdiluição em caldo (OSTROSKY et.al., 2008).

O teste de difusão em ágar é um método físico, no qual o microrganismo é exposto contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada (PINTO et.al., 2003). Se a substância quimioterápica for efetiva contra o microrganismo testado, uma zona ou halo de inibição se formará ao redor do disco após um período de incubação padronizado. O diâmetro da zona pode ser medido e, em geral, quanto maior a zona, maior susceptibilidade do microrganismo à substância estudada (TORTORA et. al., 2012). É feito um controle positivo utilizando-se um quimioterápico padrão, e como negativo o solvente utilizado para a dissolução das amostras (KARAMAN et.al., 2003).

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância testada. A avaliação é comparada frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano. O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos. Os controles positivo e negativo são os mesmos utilizados no teste de difusão em disco (PINTO et.al., 2003).

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os processos de torração e moagem dos cafés, bem como a caracterização físico – química e atividade antioxidante foram conduzidos no Laboratório de Tecnologia e Biomassas do Cerrado, na UFVJM – Diamantina/MG. A extração dos óleos dos grãos de café verde e torrado foi realizada no Laboratório de Fitoquímica, na EMBRAPA Cenargen, Brasília/DF. A atividade antibacteriana foi realizada no Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico, na UFVJM, Diamantina/MG. A composição em ácidos graxos foi feita no Laboratório de Cromatografia no departamento de Química da UFMG, Belo Horizonte/MG. E, as análises de tocoferóis e fitoesteróis, foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos, no ITAL, Campinas/SP.

4.2 MATÉRIA – PRIMA

Foram utilizados grãos crus de café arábica (*Coffea arabica*), cultivar Catuaí Vermelho, produzidos nas regiões de Capelinha, Itamarandiba e Diamantina, Minas Gerais/Brasil. A colheita dos mesmos foi realizada em maio de 2014. De um mesmo lote de grãos crus e secos fornecidos pelos produtores, foram retiradas amostras para torração. A torração foi realizada em torrador da marca Pinhalense, em temperatura 200 – 250°C, equivalente à torra comercial brasileira e, após, tanto os grãos de café torrado quanto os grãos crus foram moído em moinho da marca Pinhalense. Os grãos moídos foram acondicionados em sacos plásticos e, acondicionados sob refrigeração até o momento de utilização.

4.3 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS

Os óleos foram extraídos utilizando cerca de 5,0 gramas dos grãos triturados, com éter de petróleo a 40-60°C utilizando extrator de Soxhlet durante 6 horas. Após a extração, o solvente foi evaporado utilizando nitrogênio gasoso. Os óleos obtidos foram acondicionados em frascos encobertos com papel alumínio, selados e armazenados em geladeira até o momento das análises. A Figura 9 (pág. 17) apresenta a extração dos óleos de café utilizando o extrator de Soxhlet.



Figura 9. Extração dos óleos de café em extrator de Soxhlet. FONTE: arquivo da autora.

4.4 ANÁLISES DOS ÓLEOS EXTRAÍDOS

4.4.1 Características físicas

As características físicas analisadas foram cor e cheiro. A cor foi verificada visualmente e, o cheiro pelo olfato do observador.

4.4.2 Teor de óleo

O teor de óleo foi calculado em base seca. Calculou-se a umidade dos pós de café cru e torrado, de acordo com a metodologia do Instituto Adolf Lutz (1985). Após, calculou-se o teor de óleo pela Equação 1:

$$\text{Teor de óleo (\%)} = \frac{\text{peso de óleo}}{\text{mass de café utilizado na extração} \times \text{diferença de umidade}} \times 100 \quad (1)$$

4.4.3 Características físico-químicas

Os índices de refração, acidez, iodo, saponificação e ácidos graxos livres dos óleos extraídos dos grãos foram determinados conforme os métodos oficiais Instituto Adolf Lutz, 1985.

4.4.3.1 *Índice de refração*

Determinado a 20°C utilizando Refratômetro de Abbé.

4.4.3.2 *Índice de Saponificação*

Pesou-se 2g dos óleos, que foram dissolvidos em 20 mL de solução etanólica de hidróxido de potássio a 4%. Conectou-se um condensador aéreo e deixou-se ferver suavemente até a completa saponificação da amostra, que foi de aproximadamente 30 minutos. Deixou-se resfriar à temperatura ambiente, adicionou-se fenolftaleína e titulou-se com ácido clorídrico 0,5N até desaparecimento da coloração rósea. O cálculo do índice de saponificação, foi realizado pela Equação 2 sendo o resultado expresso em mg KOH.g⁻¹.

$$\text{Índice de Saponificação} = \frac{(B - A) \times N \times 56,1}{\text{massa da amostra}} \quad (2)$$

onde: A: é o volume de ácido clorídrico (mL) gasto na titulação da amostra; B: é o volume de ácido clorídrico (mL) gasto na titulação do branco; N: é a normalidade do ácido clorídrico e massa da amostra (g).

4.4.3.3 *Índice de Iodo*

Pesou-se 0,25g de óleo, que foi dissolvido com 10 mL de clorofórmio. Adicionou-se 20 mL da solução de iodo e, deixou-se em repouso por 30 min, ao abrigo da luz, agitando ocasionalmente. Após, adicionou-se 10 mL da solução recente de iodeto de potássio a 15%, e 100 mL de água destilada. Titulou-se o excesso com tiosulfato de sódio a 0,1N. Quando verificou-se que a solução estava amarelo-clara, adicionou-se 1 mL da solução de amido a 0,5%, como indicador. O cálculo do índice de iodo foi realizado pela fórmula abaixo.

$$\text{Índice de iodo} = \frac{V \times f \times 1,27}{\text{massa da amostra}} \quad (3)$$

onde: é a diferença entre os números de ml da solução de tiosulfato de sódio 0,1N gasto nas titulação do branco e da amostra; f: é o fator da solução de tiosulfato de sódio 0,1N e, massa da amostra (g).

4.4.3.4 Ácidos graxos livres e índice de acidez

Pesou-se 2g de óleo, que foram dissolvidos em 25 mL de solução de álcool etílico: éter etílico (1:1 v/v) neutra. Adicionou-se fenolftaleína e titulou-se com hidróxido de sódio 0,1N. O cálculo dos ácidos graxos livres foi realizado pela Equação 4 e, o resultado expresso em porcentagem de ácido oleico. O índice de acidez = 0,503% dos ácidos graxos livres.

$$\text{Ácidos graxos livres} = \frac{V \times N \times 28,2}{\text{massa da amostra}} \quad (4)$$

onde: V é o volume de hidróxido de sódio (mL) gasto na titulação da amostra; N é a normalidade do hidróxido de sódio e massa da amostra (g).

4.4.4 Composição química

4.4.4.1 Ácidos Graxos

Os ácidos graxos foram identificados de acordo com a metodologia adaptada de Christie (1989).

- *Preparo das amostras*
- *Hidrólise do óleo de café*

O óleo de café foi colocado em tubo criogênico de 2mL (~10 mg), foi dissolvido em 100 µL de uma solução de etanol (95%)/ hidróxido de potássio 1mol/L (5%) e hidrolisado em um forno de microondas doméstico (Panasonic Piccolo), à potência de 80W (Potencia 2), durante 5 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 400µL de ácido clorídrico a 20%, uma ponta de espátula de NaCl (aproximadamente 20 mg) e 600 µL de acetato de etila. Agitou-se em vórtex por 10 s e deixou-se em repouso por 5 min. Uma alíquota de 300µL da camada orgânica foi retirada, colocada em tubos de microcentrífuga e seco por evaporação, obtendo-se assim os ácidos graxos livres.

- *Metilação dos ácidos graxos*

Os ácidos graxos livres foram metilados com 100 µL BF₃ / metanol (14%) e aquecidas durante 10 min em banho de água a 60°C. Foram em seguida diluídos com 400 µL de metanol e analisados por Cromatografia Gasosa.

- *Análise cromatográfica*

As análises foram realizadas em Cromatógrafo a Gás HP7820A equipado com detector por ionização de chamas. Utilizou-se uma coluna HP-INNOWAX (HP) 15m x 0,25mm x 0,25µm com gradiente de temperatura: 150°C, 1min, 7°C/min até 240°C; injetor

(split de 1/50) a 250°C e detector a 260°C. Hidrogênio como gás de arraste a uma vazão de 3 ml/min e, volume de injeção de 1µl. A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados FAME mix C₁₄-C₂₂ (Supelco cat n° 18917).

4.4.4.2 *Fitoesteróis*

Os fitoesteróis foram analisados seguindo a metodologia utilizada por Bragagnolo e Rodriguez - Amaya (1993).

- *Preparo das amostras*

Pesou-se aproximadamente 0,3g da amostra e, adicionou-se 10 mL de KOH etanólica (3%). A mistura foi aquecida em banho – maria à 50°C por 3 horas. Em seguida, a amostra foi resfriada adicionando – se 10 mL de água destilada. Após, extraiu-se quatro vezes com 10 mL de hexano. As frações de hexano foram unidas e, retirou-se uma alíquota, que foi seca sob fluxo de nitrogênio gasoso. Adicionou-se 1 mL de padrão interno 5α-colestano e injetou-se no CG.

- *Análise Cromatográfica*

A cromatografia gasosa foi realizada em um cromatógrafo GC-17A Shimadzu , equipado com amostrador automático, injetor split (razão 1:35), coluna capilar de fase estacionária (5 % Fenil 95 % dimetilpolisiloxano, 30m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm de filme) e detector por ionização em chama (FID). A identificação dos picos foi realizada através de comparação do tempo de retenção das amostras com os padrões e a quantificação por padronização interna, utilizando como padrão interno 5α-colestano (Sigma-Aldrich).

4.4.4.3 *Tocoferóis*

Para a determinação do conteúdo de tocoferóis, foi utilizada o método AOCS (2014).

- *Preparo das amostras*

Pesou-se 1g das amostras e diluiu-se para 10 mL com n-hexano. A mistura foi homogeneizada e filtrada em membrana de celulose regenerada de 0,45 µm e injetada no CLAE.

- *Análise cromatográfica*

Na determinação dos tocoferóis foi utilizada uma bomba marca Lab Alliance, modelo Rad Pump III, detector de fluorescência marca Waters, modelo 2475 e, injetor Rheodyne com

alça amostradora de 200 µL. A separação das quatro formas de tocoferóis, ocorreu em coluna de sílica 60 de 125 x 4 mm de diâmetro interno e partículas de 5µm, tendo como fase móvel hexano: acetato de etila: ácido acético (97,6: 1,8: 0,6 v/v/v) e vazão de 1,5 mL por minuto. Na quantificação foram utilizados comprimentos de onda de 294 nm para excitação e 326 nm para emissão, com padronização externa.

4.4.4.4 *Compostos fenólicos totais*

A extração dos compostos fenólicos totais nas amostras de óleos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Parry et al. (2005). Cerca de um 1g de cada óleo foi agitada em vortex juntamente com 3 mL de álcool metílico e, em seguida, centrifugada a 3000 rpm por 10 min e, o sobrenadante coletado. Este procedimento foi repetido três vezes. Os sobrenadantes foram combinados e o volume foi completado para 10 mL com álcool metílico.

Os compostos fenólicos totais foram quantificados no extrato resultante por espectrofotometria, utilizando reagente de Folin – Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Uma alíquota do extrato metanólico (0,1 mL) foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e misturada com 0,5 mL do reagente Folin – Ciocalteu. Adicionou-se 1,5 mL de solução saturada de carbonato de sódio (20%) e completou-se o volume com água destilada. Após duas horas de reação à temperatura ambiente, a absorbância da mistura foi medida a 765 nm em espectrofotômetro e utilizada para calcular o conteúdo de fenólicos totais nos óleos.

Para a quantificação foi criada uma curva de calibração utilizando ácido gálico (ANEXO) como padrão, em concentrações de 0 a 500 mg.L⁻¹, nas mesmas condições descritas acima. A equação da curva de calibração obtida foi $y = 0,0002x + 0,0736$ com coeficiente de determinação de 0,9939. Os teores de compostos fenólicos totais nos óleos foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de óleo (mg EAG.g⁻¹).

4.4.5 **Atividades biológicas**

4.4.5.1 *Atividade Antioxidante in vitro*

4.4.5.1.1 *Método de Captura do Radical Livre DPPH*

A determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Rufino et al. (2007a). As amostras de

óleos foram diluídas em acetato de etila nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 mg/mL. Em ambiente escuro, alíquotas de 0,1 mL das diluições de cada óleo foram adicionadas a 3,9 mL do radical DPPH 0,06 mM e, homogeneizadas em vortex. Após 60 minutos de reação, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 515 nm.

A solução controle foi preparada utilizando acetato de etila, nas mesmas condições e, o mesmo solvente, foi utilizado como branco. Uma curva analítica do radical DPPH (ANEXO) a 0,06 mM foi traçada com concentrações entre 0 e 60 μ M. A Atividade Antioxidante Total (AAT) foi calculada como a quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (EC50). Calculou-se a eficiência antirradical como sendo o inverso da CE50. A partir das absorvâncias obtidas das diferentes diluições dos óleos, plotou – se um gráfico absorvância versus diluição, encontrando a equação da reta. Após, substituiu – se o valor de y pela metade da absorvância do controle. Todas as concentrações foram analisadas em triplicata.

4.4.5.1.2 *Método de Captura do Radical Livre ABTS.⁺*

A determinação da atividade antioxidante pela captura do radical livre ABTS⁺ foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Rufino et al.(2007b). As amostras de óleos foram diluídas em acetato de etila nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 mg/mL. Em ambiente escuro, alíquotas de 30 μ L das diluições de cada óleo foram adicionadas a 3,0 mL do radical ABTS⁺ e, homogeneizadas em vortex. Após 6 minutos de reação, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 734 nm. Foi utilizado acetato de etila como controle. Uma curva analítica com Trolox (ANEXO) foi traçada com concentrações entre 100 e 2000 μ M.

A partir das absorvâncias obtidas das diferentes diluições dos óleos, plotou – se um gráfico absorvância versus diluição, encontrando a equação da reta. Após, substituiu – se o valor de y pela absorvância equivalente a 1000 μ M de Trolox. Todas as concentrações foram analisadas em triplicata.

4.4.5.1.3 *Método de Redução do Ferro – FRAP*

A determinação da atividade antioxidante pela redução do ferro foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Rufino et al. (2007c). As amostras de óleos foram diluídas em acetato de etila nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 mg/mL. Em ambiente escuro, alíquotas de 90 μ L das diluições de cada óleo foram adicionadas a 270 μ L de água destilada e

2,7 mL do reagente FRAP e, homogeneizadas em vortex e mantidas em banho – maria a 37°C. Após 30 minutos de reação, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595 nm. Foi utilizado o reagente FRAP como controle. Uma curva analítica de sulfato de Fe (II) (ANEXO) foi traçada com concentrações entre 500 e 2000 µM.

A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos óleos, plotou – se um gráfico absorvância versus diluição, encontrando a equação da reta. Após, substituiu – se o valor de y pela metade da absorvância equivalente a 1000 µM de sulfato de Fe (II). Todas as concentrações foram analisadas em triplicata.

4.4.5.2 *Atividade Antibacteriana in vitro*

4.4.5.2.1 *Teste de difusão em ágar*

A avaliação do teste de susceptibilidade dos óleos dos grãos de café cru e torrado contra cepas de bactérias foi feita pelo método de difusão em disco em meio sólido de acordo com as normas do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000).

Foram utilizados como micro-organismos indicadores Gram – negativos *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e, Gram – positivos *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. As cepas foram reativadas em ágar Mueller - Hinton a 37°C durante 24 horas em estufa bacteriológica. Após, as bactérias foram ajustadas com solução salina estéril de acordo com escala 0,5 de turbidez de MacFarland com auxílio de espectrofotômetro a 580 nm, para obtenção de transmitância de 70 a 75%, para padronização do número de bactérias.

As amostras de óleo foram diluídas em Tween 80 a 1%, de modo a ter uma concentração final de 450 mg/mL. Como controles, foram utilizados Tween 80 a 1%, éter de petróleo e, o antibiótico Cloranfenicol 25µg/mL.

Em ambiente estéril, foram colocados em placas de Petri o meio ágar Mueller – Hinton e, 25 µL das soluções de bactérias, que foram espalhadas no meio. Após a secagem, discos de papel de filtro de 8 mm de diâmetro foram embebidos nas amostras dos óleos e dos controles utilizados e, foram colocados sobre o meio. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após este período as placas foram analisadas e, medidos os halos de inibição formados. Esses resultados foram interpretados utilizando-se a tabela padrão de interpretação dos halos de inibição do NCCLS (2000). Desse modo, foram

considerados os seguintes parâmetros: R = resistente (≤ 12 mm de halo de inibição); I = intermediário (13 – 14 mm de halo de inibição); S = sensível (≥ 15 mm de halo de inibição).

O experimento foi realizado em duplicata, sendo que em cada placa foram colocados quatro discos, totalizando oito discos.

4.4.5.2.2 *Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)*

A determinação da CIM foi pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com a descrição em NCCLS (2000), com as mesmas culturas bacterianas utilizadas no método de difusão em disco. O experimento foi realizado em placas de microdiluição estéreis em fundo chato com 96 orifícios. Todos os poços receberam 100 μ L de caldo infusão cérebro e coração (BHI). Em seguida inseriu-se 100 μ L da emulsão dos óleos de café para obtenção da concentração inicial de 25% (225,0 mg.mL^{-1}) na primeira coluna da placa de microdiluição. As concentrações subsequentes dos óleos foram obtida após diluição seriada dos produtos naturais na placa de microdiluição, partindo-se da concentração inicial de 25% (Coluna 1) até 0,012% (Coluna 12), a Tabela 5 mostra as concentrações das diluições em cada coluna da placa.

Tabela 5. Concentrações obtidas nas colunas nas placas, em % e mg.mL^{-1} .

Coluna	Concentração %	Concentração mg.mL^{-1}
1	25	225
2	12,5	112,5
3	6,25	56,25
4	3,125	28,125
5	1,56	14,06
6	0,78	7,03
7	0,39	3,51
8	0,19	1,76
9	0,098	0,88
10	0,049	0,44
11	0,024	0,22
12	0,012	0,11

Para diluição sucessiva, foram pipetados 100 μ L da solução contida na primeira coluna (extrato e meio de cultura) e adicionados na segunda coluna (que continha apenas meio de cultura). Após homogeneização, 100 μ L da solução contida nos poços da segunda coluna, foram pipetados e despejados na coluna seguinte, e assim sucessivamente. Ao fim do processo

de diluição do extrato, 100µL da cultura bacteriana foram acrescidos em cada poço. Para os poços da linha H, foram dispensados 100 µL do conteúdo, de modo a igualar o volume total dos poços, como na Figura 10.

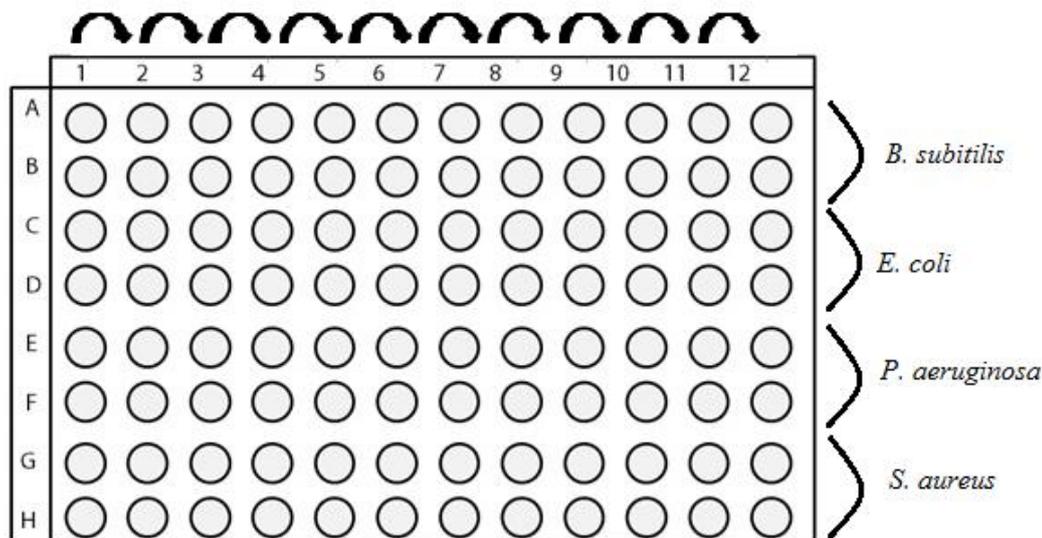


Figura 10. Esquema de diluição para determinação da CIM.

Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas, a 37°C. Passadas 24 horas, para leitura, que foi realizada visualmente, foram adicionados 50µL de tetrafeniltetrazólio (TTC) em cada orifício e, as placas foram incubadas por mais 3 horas.

A CIM correspondeu à última diluição do óleo na qual não foi verificada a presença de multiplicação bacteriana, apresentando coloração avermelhada na presença de células viáveis. Para determinação da CBM, segundo Smith – Palmer (1998) com modificações, retirou-se uma alíquota do material contido nos orifícios que demonstraram inibição no desenvolvimento bacteriano no método de CIM, e semeou-se em placa de Petri estéril contendo meio de cultura Agar Mueller Hinton. Após incubação em estufa bacteriológica por 24 horas, a 37°C, as culturas foram inspecionadas visualmente e os resultados foram interpretados da seguinte maneira: multiplicação bacteriana significou ação bacteriostática e ausência de desenvolvimento do microrganismo significou ação bactericida.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As determinações analíticas foram realizadas em triplicata com exceção dos ácidos graxos, tocoferóis, fitoesteróis e atividade antimicrobiana, que foram realizadas em duplicata. Os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão da média. As correlações

entre as determinações analíticas foram realizadas a 5% de significância ($p < 0,05$) usando o programa Assistat 7.7 beta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA

Com relação à cor, o óleo de café verde apresentou uma cor verde-clara, enquanto que o óleo de café torrado uma cor marrom. Já no que diz respeito ao cheiro, o primeiro apresentou um odor de vegetação e, o segundo cheiro característico de café torrado. A Figura 11 apresenta os óleos extraídos.

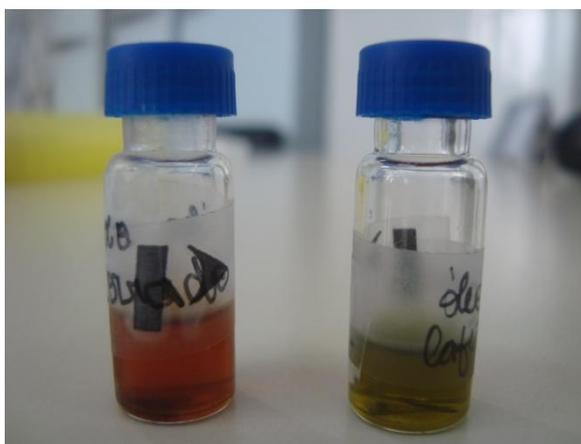


Figura 11. Óleos extraídos dos grãos de café torrado e cru. FONTE: arquivo da autora

5.2 TEOR DE ÓLEO

O teor de óleo obtido à partir dos grãos de café cru e torrado estão na Tabela 6.

Tabela 6. Teor de óleo de café obtido dos grãos de cru e torrado.

	Óleo de café cru	Óleo de café torrado
Teor (%)	4,64 ± 0,22b	26,01 ± 2,10a

*Média ± desvio padrão (n=5). As médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Observa-se que houve diferença significativa entre o teor dos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado, sendo a quantidade do torrado bem superior ao cru. Essa variação são, provavelmente, devido à pirólise que ocorre durante o processo de torração, ela afeta aminoácidos e outros compostos, com perda de água e gás carbônico. Porém, os lipídios parecem sofrer pouco durante a torração, daí a razão de seu aumento relativo (FONSECA; GUTIERREZ, 1971).

Mazzafera et al. (1998) ao estudar teores de óleos obtidos dos grãos de crus das variedades de *C. arabica* encontrou valores que variaram de 8,08 a 29,18%. Já Fonseca e

Gutierrez (1971) encontraram quantidades de 10,89 a 12,71% para óleos de café cru e, de 14,42 a 17,24% para óleos de café torrado. Araújo (2012) cita que o café arábica possui entre 10,5 a 17,7% de óleo. Esses valores são diferentes quando comparados com o presente estudo, mas sabe-se que condições climáticas e geográficas, época da colheita dos grãos, armazenamento dos mesmos, bem como, solvente utilizado na extração, tempo e temperatura afetam a quantidade de óleo obtida (PIMENTA, 2003), o que provavelmente, pode explicar os resultados encontrados.

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

As características físico – químicas dos óleos extraídos dos grãos de café verde e torrado são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Composição físico – química dos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado.

Óleos de Café	Índice de Refração (20°C)	Ácidos Graxos Livres (mg KOH.g ⁻¹)	Índice de Acidez (%)	Índice de Iodo (g I ₂ .100g ⁻¹)	Índice de Saponificação (mg KOH.g ⁻¹)
Cru	1,4511±0,01a	5,30±0,44a	2,67±0,22a	115,26±0,08b	190,41±0,37b
Torrado	1,4667±0,00a	4,57±0,12b	2,31±0,05a	119,71±0,14a	197,91±0,39a

*Média ± desvio padrão (n=3). As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

O índice de refração de um óleo aumenta com o comprimento da cadeia carbônica e com o grau de insaturação dos ácidos graxos constituintes dos triglicerídios. Isso ocorre pelo fato de que óleos e gorduras possuem poderes de refringência diferentes, que de acordo com sua natureza, desviam com maior ou menor intensidade os raios luminosos que os atravessam (MORETTO; FETT, 1998). De acordo com os resultados obtidos, observa-se que o óleo de café torrado apresenta um valor maior que o do óleo de café cru, mas esses valores não diferiram estatisticamente. Estes resultados são consistentes com os encontrados por Lago (2001), que encontrou valores para óleos de café torrado de 1,459 e 1,462 e, óleos de café verde de 1,460; 1,458 e 1,461.

Os ácidos graxos livres e o índice de acidez estão relacionados com o desenvolvimento de reações hidrolíticas no óleo. A acidez livre de um óleo decorre da hidrólise parcial dos glicerídeos, o que a torna uma variável intimamente relacionada com a natureza e a qualidade da matéria-prima, com a qualidade e com o grau de pureza da amostra, com o processamento e com as condições de conservação (MORETTO; FETT, 1998).

O Codex Alimentarium Commission (2009) determina como parâmetro de qualidade para óleos brutos uma acidez máxima de 4,0 mg KOH/g. Observa-se que os óleos estudados, apresentaram uma acidez entre 2,67 e 2,31, sem diferença significativa, logo apresentam valores que estão entre os permitidos para óleos brutos.

Nota – se que houve diferença significativa entre os teores de ácidos graxos livres. Essa diferença, pode ser devido a fatores que aceleram a formação de ácidos graxos livres, a partir de reações de hidrólise de acilgliceróis, como aquecimento, luz e ação enzimática. As porcentagens dos ácidos graxos encontradas nesse trabalho estão em similaridade com as encontradas por Lago (2001), em para óleos de café verde encontrou – se valores entre 5,5 e 5,9 e, para café torrado, 3,9 e 7,2.

O índice de iodo é um teste empírico que indica o grau de insaturação de um óleo. Sob determinadas condições, o iodo pode ser quantitativamente introduzido nas duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, razão que, quanto maior a insaturação de um ácido graxo, maior será sua capacidade de absorção de iodo e, conseqüentemente, maior também será seu índice (MORETTO; FETT, 1998). Para as amostras avaliadas, esse índice variou entre 115,26 g I₂.100g⁻¹ para o óleo de café verde e, 119,71 g I₂.100g⁻¹ para óleo de café torrado, diferindo estatisticamente.

Conforme o valor do índice de iodo, os óleos vegetais podem ser classificados em secativos (índice de iodo maior que 130 g I₂.100g⁻¹), semi-secativos (índice de iodo de 115 a 130 g I₂.100g⁻¹) e não-secativos (índice de iodo menor que 115 g I₂.100g⁻¹). Os óleos conhecidos como secativos são aqueles tipicamente insaturados, capazes de formar um filme elástico pela absorção de oxigênio do ar, enquanto que, os não secativos apresentam uma quantidade maior de ácidos saturados e não são capazes de formar filme em contato com o ar. Assim, de acordo com os índices de iodo obtidos, os óleos extraídos dos grãos de café verde e torrado, são classificados como semi - secativos. Exemplos de óleos secativo, semi-secativo e não secativo são os óleos de soja, milho e oliva, respectivamente (VAN DE MARK; SANDEFUR, 2005).

O índice de saponificação indica o peso molecular médio dos ácidos graxos esterificados ao glicerol na molécula de triacilglicerol, ou seja, um índice de saponificação elevado indica ácidos graxos de pesos moleculares baixos e vice-versa. Para os óleos vegetais, quanto mais altos os índices de saponificação, maior é a indicação do uso dos mesmos para fins alimentares (MORETTO; FETT, 1998). Os óleos estudados apresentaram índices de saponificação que variaram entre 190,41 mg KOH.g⁻¹ para óleo de café verde e, 197,91 mg KOH.g⁻¹ para o óleo de café torrado, que diferiram estatisticamente. Estes valores estão de

acordo os de Lago (2001), que encontrou tal índice para óleo de café verde entre 180,0 a 200,0 mg KOH.g⁻¹ e, para óleo de café torrado entre 180,0 a 199,0 mg KOH.g⁻¹.

5.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

5.4.1 Ácidos graxos

A composição de ácidos graxos dos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado estão apresentados na Tabela 8. No total foram identificados 10 ácidos graxos, correspondendo a 95,4% e 95,8% do total identificado, do óleo de café cru e torrado, respectivamente.

Tabela 8. Composição em ácidos graxos dos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado*.

Ácidos Graxos	Tempo de retenção (min)	Óleo de café cru	Óleo de café torrado
C14:0 (mirístico)	1,72	0,8±0,42b	4,3±0,17a
C16:0 (palmítico)	2,48	34,3±0,82a	32,2±0,86a
C16:1 (palmitoléico)	2,60	0,5±0,18a	0,2±0,04a
C17:0 (margárico)	3,24	0,4±0,13a	0,4±0,20a
C18:0 (esteárico)	4,05	7,9±0,36a	8,1±0,02a
C18:1 (oleico)	4,20	9,8±0,39a	10,6±0,28a
C18:2 (linoleico)	4,63	37,2±0,56a	36,1±0,67a
C18:3 (linolênico)	5,21	0,9±0,03a	1,2±0,14b
C20:0 (araquídico)	5,90	2,8±0,15a	2,2±0,09b
C22:0 (behêmico)	7,85	0,8±0,06a	0,5±0,05a

*média ± desvio padrão (n=2). Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Ainda de acordo com a Tabela 8, observa-se que a composição em ácidos graxos de ambos os óleos estudados são bem parecidas. Nota-se que apenas os ácidos mirístico (C14:0), linolênico (C18:3) e araquídico (C20:0) diferiram estatisticamente entre si. Os ácidos graxos majoritários foram, para ambos os óleos, linoleico (C18:2), palmítico (C16:0) e oleico (C18:1). Esses dados estão de acordo com os obtidos por Fonseca e Gutierrez (1971). Os cromatogramas obtidos para ambos os óleos estudados estão apresentados nas Figuras 12 e 13.

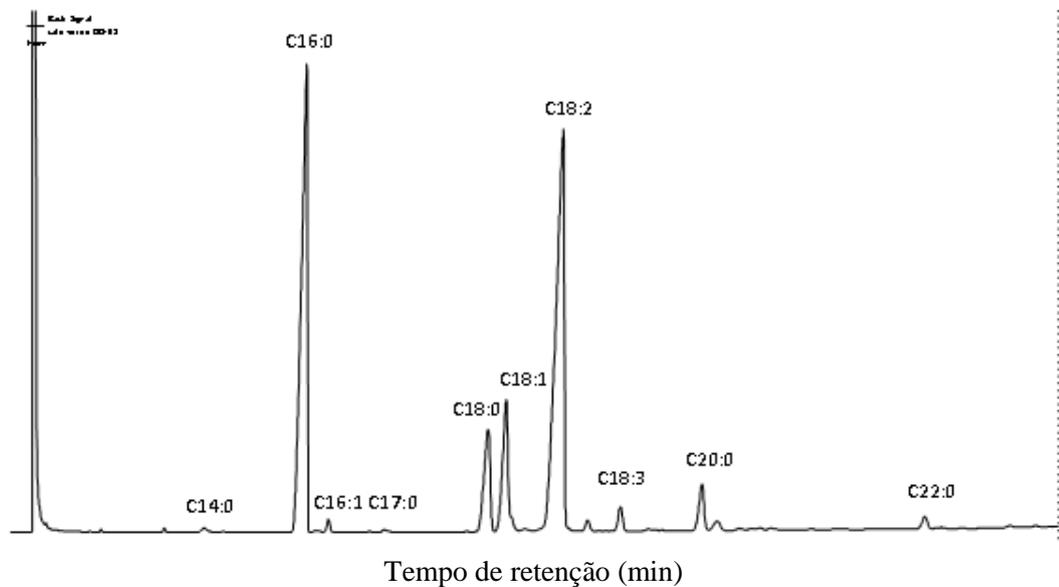


Figura 12. Cromatograma da análise, por cromatografia gasosa, de ácidos graxos em óleo extraído do grãos de café cru.

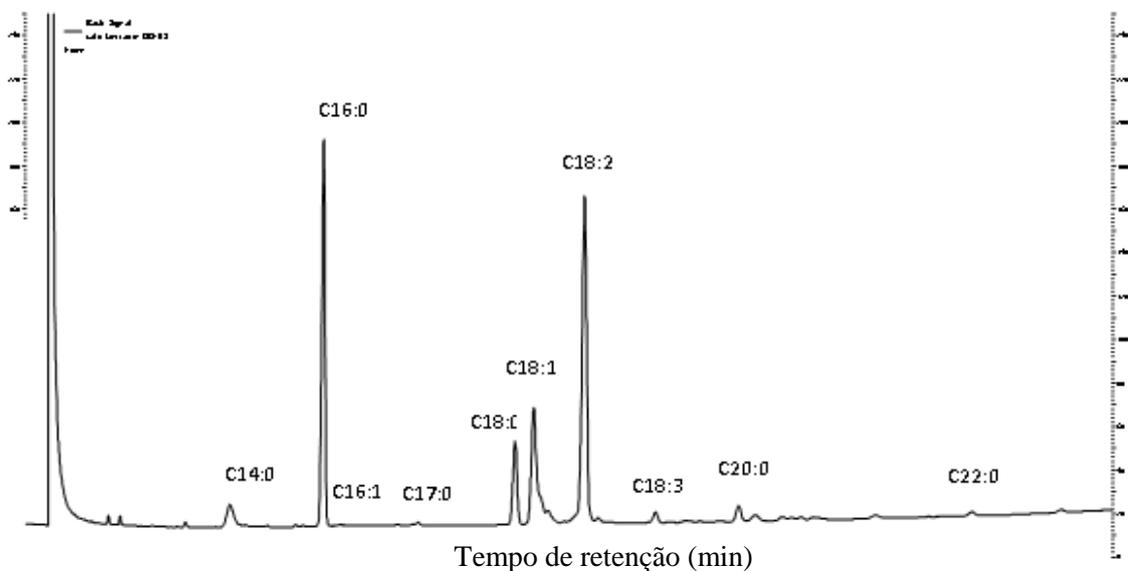


Figura 13. Cromatograma da análise, por cromatografia gasosa, de ácidos graxos em óleo extraído do grãos de café torrado.

Dentre os ácidos graxos saturados encontrados, os ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) foram os predominantes nos óleos. Este resultado é coerente com o fato de que esses ácidos saturados são os mais abundantes nos lipídios vegetais. O teor de ácido palmítico apresentou pouca variação do seu teor do estado cru para o torrado, sugerindo que a torração tenha pequena influência na estabilidade do referido ácido graxo (FONSECA; GUTIERREZ, 1971). O ácido behêmico foi encontrado em baixas porcentagens, 0,8% para o óleo de café cru e 0,5% no de café torrado. Tal fato é desejável uma vez que óleos com altas concentrações de ácido behêmico podem ser de difícil digestão enzimática para humanos e animais, representando sérias implicações para utilização nutricional. Foi encontrado pequena

quantidade de ácido margárico (C17:0), um ácido graxo saturado com número ímpar de átomos de carbono. Esse tipo de ácido graxo é raro, mas pode ocorrer em pequenas quantidades em microrganismos, plantas, animais e humanos, assim como o ácido pentadecílico (C15:0). O ácido linolênico está presente em ambos os óleos, mas em níveis baixos. Este ácido graxo, normalmente, ou está totalmente ausente ou presente em quantidades muito pequenas, na maioria dos óleos de sementes oleaginosas (AKPINAR et.al., 2001).

Observando a Tabela 9, os óleos de café apresentaram teor de ácidos graxos insaturados maior que de saturados. Mas, o óleo de café cru apresentou maior quantidade de insaturados, apesar da pouca diferença. O maior valor de ácidos graxos saturados no óleo de café torrado pode ser devido à elevada temperatura utilizada na torração, em que pode haver quebra de ligações e formação de ácidos saturados.

Tabela 9. Quantidade total em porcentagem de ácidos graxos insaturados, monoinsaturados, poliinsaturados e saturados dos óleos de café cru e torrado.

	Óleo de café cru	Óleo de café torrado
Insaturados Totais	48,4	48,1
Monoinsaturados	10,3	10,8
Poliinsaturados	38,1	37,3
Saturados	47,0	47,7
OLE/LIN*	1/3,34	1/3,41
SAT/INS**	1/1,03	1/0,99

*Relação entre o total de ácidos oleico e linoleico. **Relação entre o total de ácidos graxos saturados e insaturados.

Quanto maior a quantidade de ácido linoleico em relação ao oleico, melhor é a qualidade do óleo vegetal em evitar a formação do mau colesterol. Conforme os dados da Tabela 8, os valores da relação ácido oleico/linoleico foram de 1/3,34 para o óleo de café cru e, de 1/3,41 para o óleo de café torrado.

Os resultados encontrados para a relação ácidos graxos saturados/insaturados foram de 1/1,03 e 1/0,99, para os óleos de café cru e torrado, respectivamente. Esses valores são bem menores quando comparados a óleos convencionais, como óleo de soja (1/5,7) e óleo de milho (1/6,7), em que a proporção de ácidos graxos insaturados é maior.

Foi realizada uma correlação entre os ácidos graxos insaturados, saturados, monoinsaturados e poliinsaturados e, os índices de refração, iodo e saponificação, para cada óleo estudado e, os resultados estão nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Coeficientes de correlação entre os índices de refração (IR), iodo (II) e saponificação (IS) e a composição de ácidos graxos insaturados totais (AGIT), monoinsaturados (AGM), poliinsaturados (AGP) e saturados (AGS), do óleo extraído do grão de café cru.

	IR	II	IS
AGIT	0,69	0,08	-0,49
AGM	0,69	0,08	-0,48
AGP	0,61	0,08	-0,49
AGS	-0,69	-0,08	0,49

Tabela 11. Coeficientes de correlação entre os índices de refração (IR), iodo (II) e saponificação (IS) e a composição de ácidos graxos insaturados totais (AGIT), monoinsaturados (AGM), poliinsaturados (AGP) e saturados (AGS), do óleo extraído do grão de café torrado.

	IR	II	IS
AGIT	0,80	0,61	-0,76
AGM	-0,70	0,61	-0,76
AGP	0,82	0,61	-0,76
AGS	-0,80	0,61	-0,76

O índice de refração do óleo de café cru se correlacionou positivamente com as classes de ácidos graxos que possuem duplas ligações e, negativamente com os que não possuem. Esse índice é dependente do grau de insaturação das moléculas e, pouco dependente do comprimento da cadeia dos ácidos graxos. Indicando que o aumento de insaturações levam a um aumento desse parâmetro. Já o índice de iodo se correlacionou de maneira positiva com os ácidos graxos insaturados, mono e poliinsaturados e, negativa com os saturados, o que coerentemente era de se esperar, já que esse parâmetro está relacionado com as insaturações dos ácidos graxos. E, com relação ao índice de saponificação, as classes de ácidos graxos com insaturações estudadas estabeleceram uma correlação negativa com esse índice e, positiva com os que não possuem insaturação. Como o parâmetro em questão está relacionado com o peso médio dos ácidos graxos, sabe-se que insaturações não apresentam relação com tal índice.

Com relação ao óleo de café torrado, os ácidos graxos insaturados e poliinsaturados tiveram uma correlação positiva, indicando que o grau de insaturação está intimamente relacionado com um aumento desse índice. A correlação do índice iodo foi positiva para todos os ácidos graxos, apesar de se saber que esse parâmetro está relacionado com as insaturações. E, o índice de saponificação se correlacionou de maneira negativa para todos os óleos.

Apesar de apresentar correlações entre esses parâmetros, as correlações tanto para o óleo de café cru quanto para o óleo de café torrado não foram significativas, pelo fato de apresentarem um valor de $p > 0,05$.

5.4.2 Fitoesteróis

Os resultados da composição dos fitoesteróis dos óleos dos grãos de café cru e torrado estão apresentados na Tabela 12. Observa-se que o óleo de café cru contém uma quantidade de fitoesteróis superior ao óleo de café torrado.

Tabela 12. Composição de fitoesteróis em óleos de café cru e torrado*.

Fitoesteróis	Óleo de café cru (mg/100g)	Óleo de café torrado (mg/100g)
β – sitosterol	431,20 ± 6,99a (59,94)	352,31 ± 5,21b (58,82)
Brassicasterol	ND < 13,00** (0)	ND < 13,00** (0)
Campesterol	114,38 ± 2,11a (15,90)	96,92 ± 0,68b (16,18)
Estigmasterol	173,79 ± 3,34a (24,16)	149,76 ± 1,53a (25,00)
Totais	719,37a (100)	598,99b (100)

*Média ± desvio padrão (n=2). Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado Teste de Tukey ao nível de 5% de significância. **ND: Não detectado. Entre parênteses são os valores em porcentagem.

Observa – se que o β – sitosterol foi o isômero predominante em ambos os óleos estudados. O óleo do café cru foi o que apresentou as maiores quantidades dos fitoesteróis detectados e, conseqüentemente, maior teor de fitoesteróis totais, sendo que o estigmasterol foi o único que não foi estatisticamente diferente. Em ambos os óleos, não foram detectados o brassicasterol. As Figuras 14 e 15 apresentam os cromatogramas obtidos.

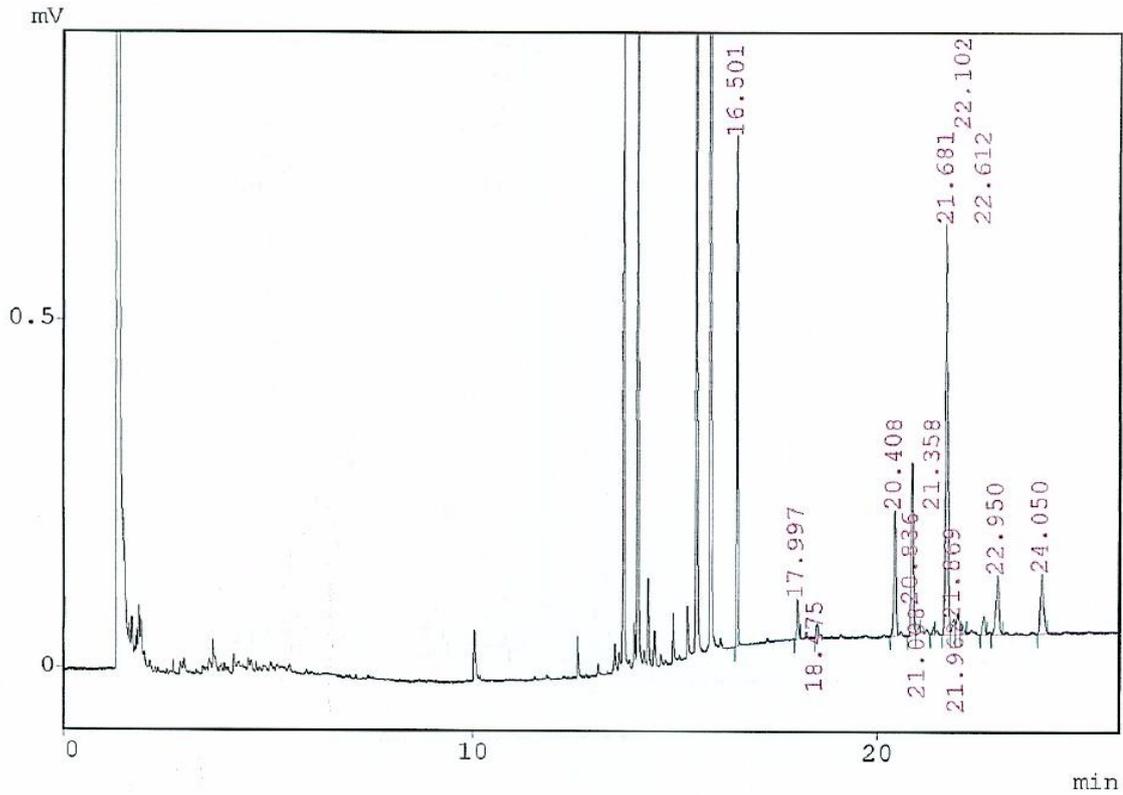


Figura 14. Cromatograma da análise, por cromatografia gasosa, de fitoesteróis, em óleo extraído do grãos de café cru. Tempos de retenção (min): 16.501: colestano (padrão interno); 20.408: campesterol; 20.836: estigmasterol; 21.681: β -sitosterol.

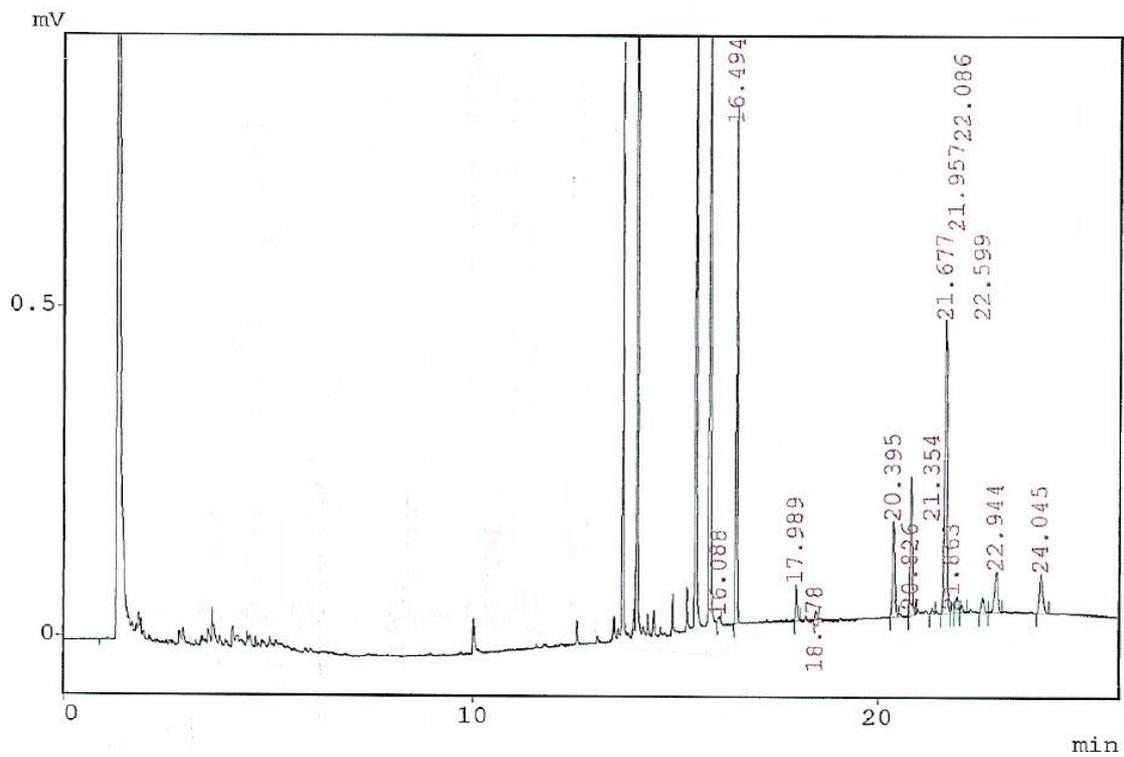


Figura 15. Cromatograma da análise, por cromatografia gasosa, de fitoesteróis, em óleo extraído do grãos de café torrado. Tempos de retenção (min): 16.494: colestano (padrão interno); 20.395: campesterol; 20.826: estigmasterol; 21.677: β -sitosterol.

Os resultados obtidos estão em consonância com os de Lugo & Antoniassi (2000), que analisaram óleos de grãos de café cru, torrado e da borra. Os valores encontrados para o óleo de café cru foi de 16,03% de campesterol, 21,23% de estigmasterol e, 48,72% de β – sitosterol. Já para o de café torrado foram 15,66% de campesterol, 22,82% de estigmasterol e, 52,27% de β – sitosterol. Os resultados, em porcentagem, dos óleos do presente estudo, foram para o óleo de café cru, 59,94% de β – sitosterol, 15,90% de campesterol e, 25,16% de estigmasterol. E, para o óleo de café torrado, 58,82% de β – sitosterol, 16,18% de campesterol e 25,00% de estigmasterol. Apesar de apresentarem diferenças numéricas, nota – se que em ambos os estudos e, em ambos os óleos, o isômero β – sitosterol foi o predominante e, não foram detectados a presença de brassicasterol. A ordem para os óleo estudados foi: β – sitosterol > estigmasterol > campesterol.

A maioria dos óleos vegetais contém de 100 – 500 mg de fitoesteróis/100 g de óleo, sendo o β – sitosterol o composto presente em maior abundância, representando de 50 a 80% do conteúdo de óleo (ITO, 2007).

5.4.3 Tocoferóis

Na Tabela 13 são apresentadas as composições de tocoferóis dos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado. As concentrações de tocoferóis totais variaram de 111,28 a 301,43 mg.100⁻¹ g. O β – tocoferol foi o predominante no óleo de café cru e, o γ – tocoferol no óleo de café torrado. O δ – tocoferol é encontrado naturalmente em pequenas quantidades nos lipídios e, foi quantificado somente no óleo de café torrado (1,39±0,00 mg.100⁻¹ g).

Tabela 13. Composição de tocoferóis em óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado*.

Tocoferóis	Óleo de café cru (mg/100g de óleo)	Óleo de café torrado (mg/100g de óleo)
α -tocoferol	26,57±0,38a (23,88)	24,52±1,69b (8,13)
β – tocoferol	66,79±0,01b (60,02)	93,52±3,59a (31,03)
γ -tocoferol	17,92±0,35b (16,10)	182,00±5,00a (60,38)
δ -tocoferol	ND** (0)	1,39±0,00a (0,46)
Tocoferol Total	111,28b (100)	301,43a (100)

*média ± desvio padrão (n=2). Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado Teste de Tukey ao nível de 5% de significância. **Não detectado. Entre parênteses estão os valores em porcentagem.

Comparando os óleos de café, o óleo de café cru apresentou em sua composição em tocoferóis, 23,88% de α -tocoferol, 60,02% de β -tocoferol e 16,10% de γ -tocoferol, não sendo detectado o isômero δ -tocoferol. Já no óleo de café torrado, 8,13% é pela presença do α -tocoferol, 31,03% de β -tocoferol, 60,38% de γ -tocoferol e, 0,46% de δ -tocoferol. Observa-se que no primeiro óleo, o isômero predominante foi o β -tocoferol e, no segundo, o γ -tocoferol, de acordo com as Figuras 16, 17 e 18. González et al. (2000) ao estudar os óleos de café, verificou que em ambos os óleos (cru e torrado), o isômero majoritário foi o β -tocoferol, seguido pelo α e γ -tocoferol no óleo de café cru e, γ e α -tocoferol no óleo de café torrado, não sendo identificado o δ -tocoferol em nenhum óleo. Isso pode estar relacionado com diferenças ecológicas e geográficas onde foram colhidos os grãos (AKPINAR et.al., 2001).

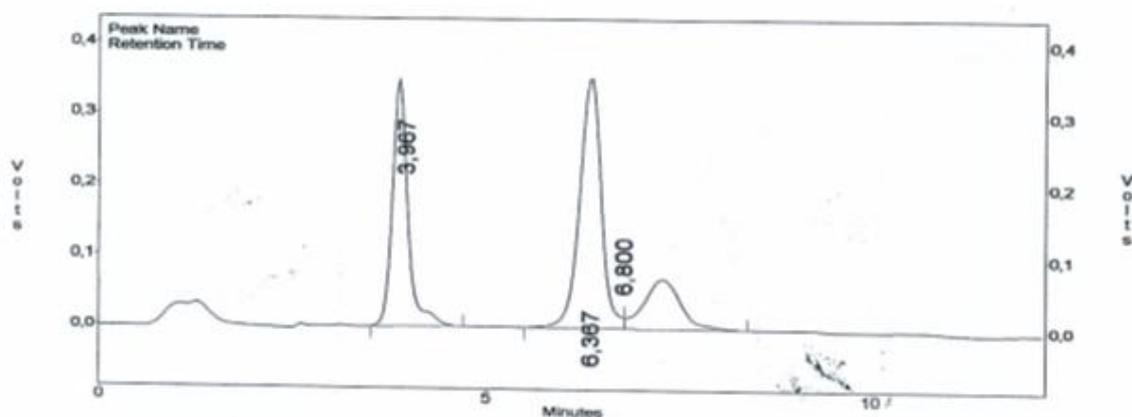


Figura 16. Cromatograma de análise, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, de tocoferóis no óleo extraído dos grãos de café cru. Tempos de retenção: 3,967: α -tocoferol; 6,367: β -tocoferol; 6,800: γ -tocoferol.

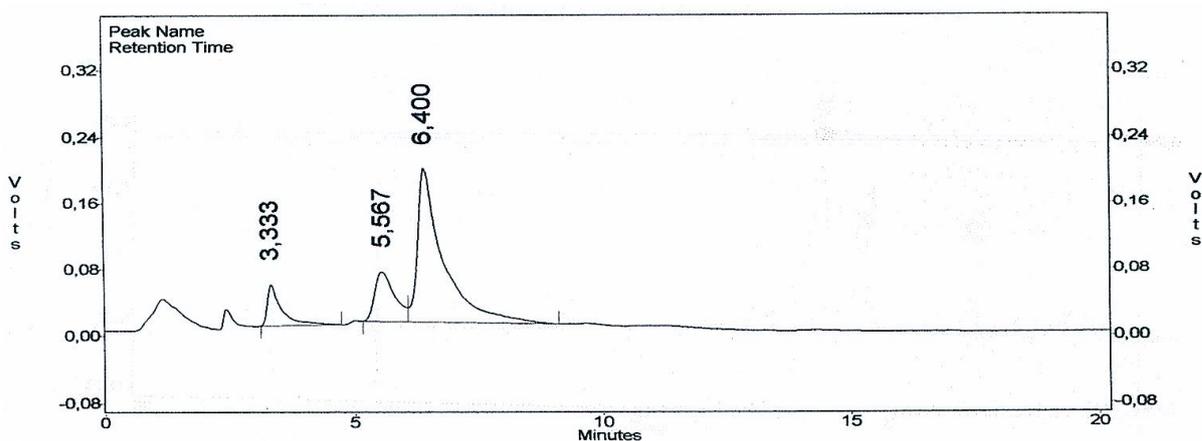


Figura 17. Cromatograma de análise, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, de tocoferóis no óleo extraído dos grãos de café torrado. Tempos de retenção: 3,333: α -tocoferol; 5,567: β -tocoferol; 6,400: γ -tocoferol.

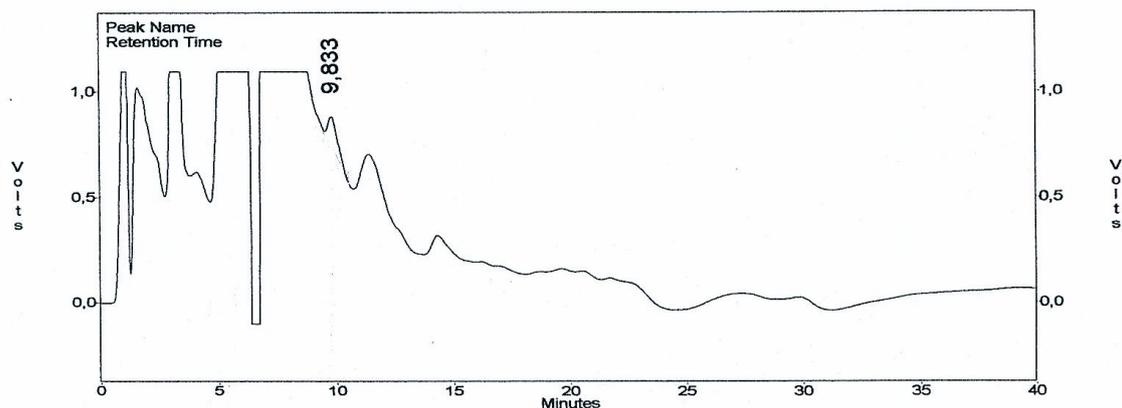


Figura 18. Expansão do cromatograma de análise, obtido por cromatografia líquida de alta eficiência, de tocoferóis no óleo extraído dos grãos de café torrado. Tempo de retenção: 9,833: δ -tocoferol.

Foi realizada uma correlação entre os tocoferóis totais com o conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados. Para ambos os óleos encontrou-se uma correlação significativa com valores iguais de $r = 0,99$ ($p < 0,05$). Altos conteúdos de tocoferóis estão relacionados com as quantidades de ácidos graxos poliinsaturados (TUBEROSO et.al., 2007). Isso pode estar relacionado, ao fato de que, como os ácidos graxos são susceptíveis a reações de oxidação, há na própria composição do óleo, compostos antioxidantes que os protegem e, como os tocoferóis fazem parte desta classe (juntamente com outros compostos), pode-se influir que esses agentes protegem esses ácidos dos radicais, indicando que quanto maior a quantidade de tocoferóis maior a quantidade desses ácidos poliinsaturados.

5.4.4 Compostos fenólicos totais

Conforme a Tabela 14, observa-se que para o óleo de café verde obteve-se 343,0 mg EAG.Kg⁻¹ de compostos fenólicos e, para o de café torrado 808,3 mg EAG.Kg⁻¹, diferindo estatisticamente. Os valores encontrados mostram que os óleos de café possuem uma boa quantidade de compostos fenólicos, mas que o óleo dos grãos de café torrado possui uma quantidade bem superior aos óleos dos grãos de café verde. Isso, se deve ao processo de torrefação. A torrefação afeta a composição dos compostos fenólicos por meio de reações de Maillard. Esses compostos são formados pela degradação térmica de carboidratos, ácido clorogênico e ligninas, assim, o tempo e a temperatura utilizados no processo de torrefação influenciam a composição e o fenol formado (ARAÚJO, 2012).

Tabela 14. Concentração de compostos fenólicos nos óleos de café cru e torrado*.

Óleos	Compostos fenólicos (mg EAG.Kg⁻¹)
Café Cru	343,0 ± 1,73 b
Café Torrado	808,3 ± 1,53 a

*média ± desvio padrão (n=3). As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Na análise dos compostos fenólicos totais utilizou-se o reagente de Folin – Ciocalteu, que mede a capacidade de um composto ou mistura de compostos em reduzir o ácido fosfomolibdico – fosfotúngstico a um complexo de coloração azul (AINSWORTH; GILLESPIE, 2007). No entanto, a presença de compostos facilmente oxidáveis, como hidratos de carbono, aminas aromáticas, ácido ascórbico, entre outros, que não são considerados como fenólicos, pode resultar na formação de complexos azuis, causando uma superestimação dos compostos fenólicos totais (HUANG et.al., 2005).

Segundo Parry et al. (2005), o solvente de extração apresenta forte influência na determinação de compostos fenólicos totais, uma vez que a polaridade do solvente interfere nos tipos de compostos extraídos.

Realizou-se correlação entre os teores de tocoferóis totais e compostos fenólicos totais, para se saber se dentro da classe dos fenólicos há tocoferóis, já que esses também são fenóis. Obteve-se uma correlação positiva significativa entre o esses compostos no óleo de café cru ($r = 0,41$; $p < 0,05$), esse valor de r indica uma correlação moderada e, mostra que quanto maior a quantidade de compostos fenólico, maior o conteúdo de tocoferóis totais. Já no óleo de café torrado, essa correlação foi negativa e não significativa entre as variáveis analisadas ($r = -0,16$; $p > 0,05$).

5.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.5.1 Atividade antioxidante

Os resultados da avaliação da capacidade antioxidante dos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado frente ao radical DPPH estão apresentados na Tabela 15. Ambos os óleos demonstraram capacidade sequestradora do radical em questão, no entanto, o óleo de café cru se mostrou mais efetivo (89,82%). Apesar de a porcentagem de atividade antioxidante das amostras apresentarem valores próximos, esses, foram diferentes estatisticamente.

Tabela 15. Atividade antioxidante, CE50 e eficiência antirradical pelo método DPPH nos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado*.

	Atividade Antioxidante (%)	CE50 (g óleo.g⁻¹DPPH)	Eficiência antirradical (x10³)
Óleo de café cru	89,82a	1,59 x 10 ⁻⁴ b	6,29a
Óleo de café torrado	85,77b	0,021a	0,048b

*média ± desvio padrão (n=3). As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

A concentração eficiente consiste na quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, assim, quanto menor o valor de CE50, maior o poder antioxidante do composto. Diante disso, o óleo de café cru foi o mais eficiente, pelo fato de sua CE50 ser menor que a do óleo de café torrado, apesar, de o valor obtido para esse óleo, ser pequeno também.

Assim como nos outros parâmetros, o óleo de café cru foi o que apresentou maior valor de eficiência antirradical, em comparação com o óleo de café torrado. Vale ressaltar, que quanto maior a eficiência antirradical de um composto, maior será sua atividade como antioxidante.

A atividade antioxidante dos óleos estudados também foi avaliada pela captura do radical livre ABTS^{•+} e, pelo método de redução do ferro (FRAP) e os resultados estão expostos na Tabela 16. O óleo de café torrado foi o mais eficaz frente aos radicais testados e, em ambos os métodos, os resultados diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 16. Atividade antioxidante pelos métodos ABTS^{•+} e FRAP nos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado*.

Método antioxidante	Óleo de café cru	Óleo de café torrado
ABTS ^{•+} (µM trolox/g óleo)	4190,49±36,09b	9669,26±19,61a
FRAP (µM sulfato ferroso/g óleo)	4480,97±62,28b	6208,54±35,80a

*média ± desvio padrão (n = 3). Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Observou-se que os ensaios ABTS^{•+} e FRAP obtiveram valores muito altos de atividade antioxidante. Há algumas razões por meio das quais se pode explicar, a primeira, se baseia no comprimento de onda ao qual realizou-se as medidas para cada método. O ensaio ABTS^{•+} utilizou um comprimento de 732 nm e, o FRAP de 595nm e, há interferências na medição de compostos coloridos como antocianinas e carotenóides, que absorvem comprimentos de onda diferentes. Outra razão poderia estar relacionado com a conformação estrutural dos radicais. Sabe-se que um antioxidante pequeno possui maior acesso ao radical e, com isso, maior atividade antioxidante. A estrutura dos radicais em questão é planar, o que

faz com que reajam mais facilmente com redutores, o ABTS^{•+} tanto pela transferência de um elétron quanto de um hidrogênio e, o FRAP, pela de um elétron. O que não ocorre com o DPPH, que está impedido estericamente (RIO, 2013).

Outro fator importante é que o ABTS^{•+} pode ser dissolvido tanto em solventes aquosos quanto orgânicos e, pode-se medir sua atividade antioxidante tendo em conta a natureza tanto hidrofílica quanto lipofílica dos antioxidantes na amostra. Ao contrário dos métodos DPPH e FRAP, o primeiro é solubilizado em meio orgânico e, o segundo, em meio aquoso. Isso é um limitante, visto a natureza dos compostos presentes no meio (RIO, 2013).

Foi feita a correlação entre o teor de tocoferóis totais e seus isômeros analisados e a composição de compostos fenólicos totais, com os métodos antioxidantes testados DPPH, ABTS^{•+} e FRAP, em ambos os óleos. Os resultados estão expressos nas Tabelas 17 e 18.

Nota-se que para ambos os óleos, todos os parâmetros analisados nenhum obteve correlação com o método DPPH. Apesar das amostras estudadas obtiverem resultados satisfatórios frente a esse radical, nenhum destes compostos foram os responsáveis pela atividade antioxidante observada. Sabe-se que o grão de café, bem como seu óleo, são ricos em vários compostos, sugerindo-se que outros componentes, que não os analisados, sejam os responsáveis por essa ação.

Tabela 17. Coeficientes de correlação entre tocoferóis totais, α -, β -, γ - tocoferol e compostos fenólicos totais e, os métodos de determinação da atividade antioxidante DPPH, ABTS^{•+} e FRAP, do óleo extraído do grão de café cru.

	Tocopheróis totais	α- tocoferol	β- tocoferol	γ- tocoferol	Compostos fenólicos totais
DPPH	0	0	0	0	0
ABTS ^{•+}	0,82	-0,82	-0,82	-0,82	-0,18
FRAP	0,53	-0,53	-0,53	0,54	-0.33

Tabela 18. Coeficientes de correlação entre tocoferóis totais, α -, β -, γ - e δ -tocoferol e compostos fenólicos totais e, os métodos de determinação da atividade antioxidante DPPH, ABTS^{•+} e FRAP, do óleo extraído do grão de café torrado.

	Tocopheróis totais	α-tocoferol	β-tocoferol	γ-tocoferol	δ-tocoferol	Compostos fenólicos totais
DPPH	0	0	0	0	0	0
ABTS ^{•+}	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82	-0,20
FRAP	0	0	0	0	0	0,98*

*correlação significativa ($p < 0,05$).

Com relação método ABTS^{•+} coerentemente, o óleo de café torrado apresentou uma correlação positiva forte tanto para os tocoferóis totais, quanto para seus isômeros. Isso sugere que a atividade antioxidante observada para esse óleo por esse método é devido à presença

dos tocoferóis. No óleo de café cru, houve uma correlação positiva forte somente para os tocoferóis totais, sendo negativa para os isômeros analisados. Sabe-se que esses isômeros podem apresentar outras formas de ocorrência que não sejam biologicamente ativas. Como exemplo, pode-se citar o α -tocoferol, em que sua forma de ocorrência natural e ativa é o RRR- α -tocoferol, que é um dos esteroisômeros possíveis de se encontrar (JONES; KUBOW, 2009), sendo essa, uma possível justificativa para o resultado obtido. Nos óleos analisados, houve uma correlação negativa fraca com os compostos fenólicos, indicando que por esse método, esses componentes não interferiram.

Pelo método FRAP, o óleo de café cru se correlacionou de maneira positiva com os tocoferóis totais e o isômero γ -tocoferol, indicando, que possivelmente, essa isoforma seria a responsável por tal atividade, já que a amostra em questão se correlacionou de maneira negativa com os compostos fenólicos. No óleo de café torrado, os tocoferóis não se correlacionaram com o método FRAP, ao passo que houve uma correlação significativa positiva e forte com os compostos fenólicos. Isso indica que os fenólicos presentes no óleo de café torrado apresentam capacidade de redução do íon ferro pela doação de um elétron, sendo, pelos compostos analisados, os responsáveis pela ação antioxidante observada.

5.5.2 Atividade antibacteriana

Na técnica de difusão em disco, os resultados obtidos com os óleos de café cru e torrado estão apresentados na Tabela 19. Verificou-se que na concentração de 450 mg/mL (50% v/v) apenas a *Pseudomonas aeruginosa* apresentou halos de inibição para ambos os óleos testados. Os mesmos, não produziram halos de inibição para os outros microrganismos avaliados. Os discos utilizados como controles negativos (veículo e solvente), também não demonstraram qualquer atividade inibitória sobre as bactérias.

Tabela 19. Halos de inibição dos óleos de café cru e torrado e controles, frente às bactérias *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Tratamentos	Halos de Inibição (mm)*			
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Éter de petróleo	0c	0c	0c	0c
Tween 80 a 1%	0c	0c	0c	0c
Cloranfenicol	6,58 ± 1,08b	7,97 ± 0,79b	7,54 ± 0,98b	6,09 ± 0,56b
Óleo de café cru	0c	0c	9,37 ± 1,28a	0c
Óleo de café torrado	0c	0c	9,19 ± 1,38a	0c

*Média ± desvio padrão (n=8). As médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

A atividade antibacteriana dos óleos de café frente à *P. aeruginosa* não diferiram estatisticamente entre si, indicando que o efeito sobre a bactéria pode ser igual para as ambas as amostras. Quando comparados ao antibiótico cloranfenicol, estes foram diferentes estatisticamente. A Figura 19 apresenta os halos de inibição obtidos para *P. aeruginosa*.

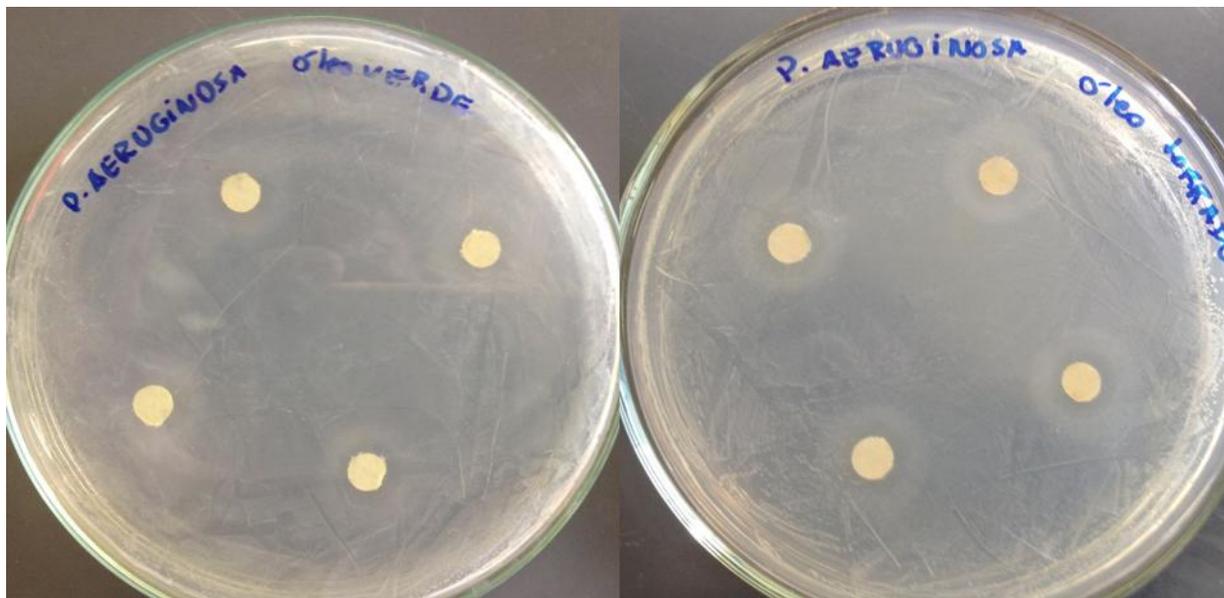


Figura 19. Halos de inibição obtidos para a *P. aeruginosa* pela ação dos óleos de café cru e torrado. FONTE: arquivo da autora

Os resultados foram analisados pela tabela padrão de interpretação dos halos de inibição do NCCLS (2000), de modo que foram considerados os seguintes parâmetros: R = resistente (≤ 12 mm de halo de inibição); I = intermediário (13 – 14 mm de halo de inibição); S = sensível (≥ 15 mm de halo de inibição). Verificou-se que tanto as amostras quanto o antibiótico avaliado foram resistentes à *P. aeruginosa*, pelo fato de terem apresentado halo de inibição menor que 12 mm. É interessante abordar que essa bactéria é Gram-negativa, assim como a *Escherichia coli*. Segundo a literatura, grandes moléculas de antibióticos penetram de modo lento devido à presença da membrana externa colaborando para a resistência aos antibióticos (BROOKS et al., 2012). Mesmo não comprovado, a ação inibitória pode ter sido ineficaz devido à diminuição da permeabilidade do óleo na membrana externa das bactérias Gram-negativas testadas.

As amostras utilizadas foram diluídas em Tween 80 a uma concentração de 1%, mas como os óleos são viscosos, insolúveis em água e complexos, podem formar suspensão turva que impede a determinação visual da eficácia antimicrobiana, devido à interferência da dissolução insuficiente dos componentes testados. Quando se utiliza a técnica de difusão em ágar, um problema observado é a concentração desigual do óleo no meio, pois a difusão irregular dos componentes lipofílicos resulta em concentrações desiguais, causando a

formação de regiões com atividade antimicrobiana variável e, finalmente, a determinação de um número de bactérias viáveis remanescentes, após a adição do óleo (SETZER et.al., 2004). No entanto, faz-se necessário que o uso destes agentes emulsificantes obedeça às concentrações determinadas, 0,5 a 20%, de forma a não interferirem, antagônica ou sinergicamente, na possível atividade biológica destes óleos (TAKARADA et.al., 2004).

O método de difusão em ágar é um teste limitado, pois apresenta dados apenas qualitativos e, pode sofrer interferência de fatores como condições de cultivo, meio de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados (RIOS; RECIO, 2005), assim, torna-se necessário a utilização de testes quantitativos para uma confirmação dos resultados sobre uma possível atividade antimicrobiana (CARVALHO, 2011).

No método de microdiluição em caldo, nota-se que as amostras utilizadas, em determinadas concentrações, apresentaram atividade antibacteriana. Os valores da CIM foram obtidos por diluições sucessivas e determinados por leitura visual utilizando o revelador TTC, substância que apresenta coloração avermelhada na presença de células viáveis e, amarela quando não.

A Tabela 20 demonstra as concentrações inibitórias mínimas e bactericidas mínimas dos óleos de café sobre as quatro estirpes testadas. Observa-se, de acordo com a Figura 20, que os óleos apresentam colorações escuras e, que para ambos os óleos e para todas as bactérias analisadas, as concentrações menores é que apresentaram inibição do crescimento bacteriano.

Tabela 20. Concentrações inibitórias e bactericidas mínimas dos óleos extraídos dos grãos de café cru e torrado frente às bactérias *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Bactérias	CIM	CBM	CIM	CBM
	Óleo de café cru		Óleo de café torrado	
<i>Bacillus subtilis</i>	0,22 mg/mL	BT	0,22 mg/mL	BT
<i>Escherichia coli</i>	0,22 mg/mL	0,22 mg/mL	0,88 mg/mL	1,76 mg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,22 mg/mL	BT	0,22 mg/mL	0,22 mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,11 mg/mL	0,11 mg/mL	0,11 mg/mL	0,11 mg/mL

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; BT: Atividade Bacteriostática.

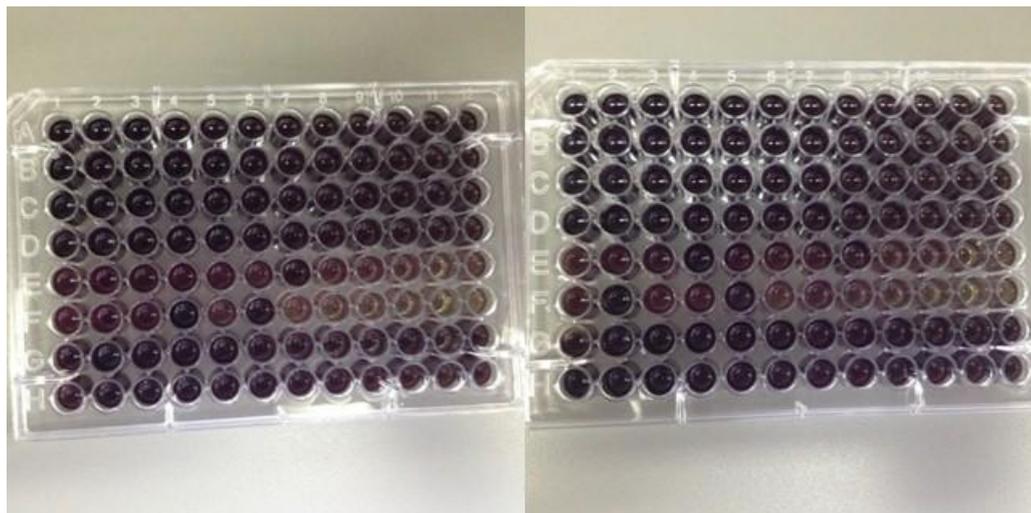


Figura 20. Placas de microdiluição utilizadas na determinação da CIM, para os óleos de café cru e torrado.
FONTE: arquivo da autora

Sabe-se que os óleos vegetais possuem uma composição química bem complexa, podendo-se citar os ácidos graxos, os quais contribuem como fonte de carbono e hidrogênio, que são importantes para o crescimento microbiano. Talvez essa possa ser uma justificativa, pois as concentrações maiores dos óleos testados podem ter servido de meio para o crescimento das bactérias nas maiores concentrações, enquanto, que nas menores, as substâncias bactericidas ou bacteriostáticas, atuaram mais eficientemente. Pode-se dizer, também, que as concentrações menores, como têm baixas concentrações de óleo, esse, se solubilizou mais e melhor em relação aos mais concentrados, que possuem maior quantidade de óleo, já que o meio é aquoso.

6 CONCLUSÃO

Tendo em vista o conjunto de análises que foram realizadas, algumas conclusões podem ser obtidas quanto à composição química e atividades biológicas dos óleos analisados:

- As características físico-químicas de ambos os óleos analisados foram equivalentes à de óleos convencionais;

- O óleo de café torrado possui uma concentração bem superior de compostos fenólicos que o óleo de café cru, apesar dessa diferença, pode-se dizer que ambos os óleos são boas fontes de destes compostos;

- A composição em ácidos graxos evidenciou que tanto no óleo de café cru quanto no torrado, os ácidos linoleico (C18:2), palmítico (C16:0) e oleico (C18:1) foram os majoritários e, tendo teores baixos de ácido linolênico (C18:3);

- Nos óleos analisados a quantidade de ácidos graxos insaturados foi superior à de saturados, o que justifica e favorece seus usos nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica;

- O óleo extraído dos grãos de café cru apresentaram uma quantidade superior de fitoesteróis, em relação ao óleo extraído dos grãos de café torrado. Mas em ambos, a ordem de maior quantidade dos fitoesteróis foi β -sitosterol > estigmasterol > campesterol, não sendo indentificado o brassicasterol;

- Com relação aos tocoferóis, o óleo de café torrado obteve uma maior quantidade, com predomínio do γ -tocoferol, enquanto que no óleo de café cru, o majoritário foi β -tocoferol, sendo que nesse óleo, não indentificado o δ -tocoferol;

- Os óleos demonstraram capacidade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS⁺ e FRAP. Sendo que o óleo de café cru foi mais eficiente frente ao DPPH e, o de café torrado frente ao ABTS⁺ e FRAP;

- Pode-se dizer que a atividade antioxidante foi influenciada pelos tocoferóis totais pelos métodos ABTS⁺ e FRAP no óleo de café cru e, pelos tocoferóis totais no ABTS⁺ e, compostos fenólicos no FRAP. Com relação ao DPPH, sugere-se que há outras substâncias, que não essas, responsáveis por tal atividade;

- A atividade antibacteriana mostrou que a *P. aeruginosa* apresentou halos de inibição para os óleos testados mas foi resistente frente aos óleos testados, por apresentar halos de inibição menores que 12mm;

- A concentração inibitória mínima para as bactérias testadas foram as menores concentrações utilizadas e, com relação à concentração bactericida mínima, observou-se que *B. subtilis* apresentou atividade bacteriostática frente aos dois óleos analisados e, *P. aeruginosa* frente ao óleo de café cru;

- Por fim, pode-se dizer que os grãos de café cru e torrado fornecem boas quantidades de lipídios e, que os mesmos possuem composição e características com potencial para inserção em indústrias de vários segmentos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plants tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature protocols**. v.2, p. 875-877, 2007.
- AKPINAR, N.; AKPINAR, M. A.; TURKOGLU, S. Total lipid content and fatty acid composition of the seeds of some *Vicia* L. species. **Food Chemistry**.v. 74, p.449-453, 2001.
- ALVAREZ, A. M. R.; RODRÍGUEZ, M. L. G. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. **Grasas y Aceites**. v.51,p. 74-96, 2000.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**. v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolf Lutz**.v. 66, n.1, p.1-9, 2007.
- AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. 6. ed. , Urbana, IL, USA, 2014.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos – Teoria e Prática**. 5.ed. Viçosa:UFV, 2012.
- AZEVEDO, A. B. A.; KIECKBUSH, T. G.; TASHIMA, A. K.; MOHAMED, R. S.; MAZZAFERA, P.; MELO, S. A. B. V. Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**. v.44, p.186-192, 2008.
- BARBOSA, D. B. **Avaliação das atividades antioxidantes, antimicrobianas e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae)**. 64 p. Dissertação de mestrad). Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. v.29, p. 113-123, 2006.

- BRAGAGNOLO, N.; RODRIGUES-AMAYA, D.B Avaliação do teor de colesterol como parâmetro de controle de qualidade para massas com ovos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.53, n.1/2, p.21-26, 1993.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CURVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**. v.28, n.1, p. 25-30, 1995.
- BROOKS, F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 25. ed – Porto Alegre, 2012.
- BRUFAU, G.; CANELA, M. A.; RAFECAS, M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**. v.28, p. 217-225, 2008.
- CARVALHO, C. O. **Comparação entre métodos de extração do óleo de *Mauritia flexuosa* L.f. (ARECACEAE – buriti) para uso sustentável na reserva de desenvolvimento de Tupé: rendimento e atividade antimicrobiana**. 2011. 110p. (Dissertação de Mestrado)- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2011.
- CECAFE. **Conselho dos exportadores de café do Brasil**. Disponível em: <[HTTP://www.cecafe.com.br](http://www.cecafe.com.br)>. Acesso em: 28/05/2015.
- CHRISTIE, W. W. **Gas Chromatography and Lipids**. 1.ed. Matreya: The Oil Press, 1989.
- CLARKE, R. J.; MACRAE, R. Coffee. Londres: **Elsevier**, v.1, n.2, 1989.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex-Stan 210: codex standard for named vegetable oils**. 2008.
- COSTA, T.; JORGE, N. Compostos bioativos benéficos presentes em castanhas e nozes. **UNOPAR Científica. Ciências, Biologia e Saúde**. v.13,n.3,p.195-203,2011.
- CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a Gordura: os ácidos graxos**. 1.ed. Barueri: Manole, 2002.
- DAGLIA,M., PAPETTI, A., DACARRO, C., GAZZANI, G.. Isolation of an antibacterial component from roasted coffee. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, p. 219 – 225, 1998.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

EPAMIG. **Empresa de pesquisa agropecuária de Minas Gerais**. Disponível em: <<http://www.epamig.br>>. Acesso em: 28/05/2015.

FONSECA, H.; GUTIERREZ, L. E. Estudo do teor e composição do óleo de algumas variedades de café (*Coffea arabica* L.). **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**. v.28, p.313-322, 1971.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4 ed. Oxford: Clarendon Press, 2007.

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

JONES, P. J. H.; KUBOW, S. Lipídios, esteróis e seus metabólitos. In: SHILS, M. E. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. 9.ed., v.1. São Paulo: Manole, 2003.

KAMAL-EDIN, A. Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v.58, p.1051-1061, 2006.

KARAMAN, I.; SAHIN, F.; GULLUCE, M.; OGTIÇU, H.; SENGUL, M.; ADIGUZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v.85, p. 231-235, 2003.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. v.25, n.4, p. 726-732, 2005.

LAGARDA, M. J.; GARCÍA-LLATAS, G.; FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 41, p. 1486-1496, 2006.

- LAGO, R. C. A.; ANTONIASSI, R. Composição de esteróis em óleos de café por cromatografia gasosa de alta resolução. In: **SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1, Poços de Caldas. Anais...**, Poços de Caldas, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, v.2, p. 744-747,2000.
- LAGO, R. C. A. Lipídios em grãos de café. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. v.19, n.2, p. 319-340, 2001.
- LUTZ, I. A. **Normas analíticas do Instituto Adolf Lutz: Métodos físicos e químicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 533p., 1985.
- MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**. v.19,n.6, p.761-770, 2006.
- MATTIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R.; FERNANDES, D. R. **Cultura do Café: Novo Manual de Recomendações**. Rio de Janeiro e Varginha/MG, 434 p., 2005.
- MAZZAFERA, P.; SOAVE, D.; ZULLO, M. A. T.; FILHO, O. G. Oil content of green beans from some coffee species. **Bragantia**. v.57,n.1, 1998.
- MORETTO, F.; FETT, R. **Definição de óleos e gorduras tecnologias de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998.
- NCCLS. **National Committee for clinical laboratory standards**. In: NCCLS document - Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard. Wayne: 15 ed., M7 – A5, v. 20, n. 2, 2000.
- Oliveira, A. C. de; Valentim, I. B.; Goulart, M. O. F.; Silva, C. A.; Bechara, E. J. H.; Trevisan, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**. v.32, n.3, p. 689-702, 2009.
- OTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.2, p. 301-307, 2008.
- PARRY, J.; SU, L.; LUTHER, M.; ZHOU, K.; YURAWECZ, M. P.; WHITTAKER, P.; YU, L. Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, n.3, p. 566-573, 2005.

PATEL, M. D.; THOMPSON, P. D. Phytosterols and vascular disease. **Atherosclerosis**. v. 186, p. 12-19, 2006.

PIMENTA, J. C. **Qualidade de Café**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2003.

PINTO, T. J. A; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.

PRIOR, R. L.; XIANLI, W.; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**. v.29,n.4, p.755-760, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RIVE-EVANS, C. Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

RIO, J. T. D. **Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recoletadas en la ecoregion cafetera**. 2013. 150 p. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidad Tecnológica de Pereira, Colômbia, 2013.

RODRIGUES, J. N.; FILHO, J. M.; TORRES, R. P.; GIOIELLI, L. A. Caracterização físico-química de creme vegetal enriquecido com ésteres de fitoesteróis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 40, 505-520, 2004.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**. v. 92, n.2, p. 235-254, 2005.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 4 p. Embrapa agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 127), 2007a.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre

- ABTS. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 4 p. Embrapa agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 128), 2007b.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro. (FRAP). Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical,. 4 p. Embrapa agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 125), 2007c.
- SAES, M. S. M.; NAKAZONE, D. **Estudo da competitividade de cadeias integradas no Brasil: impactos das zonas de livre comércio – Cadeia: Café**. Campinas, 142 p., 2002.
- SCHMIDT, S.; POKORNÝ, J. Potencial application of oilseeds as sources of antioxidants for food lipids – a review. **Czech Journal of Food Sciences**. v.23, n.3, p. 93-102, 2005.
- SETZER, W. N.; VOGLER, B.; SCHMIDT, J. M.; LEAHY, J. G.; RIVES, R. Antimicrobial activity of *Artemisia douglasiana* leaf essential oil. **Fitoterapia**. v. 75, p. 192-200, 2004.
- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assisat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v.4,n.1, p.71-78,2002.
- SILVA, B. B.; MENDES, F. B. G.; KAGEYAMA, P. Y. Desenvolvimento econômico, social e ambiental da agricultura familiar pelo conhecimento do agronegócio. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**. 2008.
- SMITH, A. W. Introduction. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.) **Coffee: chemistry**. 2. ed. Barking: Elsevier, p. 1-41., 1989.
- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oil and essences against very important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**. v.26, p. 118-122, 1998.
- TAKARADA, K.; KIMIZIKA, R.; TAKAHASHI, N.; HONMA, K.; OKUDA, K.; KATO, T. A. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiology and Immunology**. v.19, p. 61-64, 2004.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10.ed.Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

TUBEROSO, C. I. G.; KOWALCZYK, A.; SARRITZU, E.; CABRAS, P. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. **Food Chemistry**. v.103, p. 1494-1501, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 39, p. 44-84, 2007.

VALLILO, M. I.; LAMARDO, L. C. A.; GABERLOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E.; MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* O. Berg. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. v.26, p. 805-810, 2006.

VAN DE MARK, M. R.; SANDEFUR, K. Vegetable oils in paint and coatings. In: ERHAN, S. Z. **Industrial uses of vegetable oils**. Champaign: AOCS Press. 2005.

VERONEZI, C. M.; JORGE, N. Aproveitamento de sementes de abóbora (*Cucurbita* SP) como fonte alimentar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v.14, n.1, p. 113-124, 2012.

ANEXO – CURVAS ANALÍTICAS DOS PADRÕES

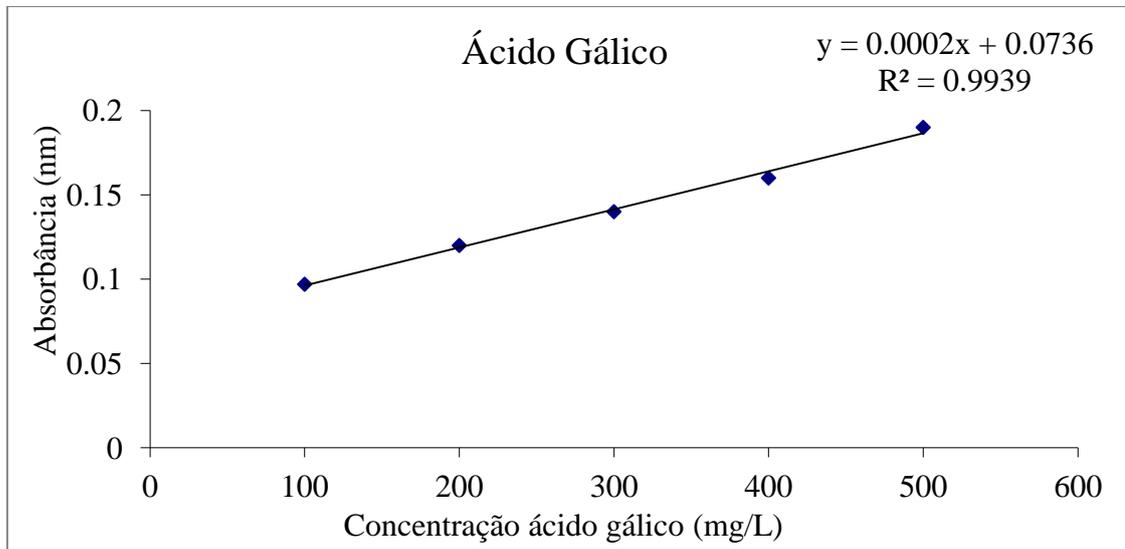


Figura 1. Curva ácido gálico.

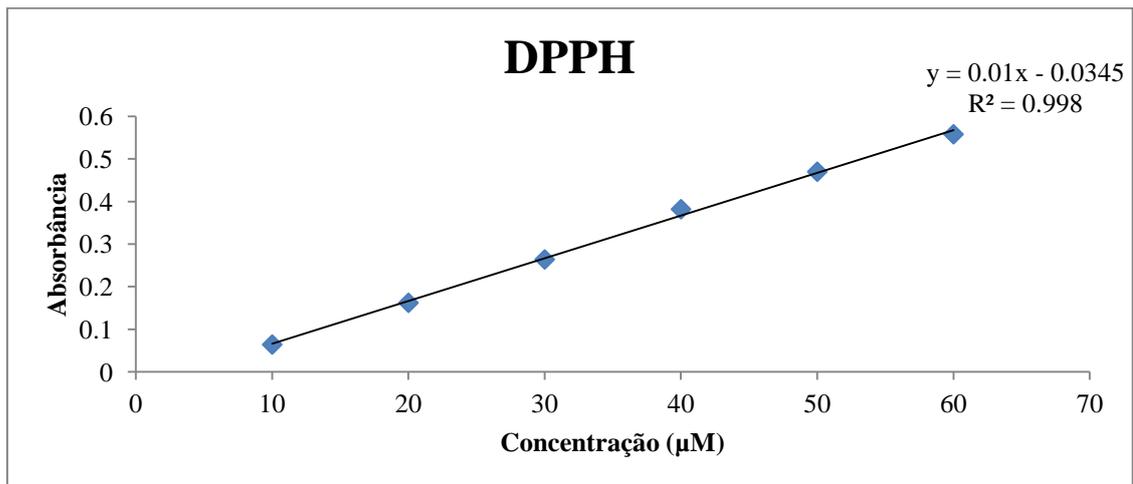


Figura 2. Curva DPPH.

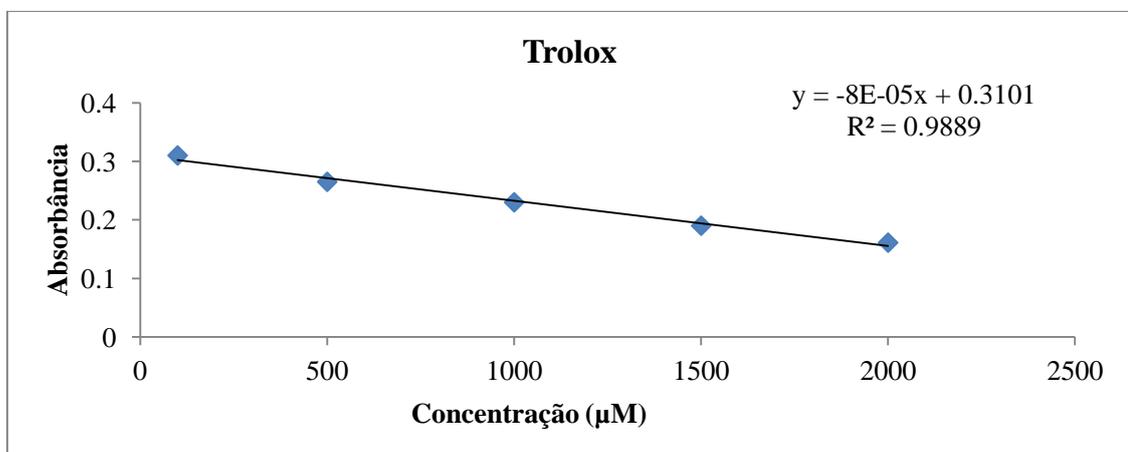


Figura 3. Curva Trolox.

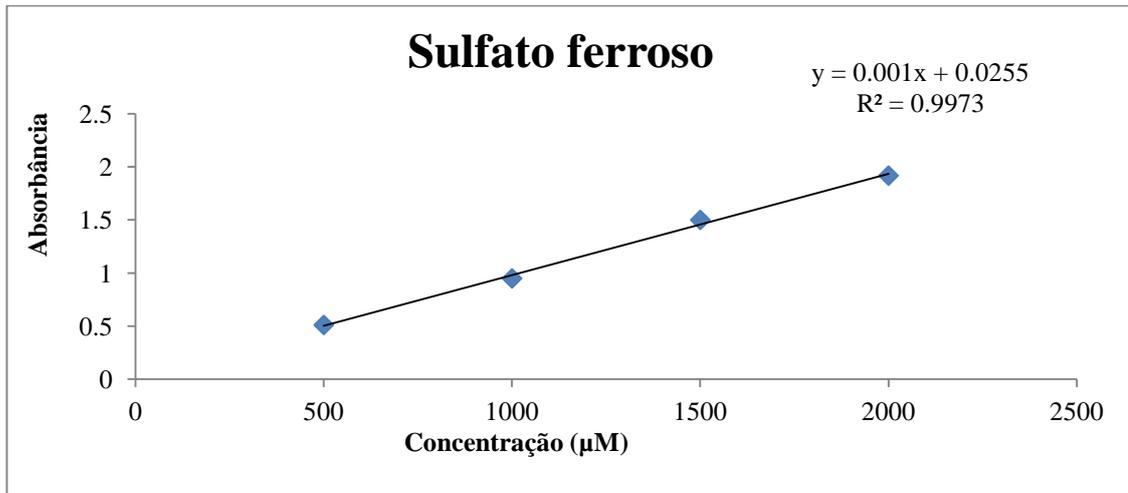


Figura 4. Curva sulfato ferroso.

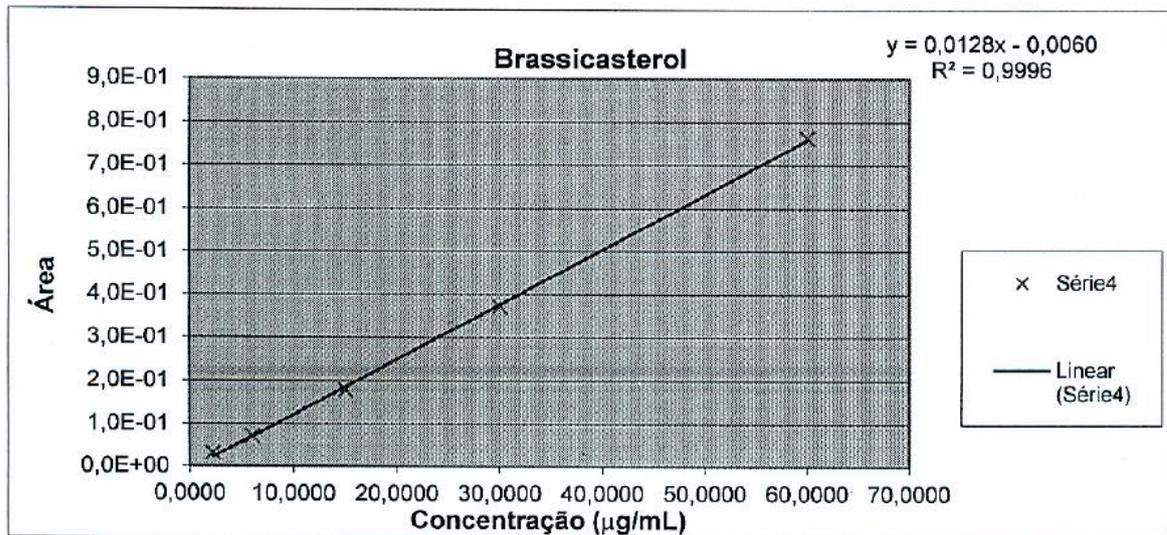


Figura 5. Curva brassicasterol. .

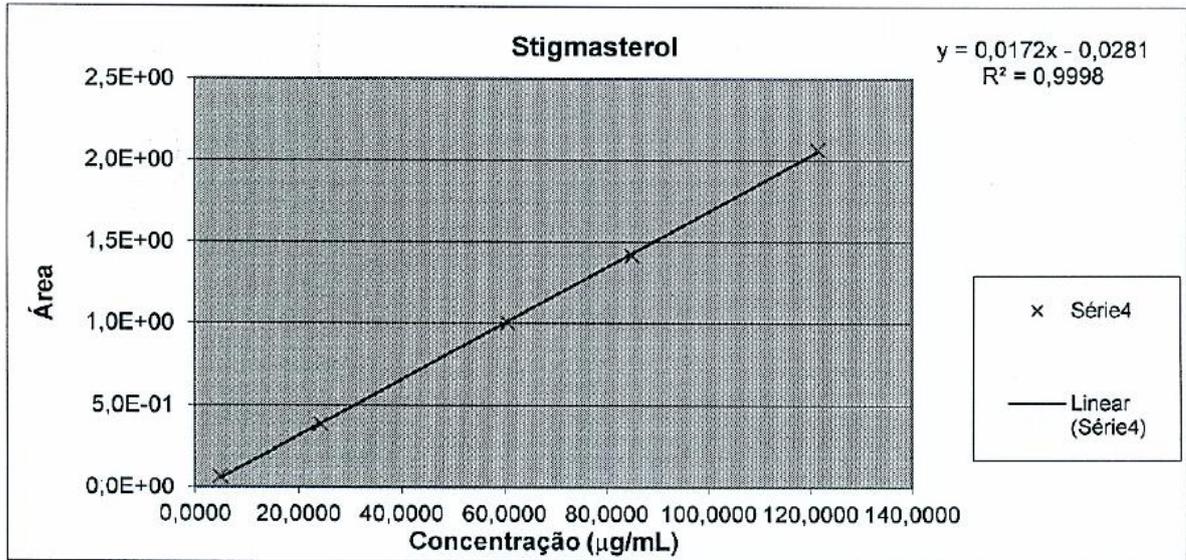


Figura 6. Curva stigmasterol.

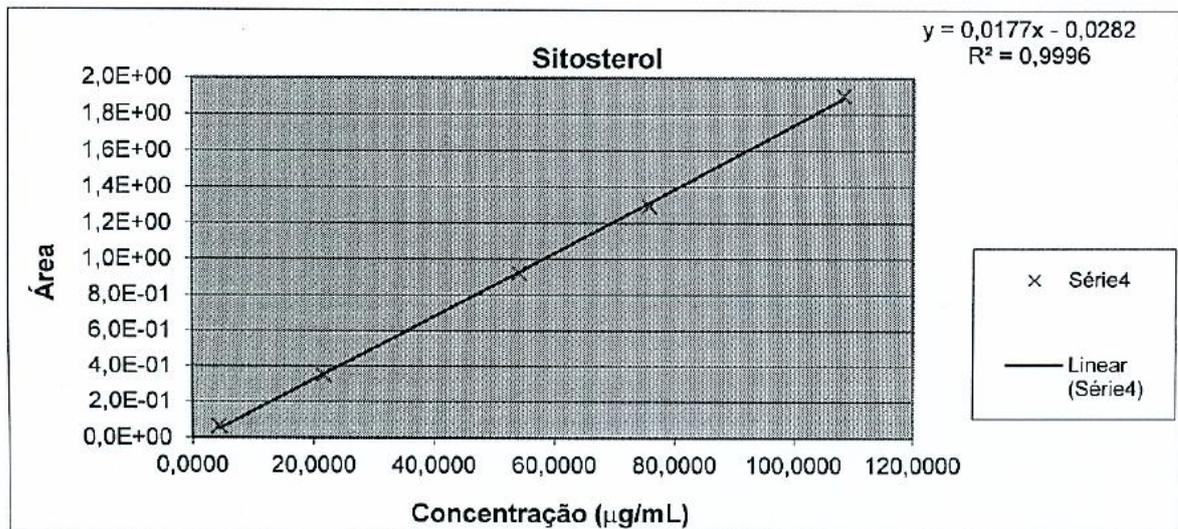


Figura 7. Curva sitosterol.