

METODOLOGIA CROMATOGRÁFICA PARA AVALIAÇÃO DE DITERPENOS EM TECIDOS DE CAFÉ: POLPA, PERISPERMA, ENDOSPERMA E FOLHAS

Rafael C. E. DIAS¹; Marta T. BENASSI¹, E-mail: martatb@uel.br

¹Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR .

Resumo:

Caveol e cafestol, principais diterpenos do café, compõem a fração lipídica insaponificável e apresentam efeitos conhecidos na saúde humana, em alguns casos indesejáveis como a ação hipercolesterolêmica, mas atuam também como anticarcinogênicos e antioxidantes. A determinação dos diterpenos em diferentes tecidos da planta e do grão em cereja permitiria, pela integração com a Engenharia Genética, o estudo das vias metabólicas e identificação de genes envolvidos na produção destes compostos. Na literatura encontram-se apenas referências a avaliações em grãos de café verde ou torrado e bebidas. O objetivo do trabalho foi testar uma metodologia por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para determinação de cafestol e caveol em folhas de café, polpa, endosperma e perisperma do grão. Empregou-se como condição cromatográfica coluna de fase reversa, eluição com acetonitrila 55 % em água e detecção a 230 e 290 nm. A saponificação direta, extração com terc-butil metil éter e limpeza com água mostrou ser eficiente para o preparo da amostra dos diferentes tecidos, sem necessidade de emprego de outras técnicas de limpeza. Tendo em vista as diferenças de concentração observadas, a detecção dos dois compostos a 230 nm não se mostrou adequada, recomendando-se a leitura de cada diterpeno no seu λ máximo. As condições cromatográficas empregadas permitiram a identificação dos diterpenos de interesse em todas as matrizes estudadas e indicando a possibilidade de quantificação de caveol e cafestol por uma metodologia simples e rápida.

Palavras chave: *Coffea arabica*, caveol, cafestol, CLAE, caracterização.

CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR EVALUATION OF DITERPENES IN COFFEE TISSUES: PERICARP, PERISPERM, ENDOSPERM AND LEAVES

Abstract

Kahweol and cafestol, main diterpenes of the coffee bean, compose the unsaponifiable fraction and present known effects in the human health. In some cases, they are undesirable as the hypercholesterolaemic effect, but these compounds also have anticarcinogenic and antioxidants action. The analysis of the diterpenes in different plant tissues and in green bean would allow, by integration with Genetic Engineering, the study of metabolic pathways and identification of the genes involved in the production of these compounds. In the literature there are just reports related to evaluations in green or roasted coffee beans and coffee beverages. The objective of the work was to test a methodology by High Performance Liquid Chromatography for determination of cafestol and kahweol in coffee leaves, pericarp, endosperm and perisperm of the coffee beans. Reverse phase column, isocratic elution with acetonitrile/water (55/45 v/v) and detection at 290 and 230 nm were used. Direct saponification, extraction with terc-butyl methyl ether and clean up with water presented efficiency for the preparation of the different coffee tissues, with no necessity of additional clean up procedures. Considering the differences observed in the diterpene contents, the detection at 230 nm did not achieve good results, being recommended the detection of each diterpene at its maximum wavelength. The chromatographic conditions applied allowed the identification of the diterpenes in all the matrices studied and suggested the possibility of the quantification of kahweol and cafestol by a simple and rapid methodology.

Key words: *Coffea arabica*, kahweol, cafestol, HPLC, characterization.

Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de café, o maior exportador do grão e o segundo consumidor, atrás apenas dos Estados Unidos (ABIC, 2007). As espécies de café mais cultivadas comercialmente são *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, que devem corresponder a 77 % e 23 %, respectivamente, da produção brasileira para a safra 2006/2007, segundo previsão (Conab, 2007).

A influência de compostos do café na saúde dos consumidores tem sido tema de pesquisas da comunidade científica, que vem expandindo cada vez mais as discussões para a população em geral. Na matéria insaponificável (MI) do café encontram-se dois álcoois diterpênicos de interesse, cafestol e caveol, que apresentam a capacidade de elevar o nível de colesterol humano, porém mostram ações benéficas de quimioproteção e antioxidação (Urgert et al., 1995; Kurzrock & Speer, 2001a). O teor de MI no óleo de café é relativamente alto (9 a 13 %), comparado com outros óleos vegetais (em geral < 1 %). O cafestol é encontrado tanto na espécie arábica como no conilon; o caveol, porém, aparece em concentrações muito mais elevadas nos grãos de arábica. A importância de se estudar qualitativamente e quantitativamente os diterpenos no café está relacionada à utilização destes compostos como ferramenta de identificação de espécies em misturas de café torrado, como avaliado em trabalhos prévios (Dias et al., 2005a; Dias et al., 2005c). Além disso, a quantificação dos diterpenos é ainda relevante em função da necessidade de elucidação das vias metabólicas de produção desses compostos na planta do café e seus efeitos na saúde humana. Desta forma, existe a necessidade da avaliação dos diterpenos em diferentes estruturas de tecidos da planta e semente. Uma vez definida metodologia para identificação e quantificação de

caveol e cafestol, será possível fazer um estudo do metabolismo da planta para identificação de genes envolvidos e elucidação de vias biossintéticas destas substâncias.

Muitas metodologias têm sido desenvolvidas para avaliação de diterpenos em grãos de diferentes origens geográficas, misturas de espécies e ainda em bebidas obtidas por diferentes métodos, principalmente empregando as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa (CG) (Pettitt et al., 1987; Urgert et al., 1995; Lercker et al., 1995; Castillo et al., 1999; Kurzrock & Speer, 2001b).

A CLAE destaca-se pela versatilidade e para o emprego com compostos com algum grau de instabilidade a temperatura. Pettitt *et al.* (1987), avaliando diterpenos em café, utilizaram coluna C8 e coluna preparativa; gradiente linear (80 % acetonitrila – ACN / água até 100 % ACN) e detecção no UV a 280 nm. Para realizar a identificação de ésteres de cafestol e caveol em café arábica, Kurzrock & Speer (2001b) utilizaram coluna C18; gradiente linear de ACN / isopropanol (70 + 30 v/v) e detecção no UV (200-350 nm) e com espectrômetro de massas. A quantificação de diterpenos em grãos torrados e crus de café arábica foi feita também por Araújo & Sandi (2006). Após a extração, adicionou-se KOH 0,5 mol/L (em metanol) para saponificação, utilizando hexano como solvente da parte insaponificável. As condições cromatográficas foram: coluna de fase reversa a temperatura ambiente; fase móvel etanol/água (85/15 v/v); detecção no UV (220 nm).

Na literatura encontram-se referências a análises em café torrado e bebidas. Apesar de serem também relatados estudos em grãos verdes, não foram encontrados trabalhos com avaliação de diterpenos em tecidos da planta café como endosperma, perisperma, polpa e folhas. O objetivo do trabalho foi avaliar a possibilidade de utilização de técnica por CLAE para a avaliação de diterpenos em vários tecidos do cafeeiro, estudando-se também as condições de extração.

Material e Métodos

Material

As amostras de café verde e folhas de origem conhecida foram obtidas junto ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), utilizando-se café arábica da variedade Iapar-59. Foram avaliadas folhas jovens maduras do cafeeiro, além do perisperma, endosperma e polpa separados de café cereja. As amostras, recém colhidas, foram acondicionadas em tubos de plástico com tampa, à temperatura de aproximadamente -80°C para evitar a perda dos compostos de interesse principalmente por processos de oxidação.

Extração

Os diterpenos foram extraídos conforme adaptação do método descrito por Dias et al. (2005b), desenvolvido para extração da matéria insaponificável de café torrado e moído. Imediatamente antes da pesagem, as amostras foram moídas, com auxílio de pistilo e almofariz, com nitrogênio líquido, e pesadas em tubo de ensaio, tomando-se o cuidado para evitar a elevação da temperatura (evaporação completa do N₂).

Faz-se a saponificação da amostra com hidróxido de potássio, extração da MI com tercbutil-metil éter e limpeza em com água destilada (Figura 1).

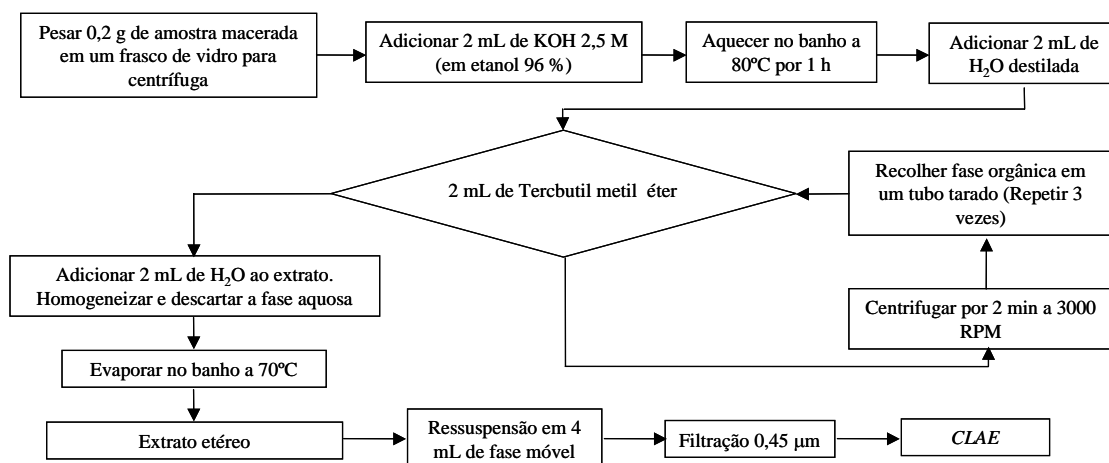


Figura 1: Condições propostas para extração das amostras de café.

Análise Cromatográfica

Utilizou-se um cromatógrafo a líquido Shimadzu, constituído de um sistema de bombeamento de solvente (duas bombas LC10AD) e válvula injetora Rheodyne, com alça de amostragem de 20 µL. O sistema está acoplado a um detector espectrofotométrico UV/visível Shimadzu SPD-10A conectado por uma interface (CBM-101) a um microcomputador.

A identificação dos compostos caveol e cafestol foi feita no cromatógrafo a líquido, com base nos tempos de retenção dos solutos comparados com o do padrão e empregando-se co-cromatografia. Foi empregada detecção em

comprimentos de onda de máxima absorvância dos compostos de estudo: 230 nm para cafestol e 290 nm para caveol. Avaliou-se, ainda, a possibilidade de leitura em apenas um λ (230nm) para simplificação do método, permitindo utilizar apenas uma corrida cromatográfica para avaliação dos compostos.

Tabela 1. Condições cromatográficas empregadas

Fase Estacionária	Coluna	Spherisorb ODS 1, 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m, 7 % de substituição, não capeada
		Coluna de guarda de C18, partícula de 5 μ m
Fase Móvel	Composição	Acetonitrila 55 %
	Vazão	0,8 mL/min e 0,9 mL/min (dependendo do extrato)
Deteção		Programável - λ = 230 nm para cafestol e 290 nm para caveol
Tempo		Corrida: 20 e 25 min (dependendo do extrato). Estabilização: 10 min (entre corridas)
Temperatura		Ambiente climatizado (aproximadamente 25°C)

Resultados e Discussão

Os resultados a seguir mostram cromatogramas obtidos para os diferentes tecidos de café. A leitura a 290 nm permitiu observar apenas o caveol; a 230 nm observam-se, dependendo da concentração, tanto o pico de caveol como o de cafestol. Importante verificar que apesar de haver eluição de outros compostos ao longo da corrida cromatográfica além de caveol e cafestol, na faixa de tempo de retenção dos compostos de interesse (16 a 20 min, dependendo da vazão) não são eluídos interferentes. Mesmo para leitura a 230 nm, não se observou outros picos depois de 8 a 10 minutos de corrida. Esses resultados demonstraram que o preparo de amostra (saponificação direta, extração e limpeza com água) e as condições cromatográficas escolhidas foram suficientes para permitir a separação adequada dos diterpenos nessas matrizes. Apesar dessa etapa do estudo ser apenas qualitativa, é possível de maneira geral, comparar, entre os diterpenos e entre tecidos, as concentrações dos compostos considerando-se a área dos picos, tendo em vista que se utilizou a mesma massa inicial no processo de extração e que caveol e cafestol apresentam absorvidade semelhante.

Nas Figuras 2 e 3 pode-se observar cromatogramas típicos de perisperma e endosperma do grão de café. Para os dois tecidos, constatou-se a presença de caveol e cafestol. O caveol, pela alta concentração encontrada, poderia ser quantificado tanto a 230 como a 290 nm. O endosperma caracterizou-se por apresentar teor mais alto de diterpenos comparando-se com a polpa, diferenciando-se principalmente pela alta concentração de caveol.

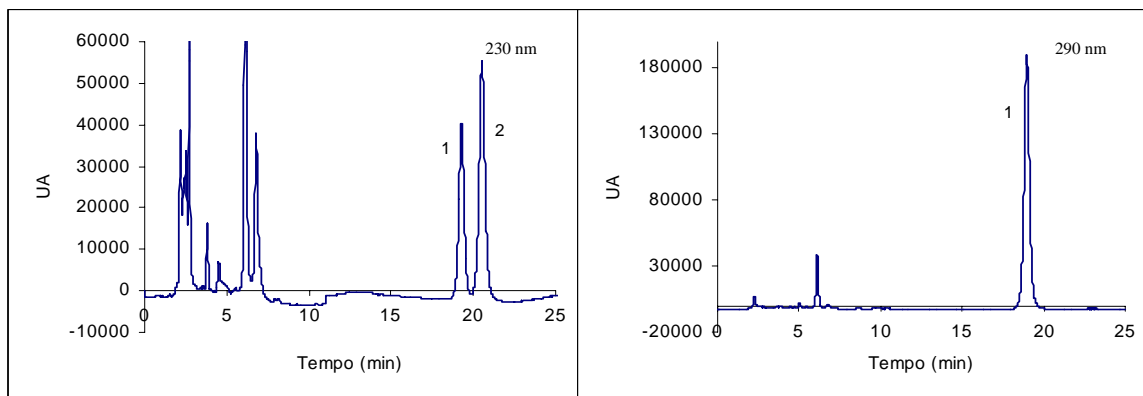


Figura 2: Cromatogramas típicos para extratos de **perisperma** de café. Pico de caveol (1) e cafestol (2). Vazão 0,8 mL/min.

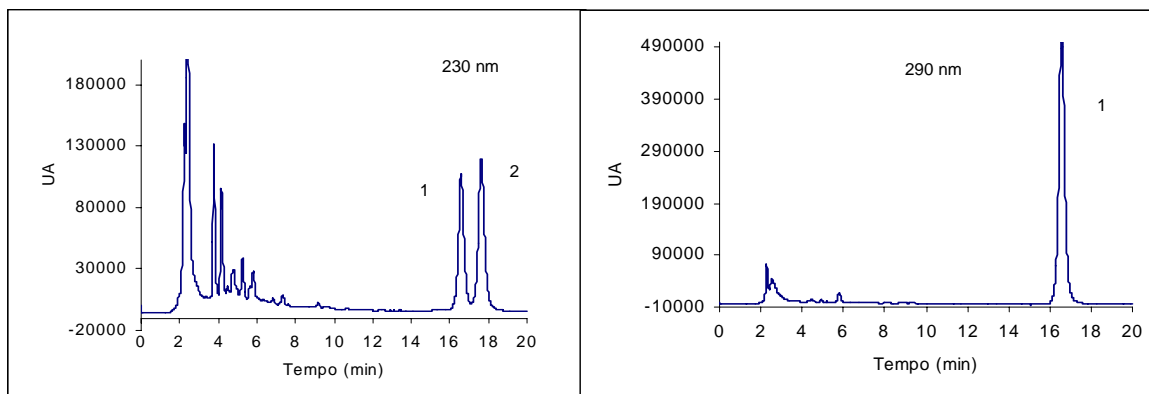


Figura 3: Cromatogramas típicos para extratos de **endosperma** de café. Pico de caveol (1) e cafestol(2). Vazão 0,9 mL/min.

A avaliação do extrato de polpa mostrou a presença de caveol em concentração suficiente para resultar um pico de bom perfil cromatográfico quando a leitura foi feita a 290nm (Figura 4). No entanto, para leitura a 230 nm, não se observou o pico de caveol e houve dificuldade para identificar o cafestol, presente em baixo teor. Comparativamente aos outros tecidos estudados, a polpa mostrou concentração menor de diterpenos, com predominância de caveol.

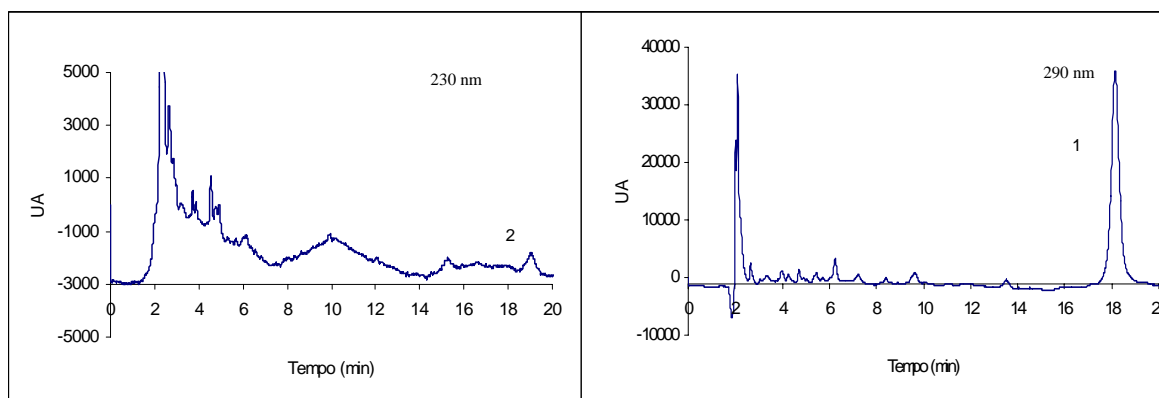


Figura 4: Cromatogramas típicos para extratos de **polpa** de café. Pico de caveol (1) e cafestol (2). Vazão 0,8 mL/min.

Devido a maior quantidade de pigmentos presentes nos extratos de folha, comparados com os outros tecidos avaliados, avaliava-se que poderia ser necessária a adição de mais etapas de limpeza na extração deste tecido. Porém, os cromatogramas obtidos nos comprimentos de onda de 230 e 290 nm mostraram que, apesar do número maior de substâncias eluídas no início do cromatograma, a eficiência do sistema cromatográfico, em especial da coluna, não foi afetado, visto que os picos de caveol e cafestol apresentaram perfil cromatográfico e eficiência de separação semelhantes aos resultados com os outros tecidos (Figura 5). Observou-se a presença de baixos teores de caveol e cafestol, sendo também nesse caso necessária a quantificação de cada componente em seu λ máximo. O extrato de folhas caracterizou-se por apresentar concentração de cafestol superior a de caveol, diferenciando-se dos outros tecidos estudados.

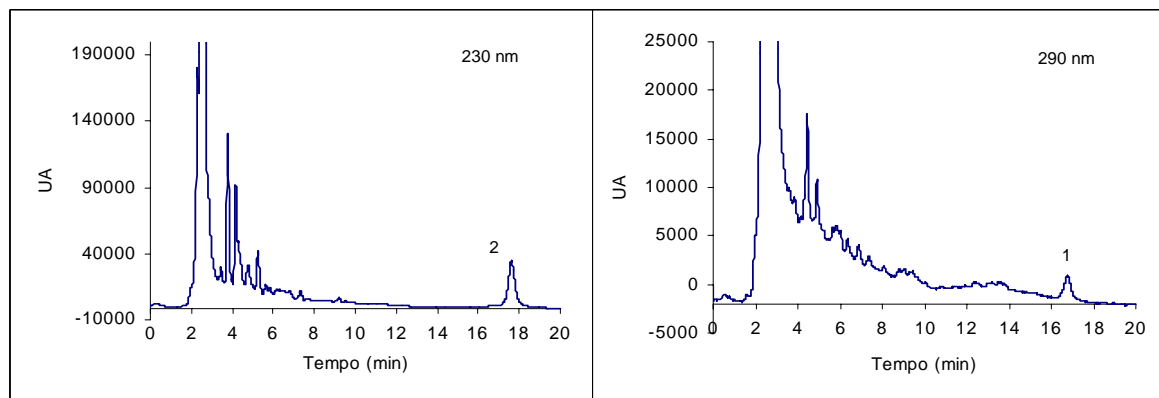


Figura 5: Cromatogramas típicos para extratos de **folhas** de cafeeiro. Pico de caveol (1) e cafestol (2). Vazão 0,9 mL/min.

Comparando-se os resultados para os diferentes tecidos verificou-se a viabilidade de trabalhar com a mesma metodologia de extração e condições cromatográficas para todas as matrizes. No entanto, pela grande variabilidade de concentração dos diterpenos nos tecidos recomenda-se que cada composto seja quantificado em seu λ máximo, 290 nm para caveol e 230 nm para cafestol. Para isso, tendo em vista a pequena diferença observada nos tempos de retenção dos dois diterpenos, que não se conseguiu melhorar alterando-se as fases móvel e estacionária em estudo anterior para desenvolvimento da metodologia (Dias et al., 2006), há necessidade de utilizar duas corridas em λ específicos ou empregar detector de arranjo de diodos que permita leitura simultânea.

Conclusões

A metodologia cromatográfica permitiu a avaliação de diterpenos nos tecidos de endosperma, perisperma e polpa do fruto do café e na folha do cafeeiro, utilizando-se mesmo procedimento de extração e mesmas condições cromatográficas. Tendo em vista as diferenças de concentração observadas, a detecção dos dois compostos a 230nm não se mostrou adequada em

todos os casos, recomendando-se a leitura de cada diterpeno no seu λ máximo. A saponificação direta, extração com terc-butil metil éter e limpeza com água mostrou ser eficiente para o preparo da amostra dos diferentes tecidos, sem necessidade emprego de outras técnicas de limpeza. As condições cromatográficas empregadas permitiram a separação dos diterpenos de interesse em todas as matrizes estudadas e indicando a possibilidade de quantificação de cafeol e cafestol por uma metodologia simples e rápida.

Agradecimento

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CPB&D/Café) pelo financiamento da pesquisa (Subprojeto nº 19.2004.576.02).

Referências Bibliográficas

ABIC - Associação Brasileira da Indústria de Café. Disponível em <http://www.abic.com.br>. Acesso em: 09 março 2007.

ARAÚJO, J.M.A.; SANDI, D. (2006) Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. *Food Chemistry*, 101:1087-1094.

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

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 09 março 2007.

DIAS, R. C. E.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. (2005a) Diferenciação de café arábica (*Coffea arabica*) e conilon (*Coffea canephora*) com diferentes graus de torra. In: *IV Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, Londrina, Anais... Londrina.

DIAS, R. C. E.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. (2005b) Otimização de método espectrofotométrico para discriminação de café arábica e conilon em diferentes graus de torra. In: *6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, Campinas, Anais... Campinas.

DIAS, R. C. E.; SCHOLZ, M. B. S.; YAMASHITA, F.; BENASSI, M. T. (2005c) Determinação da importância de parâmetros físico-químicos para discriminação de café arábica e conilon por regressão multilinear. In: *6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, Campinas, Anais... Campinas.

DIAS, R. C. E.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. (2006) Metodologia para análise de diterpenos em café torrado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: *Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Curitiba, Anais... Curitiba.

LERCKER, G.; FREGA, N.; BOCCI, F.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. (1995) High resolution gas chromatographic determination of diterpenic alcohols and sterols in coffee lipids. *Chromatographia*, 41:29-33.

KURZROCK, T.; SPEER, K. (2001a) Diterpenes and diterpene esters in coffee. *Food Reviews International*, 17:433-450.

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

PETTITT, JR; BRUCE, C. (1987) Identification of the diterpene esters in arabica and canephora coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35:549-551.