



UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS E PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES DO GRÃO DE CAFÉ VERDE

LILIANA DO CÉU GOMES VIEIRA

PORTO, 2015



UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS E PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES DO GRÃO DE CAFÉ VERDE

LILIANA DO CÉU GOMES VIEIRA

PORTO, 2015

LILIANA DO CÉU GOMES VIEIRA



CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS E PROPRIEDADES
ANTIOXIDANTES DO GRÃO DE CAFÉ VERDE

Trabalho apresentado à Universidade Fernando
Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção
do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

(O autor)

RESUMO

Entre os produtos comercializados a nível mundial, o café é um dos mais valiosos, sendo apenas superado pelo petróleo em termos de movimentações financeiras. Assim, torna-se indiscutível a importância do café na política e na economia de muitos países, pois o seu cultivo, processamento, comercialização, transporte e mercado criam milhões de empregos por todo o mundo.

A composição química do café constitui um parâmetro fundamental na distinção das diferentes variedades deste produto, recorrendo-se frequentemente à análise de compostos como a cafeína, o ácido hidroxicinâmico e o ácido clorogénico, entre outros.

O principal objetivo deste trabalho focou-se no estudo do perfil dos compostos bioativos presentes em grãos de café verde provenientes de Cabo Verde e das inerentes propriedades antioxidantes. Mais concretamente, procedeu-se à quantificação dos compostos bioativos com maior importância no café, como é o caso dos fenólicos e flavonoides totais, das antocianinas e dos carotenoides.

A quantidade de compostos fenólicos totais encontrados na amostra dos grãos de café verde foi 4,855 mg/g. Quanto à quantidade de flavonoides totais, foi 41,2 mg/g e de antocianinas 0,465 mg/g. Relativamente aos carotenoides estudados, a clorofila a apresenta-se em quantidade igual a $1,5 \times 10^{-4}$ mg/g, a clorofila b, $1,6 \times 10^{-4}$ mg/g, o licopeno, 6×10^{-4} mg/g e o β -caroteno aparenta ser inexistente nesta amostra. A quantificação destes compostos bioativos comprovou a sua presença na amostra de café verde e, conseqüentemente, evidenciou os potenciais benefícios que este produto traz para a saúde, sendo a capacidade antioxidante o mais prevalente.

Palavras-chave: café verde; atividade antioxidante; compostos bioativos; fenólicos; flavonoides; antocianinas; carotenoides.

ABSTRACT

Among the products marketed worldwide, coffee is one of the most valuable, being surpassed only by oil when it comes to financial moves. So, it becomes undeniable its political and economical relevance in many of developed countries, because its cultivation, processing, marketing, transportation and market generates millions of jobs around the world.

Its chemical composition makes an essential parameter in the separation of the different varieties of this product and for that, many times, several compounds as caffeine, hydroxycinnamic acid and chlorogenic acid are often subject to analysis.

The main objective of this work focused on the study of the profile of bioactive compounds present in green coffee beans from Cape Verde and the inherent antioxidant properties. Specifically, it proceeded to the quantification of bioactive compounds with greater importance in coffee, such as totals phenolics and flavonoids, anthocyanin and carotenoid.

The total amount of phenolic compounds found in the green coffee beans was 4.855mg/g. The total flavonoids amount was 41.2mg/g and anthocyanin 0.465 mg/g. Concerning to the studied carotenoids, chlorophyll forth in equal quantity of 1.5×10^{-4} mg/g; chlorophyll b, 1.6×10^{-4} mg/g; lycopene, 6×10^{-4} mg/g and β -carotene appears to be nonexistent in this sample. The quantification of these bioactive compounds demonstrated its presence in the sample of green coffee and therefore, showing the potential benefits this product brings to health, and the antioxidant capacity of the most prevalent.

Keywords: Green coffee; antioxidant activity; bioactive compounds; phenolic; flavonoids; anthocyanins; carotenoids.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar a minha gratidão à orientadora desta tese, Professora Doutora Carla Sousa e Silva, e também à co-orientadora, Professora Doutora Ana Cristina Vinha, por toda a disponibilidade e constante dedicação na realização desta monografia. Pela ínfima paciência para o esclarecimento de todas as minhas questões, pela simpatia e apoio dispensado, possibilitando a partilha de conhecimentos e experiências em várias frentes.

Agradeço aos meus pais e aos meus irmãos, por todos os valores que me transmitiram, pela motivação constante, pelo amor com que me preenchem, pela força e presença nos momentos difíceis.

Agradeço à minha irmã pela presença contínua, pela paciência interminável, pelo espírito crítico, pela revisão atenta e sugestões que melhoraram este trabalho, por todo o seu contributo, carinho e amizade.

Um especial agradecimento ao Vítor, pela paciência incansável, por todo o carinho, ajuda e presença constante em todos os momentos. Um enorme obrigado pela pessoa admirável que é e por me apoiar e incentivar nesta luta pelos meus objetivos.

Agradeço aos meus amigos, pela amizade e acompanhamento nesta última fase do meu percurso académico. À Ana Sousa, Vânia Relvas, Daniela Valente e ao Vasco Sala, por todo o apoio e ajuda que contribuiu para melhorar este trabalho.

A todos, muito obrigada.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XI
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Café	3
2.2. Café Verde	6
2.2.1. Benefícios.....	6
2.2.2. Processo de torrefação.....	7
2.2.3. Atividade Antioxidante	8
2.3. Composição química	9
2.3.1. Compostos fenólicos.....	11
2.3.2. Flavonoides.....	15
2.3.3. Antocianinas	17
2.3.4. Carotenoides	20
CAPÍTULO III. OBJETIVOS	23
CAPÍTULO IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1. Recolha e tratamento da amostra	24
4.2. Reagentes e equipamentos	24
4.2.1. Reagentes.....	24
4.2.2. Equipamentos	24
4.3. Procedimento experimental	25
4.3.1. Determinação do teor de humidade	25
4.3.2. Determinação dos compostos bioativos	25
4.3.2.1. Preparação dos extratos	25
4.3.2.2. Fenólicos totais.....	25
4.3.2.3. Flavonoides totais.....	26
4.3.2.4. Antocianinas.....	26
4.3.2.5. Carotenoides.....	26
CAPÍTULO V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. Análise do teor de humidade.....	28

5.2. Análise dos compostos bioativos	28
CAPÍTULO VI. CONCLUSÃO	33
CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFIA	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do fruto do café.....	4
Figura 2. Gráfico que representa o número de publicações sobre seis tipos de antioxidantes, desde 1970 até 2000.....	10
Figura 3. Estruturas químicas dos ácidos hidroxibenzóicos (A) e hidroxicinâmicos (B).....	13
Figura 4. Estrutura química do ácido clorogénico.....	14
Figura 5. Estrutura química dos flavonoides.....	15
Figura 6. Exemplos de alguns flavonoides mais comuns.....	16
Figura 7. Estrutura química da antocianidina e referência às principais antocianidinas em alimentos.....	17
Figura 8. Estrutura química da cianidina e possíveis conjugações com açúcares.....	18
Figura 9. Estruturas químicas das antocianinas com grupos estruturais que contribuem para a sua atividade antioxidante.....	19
Figura 10. Estruturas moleculares de alguns exemplos de carotenoides.....	21

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. Composição média do café verde, expressa em % matéria seca.....	11
Tabela II. Resultados obtidos na quantificação dos compostos bioativos (fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas) na amostra de café verde.	29
Tabela III. Resultados obtidos na quantificação dos carotenoides (clorofila a, clorofila b, β -caroteno e licopeno) na amostra de café verde.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs - absorvência

BHA – butil-hidroxianisol

BHT – butil-hidroxitolueno

HPLC – cromatografia líquida de alta resolução (do inglês “High performance liquid chromatography”)

RFC – reagente Folin-Ciocalteu

3-CQA - ácido 3-cafeoilquínico (do inglês “3-caffeoylquinic acid”)

4-CQA - ácido 4-cafeoilquínico (do inglês “4-caffeoylquinic acid”)

5-CQA - ácido 5-cafeoilquínico (do inglês “5-caffeoylquinic acid”)

3,4-diCQA - ácido 3,4-dicafeoilquínico (do inglês “3,4-dicaffeoylquinic acid”)

3,5-diCQA - ácido 3,5-dicafeoilquínico (do inglês “3,5-dicaffeoylquinic acid”)

4,5-diCQA - ácido 4,5-dicafeoilquínico (do inglês “4,5-dicaffeoylquinic acid”)

3-FQA - ácido 3-feruloilquínico (do inglês “3-feruloylquinic acid”)

4-FQA - ácido 4-feruloilquínico (do inglês “4-feruloylquinic acid”)

5-FQA - ácido 5-feruloilquínico (do inglês “5-feruloylquinic acid”)

3-*p*-CoQA - ácido 3-*p*-cumaroilquínico (do inglês “3-*p*-coumaroylquinic acid”)

4-*p*-CoQA - ácido 4-*p*-cumaroilquínico (do inglês “4-*p*-coumaroylquinic acid”)

5-*p*-CoQA - ácido 5-*p*-cumaroilquínico (do inglês “5-*p*-coumaroylquinic acid”)

CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO

Cada vez é maior a preocupação com a escolha de uma alimentação saudável, visto que existe uma forte associação entre os alimentos ingeridos e a saúde. As crescentes exigências, no que diz respeito à qualidade e segurança alimentar dos produtos, requerem que os produtores proporcionem aos consumidores informações sobre os mesmos. Para que isto se torne possível, é necessário investigar e recorrer a estudos, de modo a que o consumidor possa tomar uma decisão consciente no ato da sua escolha, com base no conhecimento que lhe é facultado sobre a qualidade do alimento, a composição química, a estabilidade e as propriedades do mesmo. Para além da informação nutricional, interessa indagar a presença e a quantificação de fitoquímicos, conhecidos por desempenharem funções antioxidantes, tendo por isso grande importância na prevenção de doenças.

Os níveis de oxidantes e antioxidantes num ser humano com um metabolismo normal são equilibrados, o que constitui um fator importante na manutenção fisiológica ótima. No entanto, a superprodução de oxidantes e/ou diminuição das defesas antioxidantes conduz a um desequilíbrio do estado redox que, conseqüentemente, origina danos oxidativos ao nível dos tecidos e células. Esta realidade criou expectativas sobre o uso dos recursos naturais, como é o caso das plantas. A composição complexa das plantas, que envolve uma mistura de diferentes antioxidantes, proporciona uma proteção mais reforçada comparativamente à de qualquer composto único. Deste modo, as propriedades antioxidantes presentes em algumas bebidas derivadas de plantas foram alvo de interesse, devido à sensação agradável que o seu consumo proporciona e à excelente eficácia comprovada por alguns autores. Nesta linha de pensamento, os investigadores têm-se focado no café, uma vez que diversos estudos comparam a sua capacidade antioxidante com a de outras bebidas (cerveja, chá, vinho, sumos, etc.) e concluem que o consumo moderado deste contribui para a redução do risco de desenvolvimento de doenças como cirrose, asma, doenças degenerativas (doença de Parkinson e Alzheimer) e diabetes tipo II (Alves *et al.*, 2010).

Tendo em conta estes factos, entendeu-se que o café seria uma proposta apelativa para o desenvolvimento de um estudo, uma vez que também é conhecido como sendo uma das

bebidas mais populares e conhecidas em todo o mundo (Panusa *et al.*, 2013). Segundo a *Internacional Coffee Organization*, são produzidos anualmente cerca de 120 milhões de sacos de café a nível mundial, correspondendo a mais de 7 milhões de toneladas de grãos de café por ano (Zuorro e Lavecchia, 2012).

Os grãos de café contêm diversos componentes interessantes, como por exemplo, compostos fenólicos, melanoidinas, diterpenos, xantinas, vitamina A, entre outros. Contudo, a cafeína é o precursor que desperta mais interesse em ser estudado, devido ao poder que tem sobre o metabolismo energético e aos efeitos psicoativos. Nos últimos anos, os compostos fenólicos têm despertado alguma curiosidade pela descoberta das suas propriedades antioxidantes e quelantes de metais. Como principal componente dos compostos fenólicos, salienta-se o ácido clorogénico, que vários estudos demonstraram ter benefícios em doenças como a aterosclerose, a diabetes e vários tipos de cancro (Panusa *et al.*, 2013).

O crescente consumo mundial de café e consequentes efeitos na saúde humana atçaram o interesse na comunidade científica, o que levou ao desenvolvimento de estudos relativos à atividade biológica do grão e dos constituintes do café, por ser muito usual em diversos tipos de bebidas (Lima *et al.*, 2010).

A atividade antioxidante presente nos constituintes do café verde foi também um tema a ser abordado neste trabalho. Procurou-se estudar os compostos de natureza fitoquímica do café verde que podem suscitar interesse nas áreas alimentar e farmacêutica, através do seu eventual emprego como ingredientes funcionais ou em medicamentos.

CAPÍTULO II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Café

O café é conhecido como uma das matérias-primas comercialmente mais importantes a nível internacional e é extremamente conhecido na Europa e América do Norte (Oliveira-Neto *et al.*, 2016), sendo que o seu consumo mundial tem vindo a aumentar anualmente em cerca de 1,9% ao longo dos últimos 50 anos (Lee *et al.*, 2015). É considerado o quinto produto mais amplamente negociado e milhões de pessoas dependem direta ou indiretamente da produção e venda do café (Bagyaraj *et al.*, 2015). O café é a terceira bebida mais consumida no mundo, a seguir à água e ao chá, para além de que, atualmente, beber infusões de café torrado ou instantâneo é uma rotina para dois terços da população mundial (Wang e Ho, 2009; Stelmach *et al.*, 2015).

A origem do café advém de uma família designada por *Rubiaceae* (Bagyaraj *et al.*, 2015). A planta do café foi cultivada pela primeira vez em África, na Etiópia mais precisamente e, seguidamente, introduzida na Arábia, Iémen e Egito, onde se desenvolveu e começou a introduzir-se no quotidiano da população. Acredita-se que os muçulmanos foram os primeiros a trazer o café para a Europa, enquanto os franceses foram os que o introduziram na América aquando da colonização dos vários continentes com plantações de café (Wang e Ho, 2009). Segundo Farinhoto (2012), cerca de 75 países produzem café, sendo o Brasil, o Vietname e a Colômbia os principais produtores. Contudo, alguns países produzem apenas uma das duas espécies de café, *Coffea arabica* ou *Coffea robusta*, enquanto outros optam por produzir ambas as espécies (Farinhoto, 2012).

Apesar de o café ser cultivado em qualquer região tropical e já se ter adaptado às mais variadas condições ecológicas, é fortemente dependente das circunstâncias meteorológicas (Farinhoto, 2012). No cultivo do café, a existência de sombra é um critério fundamental e dependente das condições ecológicas existentes no país/região em questão. No caso da Índia, o café cresce naturalmente e de forma diversificada na sombra das árvores, devido à grande variação da intensidade da luz, temperatura e humidade ao longo do ano. As altas temperaturas e a elevada intensidade luminosa

durante os meses de verão neste país criam tensões de água e calor, mas a existência de sombra garante as condições microclimáticas e a intensidade luminosa desejada para o crescimento da planta do café nas diferentes estações do ano. Por outro lado, a população microbiana presente no solo também constitui um fator essencial para o desenvolvimento da planta do café. As bactérias presentes no solo fornecem nutrientes, humidade e outros fatores físico-químicos ao ecossistema, criando assim uma inter-relação complexa e diversificada, que é extremamente benéfica para a exigência nutricional da cultura perene do café (Bagyaraj *et al.*, 2015).

O fruto do cafeeiro é constituído por uma casca, várias camadas subjacentes e o grão verde do café (Bresciani *et al.*, 2014). Na figura 1, é possível observar a estrutura de um grão de café e concluir que é composto por uma casca, designada por pericarpo, que abrange o mesocarpo externo, a camada de pectina e o endocarpo. O pericarpo apresenta, regra geral, cor verde quando o fruto se encontra imaturo e cor vermelho-violeta ou vermelho escuro quando o mesmo se encontra maduro. A camada mencionada como pele de prata envolve cada hemisfério do grão de café. O interior de cada camada referida anteriormente contém a semente, isto é, o grão de café cujo tamanho, tonalidade, forma e densidade podem variar com as condições de crescimento e o genótipo (Bresciani *et al.*, 2014; Farinhoto, 2012).

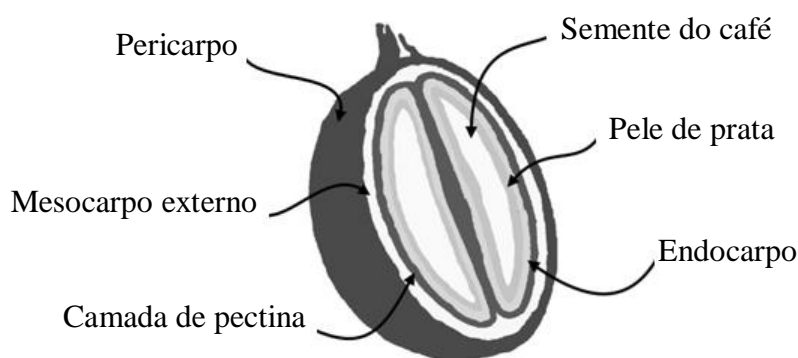


Figura 1. Estrutura do fruto do café (adaptado de Bresciani *et al.*, 2014).

Apesar de existirem diversas espécies de café, *Coffea arabica* e *Coffea robusta* são consideradas as principais e mais conhecidas a nível mundial (Farinhoto, 2012; Bagyaraj *et al.*, 2015). *Coffea arabica* é responsável por 75 a 80% da produção mundial

de café, enquanto a *Coffea robusta* corresponde apenas a 20 a 25% da mesma (Bagyaraj *et al.*, 2015). As diferenças entre ambas as espécies são perceptíveis quando se visualizam os grãos inteiros e se sente o seu aroma após a torra dos grãos (Farinhoto, 2012). Em comparação com os grãos de café da sp. *robusta*, os da *arabica* são tidos como sendo mais caros e valiosos pelas suas características organolépticas únicas (Bagyaraj *et al.*, 2015). Este facto explica a adulteração dos grãos de *Coffea arabica* com o intuito de se ter vantagem económica, enganando assim as organizações de importação de café e, conseqüentemente, o consumidor. É possível distinguir ambos os grãos de café pelas suas características organolépticas ou macroscopicamente, no entanto, a análise química aos mesmos é imprescindível no sentido de controlar o café em pó, após a sua trituração, e detetar uma possível adulteração da *Coffea arabica* com pequenas quantidades de *Coffea robusta*. O facto das espécies *arabica* e *robusta* possuírem perfis muito idênticos tem sido um desafio para a descoberta de um marcador que as distinga. Contudo, substâncias como ácidos gordos, enantiómeros de aminoácidos, cafeína, ácido clorogénico, lípidos, trigonelina e terpenos têm sido citadas para diferenciar ambas as espécies de plantas do género *Coffea* (Monakhova *et al.*, 2015; Farinhoto, 2012). No que diz respeito à composição química, *Coffea arabica* possui maior quantidade de lípidos, enquanto *Coffea robusta* contém maior teor de cafeína, sacarose e polifenóis, tais como ácidos clorogénicos e seus derivados (Farinhoto, 2012). Atualmente, *Coffea arabica* alcança um preço de mercado cerca de 20 a 25% mais elevado do que o *Coffea robusta*. A variedade e origem dos grãos, o tempo e condições de armazenamento, assim como as condições a que são submetidos durante o processo de torrefação, constituem parâmetros cruciais para a qualidade do café (Farinhoto, 2012). Portanto, é perceptível a preocupação em exigir garantias sobre a autenticidade das espécies do café (Bertone *et al.*, 2016).

Geralmente o café é classificado em função do tamanho, cor e percentagem de imperfeições do grão. Sendo assim, o café com defeito é denominado café de baixa qualidade devido às imperfeições que o constituem, como grãos danificados por insetos, grãos manchados, entre outras. Este tipo de defeito tem normalmente origem na fase de desenvolvimento do grão de café ou no tratamento do mesmo (Ramalakshmi *et al.*, 2009).

Uma particularidade da bebida do café é o facto de apresentar um valor nutricional irrelevante, sendo consumida pelos efeitos fisiológicos, nomeadamente a sua atividade estimulante, psicológicos e pelas propriedades sensoriais resultantes do aroma e sabor que a cafeína proporciona. O efeito estimulante da cafeína tem levado a que os consumidores reduzam a frequência do seu consumo, devido a possíveis efeitos colaterais sobre o sistema nervoso central, endócrino e cardiovascular (Gawlik-Dziki *et al.*, 2014). No entanto, estudos científicos comprovam que a cafeína presente no café desempenha um papel preventivo contra várias doenças degenerativas (Bonita *et al.*, 2007; Daglia *et al.*, 2000). Este facto deve-se particularmente ao conteúdo de polifenóis que o café possui, especialmente ácidos clorogénicos. Na verdade, a ingestão de café acelera o metabolismo da glucose e a sensibilidade à insulina, diminuindo assim o risco de diabetes tipo II, doença cardíaca coronária, acidente vascular cerebral, depressão, doença de Alzheimer e outras doenças relacionadas com o sistema nervoso central, como, por exemplo, a doença de Parkinson (Bresciani *et al.*, 2014).

2.2. Café Verde

O café verde caracteriza-se por ser leve, ter uma cor verde e um sabor semelhante ao do grão, intensificando-se este durante o processo de torrefação que o mesmo costuma sofrer para os seus usos mais comuns (Gawlik-Dziki *et al.*, 2014). O aroma do café verde é considerado estranho quando comparado com o do café torrado, o que se explica pela combinação de centenas de compostos químicos produzidos pelas reações ocorridas durante a torrefação (Farinhoto, 2012).

2.2.1. Benefícios

Os seus grãos contêm elevada concentração de ácidos fenólicos, em particular de polifenóis, como o ácido clorogénico (Narita e Inouye, 2011), que mostram ter potenciais efeitos hipotensores (Shimoda *et al.*, 2006) e antioxidantes (Stelmach *et al.*, 2015). Os ácidos clorogénico e cafeico apresentam propriedades antimutagénicas, anticancerígenas, antioxidantes e anti-inflamatórias (Gawlik-Dziki *et al.*, 2014). Segundo Narita e Inouye (2011), os ácidos fenólicos vão sendo progressivamente destruídos e transformados durante o processo de torrefação, originando produtos que podem exibir atividade antioxidante.

A existência de produtos ricos em antioxidantes, conhecidos por melhorar a saúde e facilitar a cura de certas doenças, conduziu a estudos sob o café verde e desta forma, à popularidade e ao sucesso do mesmo. Acredita-se então que as infusões de café verde aceleram o metabolismo, sendo esta circunstância bastante benéfica para quem pretende diminuir o seu peso e, assim, prevenir ou superar a obesidade. Estudos fisiológicos realizados em ratos evidenciaram que o extrato de café verde é um potencial inibidor da absorção de gordura e um supressor eficaz do seu metabolismo no fígado, contribuindo assim para a redução de peso corporal. Para além destes dados, também se verificou nestes animais um efeito anti-hipertensivo após a administração do extrato, que pode durar mais de 24 horas (Stelmach *et al.*, 2015).

O consumo da infusão de café verde proporciona ao organismo componentes fundamentais na regulação do metabolismo e ativação de enzimas cruciais para um crescimento e desenvolvimento saudável. Elementos presentes no café verde como cálcio, magnésio e potássio, também contribuem para os seus benefícios na saúde nomeadamente, na prevenção e estabilização da hipertensão. Estima-se que os minerais de café verde possam estar presentes em 3,0 a 4,5 g por cada 100 g deste café, sendo maioritariamente potássio e magnésio. Contudo, é sabido que a ingestão moderada da infusão deste tipo de café não contribui significativamente para a dose diária recomendada de elementos, o mesmo acontecendo com a do café torrado (Stelmach *et al.*, 2015).

2.2.2. Processo de torrefação

Aquando o processo de torrefação, a casca e camadas adjacentes do fruto do café são descartadas e é aproveitado o grão verde, ou seja, estima-se que cerca de 50% do fruto não é utilizado para a produção de café. Uma vez que o consumo desta bebida é elevado e que todos os outros componentes, para além do grão, são desperdiçados, acredita-se que estes poderiam originar um conceito promissor a ser estudado e empregue num contexto de novo design de alimentos funcionais. Contudo, até então poucos estudos foram publicados na literatura científica e esta parte do fruto não aproveitada para o fabrico de café tem sido empregue apenas como combustível e fertilizante, devido à sua riqueza em proteínas e fibras e pobreza em lípidos (Bresciani *et al.*, 2014).

Quanto ao café torrado, sabe-se que o processo de torrefação é imprescindível para a obtenção do sabor característico da tão conhecida bebida. Este processo, pelo qual os grãos de café verde passam, ocorre acima dos 200° C, conduzindo assim a uma série de transformações revelantes, quer a nível físico e químico, quer estrutural, que induzem à desidratação inicial do grão de café e degradação de proteínas, polissacarídeos, ácidos clorogénicos, entre outros componentes (Wang e Lim, 2014; Bertone *et al.*, 2016). A junção dos milhares de moléculas formadas na sequência deste processo proporciona o aroma peculiar e as propriedades sensoriais tão próprias desta bebida (Bertone *et al.*, 2016). A tonalidade dos grãos torrados constitui um importante marcador no processo de torrefação, que depende das condições de temperatura e tempo a que são submetidos. A cor do grão é avaliada qualitativamente, classificando-se o café resultante como torrado leve, médio ou escuro (Vignoli *et al.*, 2014). A alteração da cor do grão revela as transformações que estão a ocorrer e o grão mais ou menos escuro define o grau de torrefação, sendo que quanto mais tempo de torra o grão sofre, mais escuro este fica (Bertone *et al.*, 2016).

O processo de torrefação do café, a preparação da bebida e a concentração de cafeína da mesma alteram significativamente a composição química e as atividades biológicas do café. Estudos científicos revelam que o café verde apresenta maior atividade antioxidante do que o café torrado, sendo que a intensificação do processo de torrefação origina uma redução significativa da mesma (Moreira, 2013). A torrefação do café leva a uma progressiva destruição e transformação do ácido clorogénico, potente antioxidante, na ordem de 8 a 10% de perda. Tanto a infusão, como a fabricação do café instantâneo, levam a perdas significativas deste ácido (Garambone e Rosa, 2007). No entanto, o processo de torrefação é responsável pela produção de melanoïdinas que, por sua vez, são classificadas como sendo compostos com atividade antioxidante, e também pela formação de determinados compostos heterocíclicos voláteis, que têm sido descritos como tendo a mesma atividade descrita anteriormente (Vignoli *et al.*, 2014).

2.2.3. Atividade Antioxidante

O progressivo conhecimento sobre a composição química dos grãos de café verde conduziu à descoberta de compostos com atividade antioxidante. A definição generalizada de atividade antioxidante baseia-se na capacidade que um composto tem

para inibir a degradação oxidativa. Os radicais livres e outras espécies reativas de oxigénio e azoto, resultantes do metabolismo normal ou de fonte externa, podem danificar macromoléculas celulares, tais como lípidos, proteínas e ADN e originar doenças degenerativas, cardiovasculares ou até mesmo determinados tipos de cancro (Loureiro *et al.*, 2002; Willcox *et al.*, 2004). A suplementação, tendo por base compostos antioxidantes, tem sido muito procurada com o intuito de prevenir doenças provocadas por danos oxidativos (Sulamain *et al.*, 2011), pois este tipo de compostos protege os sistemas biológicos contra os efeitos prejudiciais das espécies reativas referidas anteriormente (Santos *et al.*, 2007). Portanto, é perceptível o interesse pela descoberta de antioxidantes novos e mais seguros. Os antioxidantes provenientes de fontes naturais, especialmente aqueles extraídos de plantas, são preferíveis em relação aos sintéticos, pois há suspeitas que estes últimos possam originar doenças cancerígenas, não estando ainda, no entanto, este facto comprovado (Zheng *et al.*, 2001). O consumo de alimentos ricos em antioxidantes proporciona uma barreira protetora contra o stresse oxidativo e fornece co-fatores para as enzimas antioxidantes endógenas (Lapointe *et al.*, 2006). Em relação ao poder antioxidante do café, está provado que este o possui em maior quantidade do que outras bebidas, como o cacau, o chá verde, o chá preto, o chá de ervas (Richelle *et al.*, 2001), a coca-cola, a cerveja e diversos sumos de fruta (Pellegrini *et al.*, 2003). Os extratos vegetais, incluindo os de café verde, que apresentam altas propriedades antioxidantes são empregues como antioxidantes naturais, proporcionando assim uma melhor estabilidade oxidativa dos produtos alimentares. O efeito antioxidante do café foi objeto de diversos estudos quanto ao prazo de validade dos produtos alimentares, em particular daqueles que contém uma determinada quantidade de gordura e são suscetíveis de dano oxidativo (Budryn *et al.*, 2013). A produção de alimentos com antioxidantes naturais, para além de proteger a oxidação dos alimentos, também contribui para um consumidor mais saudável. No entanto, é importante estar ciente que os benefícios dos produtos naturais, como o café verde, são reconhecidos maioritariamente pelos efeitos sinérgicos de toda a sua matriz e não tanto pela presença de substâncias específicas (Stelmach *et al.*, 2015).

2.3. Composição química

Até meados da década de 1990, as vitaminas, os carotenoides e certos minerais eram os antioxidantes mais estudados. Contudo, a pesquisa de flavonoides e polifenóis e o

interesse num conhecimento mais aprofundado sobre as suas propriedades antioxidantes e os seus efeitos na prevenção de determinadas doenças, só se iniciou a partir de 1995 (Scalbert *et al.*, 2005). Esta realidade pode ser observada no gráfico ilustrado na figura 2.

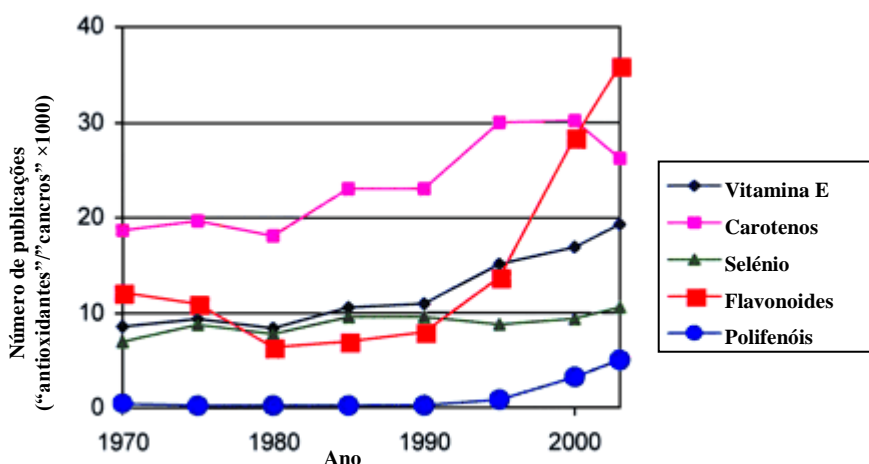


Figura 2. Gráfico que representa o número de publicações sobre seis tipos de antioxidantes entre 1970 e 2000 (adaptado de Scalbert *et al.*, 2005).

No decorrer dos últimos anos, os produtores de alimentos têm-se preocupado em satisfazer os consumidores do ponto de vista do desenvolvimento de compostos promotores de uma boa saúde. Dentro desta gama de compostos, é notório o interesse pela descoberta de antioxidantes naturais, que tem sido reforçado por: (i) estudos que têm comprovado que a ingestão de frutas e legumes reduz o risco de evolução de doenças crónicas conhecidas, como o cancro, doenças cardiovasculares, neurológicas, entre outras; (ii) o consumo diário de conservantes sintéticos, tanto em alimentos, como em bebidas, ter acarretado algumas inquietações acerca da segurança dos mesmos; (iii) a perceção positiva dos consumidores em relação aos fitoquímicos naturais como sendo mais seguros, comparativamente aos sintéticos, ter sido uma evidência (Martín-Sánchez *et al.*, 2014).

As substâncias que advêm das plantas foram estudadas e reconhecidas como fonte de compostos bioativos, como por exemplo, ácidos fenólicos (Martín-Sánchez *et al.*, 2014). Tendo em conta estes fundamentos é perceptível a utilidade em estudar e

descobrir a composição química, essencialmente em compostos bioativos, das plantas. Deste modo, este trabalho tem como finalidade fundamentar estes factos, pela determinação experimental de fitoquímicos nos grãos de café verde.

Para além dos compostos fitoquímicos, destacando-se a cafeína e o ácido clorogénico, os grãos de café verde contêm hidratos de carbono, lípidos, proteínas e minerais (Stelmach *et al.*, 2015). Estas substâncias variam em termos de quantidade para cada uma das duas espécies referidas ao longo deste trabalho, tal como se pode constatar na Tabela I.

Tabela I. Composição média do café verde, expressa em % matéria seca (adaptado de Farinhoto, 2012).

Constituinte	<i>Coffea arabica</i>	<i>Coffea robusta</i>
Cafeína	1,2	2,2
Trigonelina	1,0	0,7
Proteína	11,0	11,0
Glícidos	53,1	54,4
Ácidos		
clorogénicos totais	6,5	10,0
alifáticos	1,0	1,0
quínico	0,4	0,4
Lípidos totais	16,0	10,0
Minerais	4,2	4,4
Compostos orgânicos voláteis	< 0,1	< 0,1

2.3.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos descrevem-se por serem metabolitos secundários sintetizados por qualquer parte da planta, quer em condições de equilíbrio, quer de stresse (Kraljic *et al.*, 2015). Os polifenóis são considerados os antioxidantes mais abundantes na dieta, estando presentes em fontes alimentares como frutas e bebidas provindas de plantas, como por exemplo, sumos de fruta, chá, vinho tinto e café (Scalbert *et al.*, 2005). As

suas propriedades antioxidantes têm origem, não só na sua capacidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também na existência de radicais intermediários estáveis que têm a finalidade de impedir a oxidação de diversos ingredientes presentes nos alimentos, particularmente de lípidos. Para além desta função antioxidante, também podem funcionar como pigmentos, dando a aparência colorida aos alimentos (Silva *et al.*, 2010).

A atividade antioxidante detetada nos polifenóis reforça as evidências que têm surgido sobre o papel destes na prevenção de doenças cardiovasculares, cancro, doenças degenerativas crónicas, como doenças neurodegenerativas, osteoporose, diabetes *mellitus*, degeneração macular e cataratas (Scalbert *et al.*, 2005; Farah e Donangelo, 2006; Farinhoto, 2012). Apesar de tudo, é importante referir que, a maioria destas evidências, têm por base experiências realizadas *in vitro* ou em animais, recorrendo a doses mais elevadas do que as que o ser humano pode incluir na sua dieta (Scalbert *et al.*, 2005). Para além do elevado potencial antioxidante que estes compostos possuem, também foram demonstrados outros efeitos benéficos para a saúde, como efeito hepatoprotetor e hipoglicémico, atividade antiviral e antiespasmódica (Farah e Donangelo, 2006). Na indústria alimentar e farmacêutica, as substâncias fenólicas têm sido empregues como flavorizantes, corantes, aromatizantes e, sobretudo, como antioxidantes (Firmino, 2011).

O café é rico em polifenóis, sendo o ácido clorogénico o que está presente em maior quantidade, seguindo-se os ácidos cafeíco, ferúlico e *p*-cumárico (Vignoli *et al.*, 2014; Belguidoum *et al.*, 2014). Estes ácidos, em conjunto, contribuem para o sabor tão diferente da bebida do café, revelando também ter propriedades antioxidantes. Assim sendo, estes polifenóis têm sido alvo de atenção por apresentarem capacidade de combater radicais nocivos, estabelecendo assim o equilíbrio oxidativo do sistema fisiológico. Os polifenóis, mais precisamente aqueles que possuem grupos hidroxilo na posição para- e orto-, têm mais facilidade em participarem em reações redox e, por serem capazes de transportar elétrons, sofrem oxidação (Oliveira-Neto *et al.*, 2016).

Os compostos fenólicos podem ser agrupados em classes, tendo em conta a sua estrutura química base (tipo e número de anéis fenólicos), e subclasses, de acordo com as substituições feitas na estrutura base, como a associação com hidratos de carbono e

formas polimerizadas (Farah e Donangelo, 2006). A estrutura dos compostos fenólicos é formada por vários grupos benzênicos característicos e substituintes, como grupos hidroxilo. Estes compostos dividem-se em dois grupos: os flavonoides (polifenóis) e os não-flavonoides (fenóis simples ou ácidos). A classe dos flavonoides irá ser referida neste trabalho mais à frente, enquanto a classe dos não-flavonoides é referida a seguir. Assim sendo, na última classe mencionada estão incluídos os derivados dos ácidos hidroxibenzóicos (Figura 3A) e hidroxicinâmicos (Figura 3B). A sua atividade antioxidante é influenciada pela posição dos grupos hidroxilo e pela proximidade do grupo $-CO_2H$ ao grupo fenilo. Quanto maior for esta proximidade, maior é a propriedade antioxidante do grupo hidroxilo na posição *meta* (Silva *et al.*, 2010).

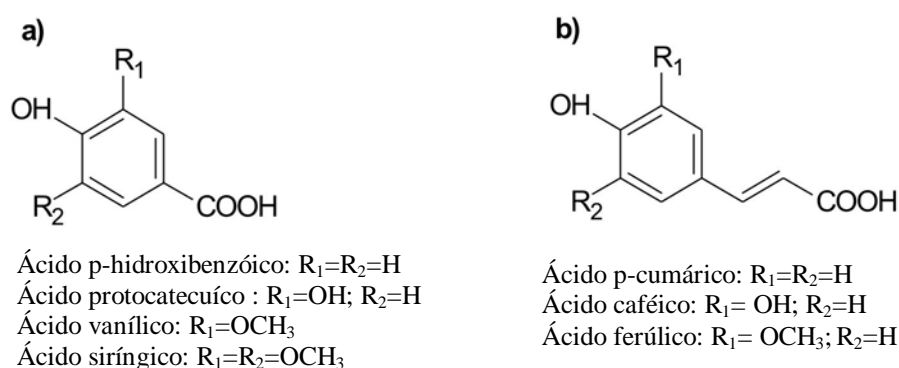


Figura 3. Estruturas químicas dos ácidos hidroxibenzóicos (A) e hidroxicinâmicos (B) (adaptado de Milene e Neuza, 2007).

Os principais compostos fenólicos não-flavonoides derivados dos ácidos hidroxicinâmicos são os ésteres dos ácidos cafeico, cumárico e ferúlico. Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálgico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico (Farah e Donangelo, 2006).

A fração fenólica que se encontra presente em maior abundância no café, resulta da esterificação entre uma a três moléculas de ácido *trans*-hidroxicinâmico e uma molécula de ácido quínico, sendo a estrutura resultante conhecida como ácido clorogénico (Figura 4). Contudo, também estão presentes nos grãos de café outros compostos fenólicos, mas em menor quantidade, tais como taninos, lignanas e antocianinas (Farah e Donangelo, 2006).

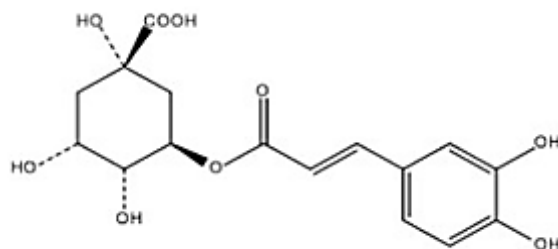


Figura 4. Estrutura química do ácido clorogénico (adaptado de Farinhoto, 2012).

Tal como foi referido anteriormente, os grãos de café verde são muito ricos em ácidos clorogénicos, sendo que 5 a 12 g é a quantidade destes ácidos existente em 100 g de café verde (Dziki *et al.*, 2015; Farah *et al.*, 2008). Contudo, é importante destacar que para as duas espécies de café mencionadas neste trabalho, a quantidade destes ácidos é significativamente diferente. Ou seja, o conteúdo em ácidos clorogénicos da *Coffea arabica* varia entre 3,5 e 7,5% (m/m matéria seca), enquanto para a *Coffea robusta* se situa entre 7,0 e 14,0% (m/m matéria seca) (Dziki *et al.*, 2015). Segundo Dziki *et al.* (2015), para os grãos de café verde têm sido mencionados 34 tipos de ácidos clorogénicos. No entanto, estes podem-se agrupar em três classes principais: os ácidos cafeoilquínicos com três isómeros (3-, 4- e 5-CQA), os ácidos dicafeoilquínicos com três isómeros (3,4-, 3,5- e 4,5-diCQA) e os ácidos feruloilquínicos, também, com três isómeros (3-, 4- e 5-FQA). Estes nove tipos de ácidos clorogénicos constituem cerca de 80% da quantidade destes ácidos nos grãos de café verde (Dziki *et al.*, 2015). De acordo com Farah (2008), os ácidos *p*-cumaroilquínicos, que apresentam três isómeros (3-, 4- e 5-*p*-CoQA), também são considerados como um dos principais grupos de ácidos clorogénicos.

Quanto à ingestão de polifenóis (incluindo flavonoides), considera-se que esta não deve ser inferior a 1 a 2 g por dia. Curiosamente, na Polónia são consumidos diariamente na dieta uma média de 0,032 g de polifenóis; na Finlândia são apenas 0,003 g; no Japão, 0,068 g e nos EUA, 1,1 g (Cieslik *et al.*, 2006).

2.3.2. Flavonoides

Amplamente distribuídos por legumes, frutas e bebidas, como vinho tinto e chá, os flavanóides são responsáveis, em grande parte, pela cor e sabor característicos destes alimentos (Sadowska-Bartosz *et al.*, 2014).

Os flavonoides são conhecidos como uma das maiores classes de compostos polifenólicos. É sabido que, após a ingestão de flavonoides, estes são metabolizados em vários ácidos fenólicos (Lilamand *et al.*, 2014). A estrutura dos flavonoides é derivada de uma benzopirona e a sua base C6-C3-C6 é caracterizada por dois anéis fenil – A e B – ligados através de um anel pirano – C –, conforme se pode observar na figura 5 (Wang e Ho, 2009).

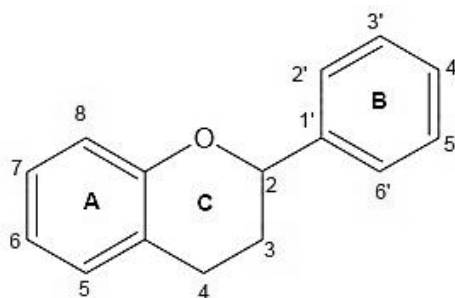


Figura 5. Estrutura química dos flavonoides (adaptado de Cruz, 2008).

Com o intuito de garantir a sua atividade antioxidante, devem estar presentes os átomos de hidrogénio dos grupos hidroxilo adjacentes (*o*-difenois), localizados em várias nas posições dos anéis A, B e C, as duplas ligações dos anéis benzénicos e a dupla ligação da função oxo (-C=O) de determinadas moléculas de flavonoides (Silva *et al.*, 2010). Além da cedência de eletrões aos radicais livres, os flavonoides, mais precisamente, as isoflavonas, manifestam as suas capacidades através de mecanismos de modulação das vias de sinalização celular, interações com a mitocôndria e alterações na expressão genética (Costa, 2012). Estes compostos bioativos apresentam-se sob a forma de flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas dependendo das substituições no anel C presente na estrutura geral dos flavonoides (Firmino, 2011; Silva *et al.*, 2010). A figura 6 apresenta as estruturas químicas de alguns flavonoides descritos anteriormente.

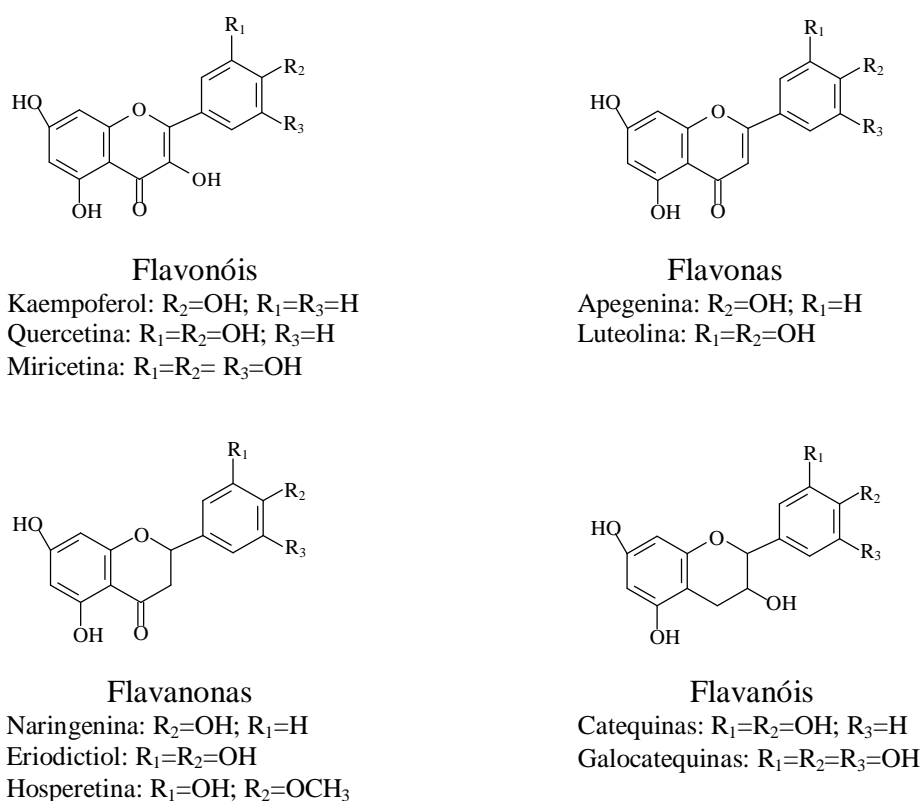


Figura 6. Exemplos de alguns flavonoides mais comuns (adaptado de Cruz, 2008).

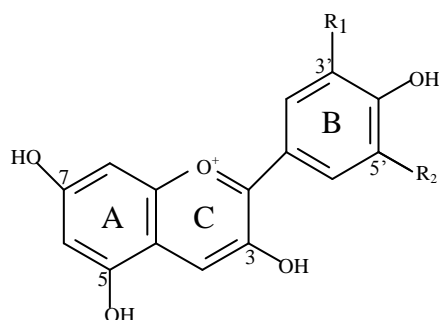
Segundo Yin *et al.* (2015), existe uma correlação significativa entre o teor de flavonoides e a atividade antioxidante e esta relação é compreensível, uma vez que os flavonoides fazem parte de uma das classes de polifenóis. Para além das propriedades antioxidantes, também se constatarem outras aquando do consumo de alimentos ricos em flavonoides, tais como antibacteriana, anti-inflamatória, antiulcerosa, anti-hiperlipidemia, analgésica, bem como atividade antidepressiva e melhorias na parte cognitiva (Yin *et al.*, 2015). Verificou-se também que as isoflavonas são flavonoides preventivos de determinadas doenças como o cancro, doenças cardiovasculares e osteoporose (Costa, 2012).

Tem-se verificado um interesse muito grande pelas propriedades biológicas dos flavonoides e pelo facto de estes poderem ser utilizados como substitutos de antioxidantes sintéticos, não só pela área alimentar, mas também pela cosmética e pela indústria farmacêutica (Costa, 2012).

2.3.3. Antocianinas

As antocianinas são uma subclasse da família dos polifenóis, cujos pigmentos naturais conferem as tonalidades vermelha, azul e roxo a uma variedade de frutas e flores (Oliveira, 2014; Sui *et al.*, 2014)

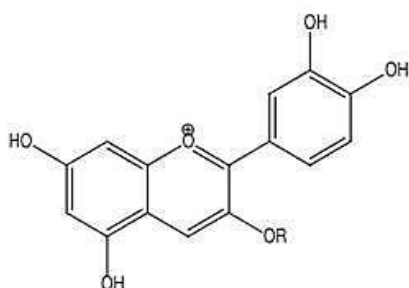
Consideradas como sendo flavonoides, as antocianinas apresentam na sua estrutura base um núcleo flavano e caracterizam-se maioritariamente por serem glicosídeos das antocianidinas (Urias-Lugo *et al.*, 2015; Sui *et al.*, 2014; Cruz, 2008). Os fatores genéticos influenciam as substituições nos carbonos 3 e 5 do anel B, definindo assim as antocianidinas (Cruz, 2008). Tendo em conta a ampla variedade de antocianidinas presentes na natureza, existem seis que aparecem com maior frequência e são consideradas mais importantes na dieta alimentar, sendo essas conhecidas por delfinidina, cianidina, peonidina, pelargonidina, petunidina e malvidina (Figura 7). A cianidina é considerada a mais comum na dieta, sendo os seus compostos glicosídeos os mais amplamente distribuídos na natureza (Oliveira, 2014). Quanto às substituições no anel B, estas são responsáveis pela alteração da cor, pelo pH, pela concentração em solução e pela presença de co-pigmentos (Cruz, 2008).



Antocianidinas	R1	R2
Perlagonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OMe	H
Petunidina	OMe	OH

Figura 7. Estrutura química da antocianidina e referência às principais antocianidinas presentes em alimentos (adaptado de Cruz, 2008).

As antocianinas diferem entre si devido ao número e posição de grupos metoxilo e hidroxilo, à natureza e número de açúcares acoplados, à posição de cada ligando e ao grau de esterificação com ácidos alifáticos ou aromáticos conectados aos açúcares na molécula (Oliveira, 2014). Segundo este mesmo autor, as fortes possibilidades de conjugação entre as antocianinas e os resíduos de açúcar que se podem ligar, levam à descoberta e identificação de centenas de antocianinas (Figura 8). Os açúcares mais frequentemente encontrados são mono e dissacarídeos como glicose, ramnose, galactose, xilose e arabinose. Geralmente, é mais comum os açúcares ligarem-se à posição 3 do anel C ou, então, à posição 5 e/ou 7 do anel A (Figura 7). As antocianinas podem ser alvo de acilações nas moléculas de açúcar, destacando-se os ácidos *p*-cumárico, cafeíco, ferúlico ou sinápico, que se distinguem por serem os mais comuns, enquanto os ácidos *p*-hidroxibenzóico, malónico ou acético são, de facto, os menos aplicados. É importante ter conhecimento que estas acilações beneficiam as interações entre as antocianinas e os outros compostos como, por exemplo, flavonoides, aminoácidos ou polissacarídeos, na medida em que promovem a ligação covalente entre ambos. Essa associação química aumenta a estabilidade das antocianinas, assim como as suas funções antioxidantes (Cruz, 2008).



R= arabinose – cianidina-3-arabinosídeo
 R= galactosídeo – cianidina-3-galactosídeo
 R= glucosídeo – cianidina-3-glucosídeo
 R= xilose – cianidina-3-xilose

Figura 8. Estrutura química da cianidina e possíveis conjugações com açúcares (adaptado de Oliveira, 2014).

Estudos recentes têm demonstrado que certas interações químicas, para além de terem influência na estabilidade das antocianinas, também são responsáveis pelo seu poder antioxidante sob determinadas atividades biológicas, tais como antimutagênica, anticancerígena, protetora gástrica, entre outras (Cruz, 2008). Na Figura 9 é possível observar que certos grupos estruturais podem cooperar para a atividade antioxidante característica das antocianinas.

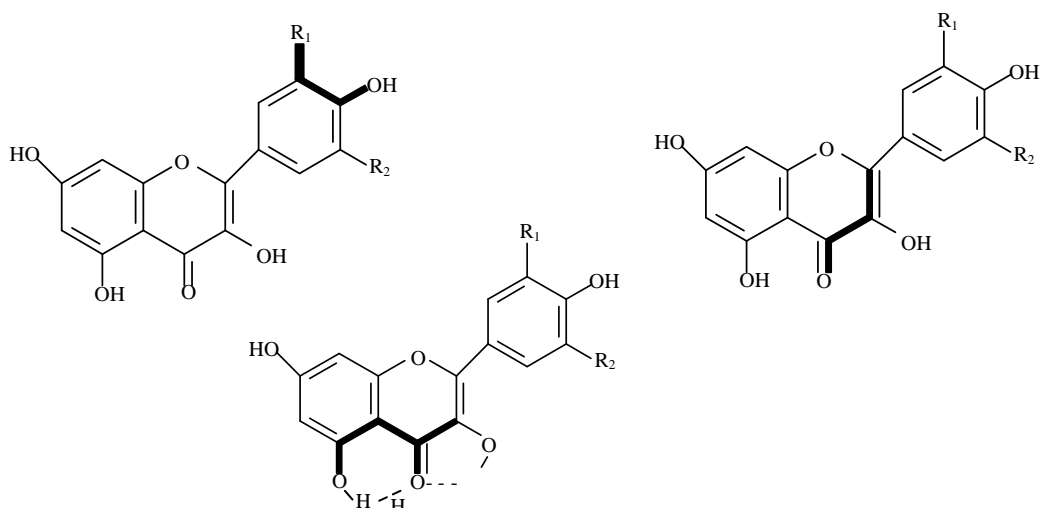


Figura 9. Estruturas químicas das antocianinas com grupos estruturais que contribuem para a sua atividade antioxidante (adaptado de Cruz, 2008).

Assim sendo, a deficiência em eletrões do núcleo flavílio e a presença de hidroxilos livres e de outras estruturas químicas na molécula contribuem para as características antioxidantes das antocianinas (Cruz, 2008).

A estrutura química das antocianinas tem um impacto sobre as suas propriedades químicas, como também influencia a sua estabilidade, cor, equilíbrio em água, efeito de copigmentação, atividade antioxidante e biológica. Os fatores ambientais como temperatura, luz, oxigénio, pH; as enzimas; a presença de compostos fenólicos; os iões metálicos; os açúcares e o ácido ascórbico afetam a estabilidade das antocianinas quanto à sua coloração e propriedades nutricionais, restringindo assim a sua aplicação em alimentos (Sui *et al.*, 2014; Oliveira, 2014) As antocianinas são compostos reativos e facilmente degradados e, quando algumas reações, formam compostos incolores ou até mesmo castanhos (Oliveira, 2014).

Segundo Czamanski (2013), para além do papel das antocianinas como corante, estas também têm despoletado um grande interesse pelo facto de a sua atividade antioxidante ser superior à da vitamina E, do butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT). O efeito protetor que supõe ter é atribuído à sua capacidade de excluir espécies reativas do oxigénio (Urias-Lugo *et al.*, 2015) e, em conjunto com as suas propriedades anti-inflamatórias, as antocianinas contribuem para a redução do risco de doenças

cardiovasculares e de outras patologias relacionadas com stresse oxidativo (Sui *et al.*, 2014). Curiosamente, em frutas e legumes, as antocianinas e os seus extratos ricos nestes compostos bioativos mostram ter propriedades antiproliferativas contra vários tipos de células cancerosas *in vitro* (Urias-Lugo *et al.*, 2015). O grande interesse científico pelas antocianinas deve-se à sua constante presença na dieta humana, quando comparada com a de outros flavonoides, fazendo com que grande parte dos benefícios apurados aquando do consumo de plantas e vegetais ricos em polifenóis seja da responsabilidade destes compostos bioativos (Oliveira, 2014).

2.3.4. Carotenoides

Os carotenoides apresentam-se como pigmentos lipossolúveis, cujas cores variam entre amarelo claro e vermelho, e se acumulam nos cromoplastos de folhas, flores, frutos, raízes e sementes (Silva *et al.*, 2010; Wondracek *et al.*, 2011). Biossintetizados primordiamente por algas no oceano e produzidos por diversas bactérias, fungos e plantas (Silva *et al.*, 2010; Marova *et al.*, 2012), os carotenoides devem ser obtidos a partir da dieta, pois os animais não os conseguem sintetizar (Li e Beta, 2012; Marova *et al.*, 2012). Estes compostos bioativos dispersam-se em zonas tropicais e subtropicais, em que o clima favorece a sua síntese, sendo compreensível que flora brasileira seja uma das mais ricas em carotenoides (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2008).

A nível comercial, este tipo de composto bioativo é empregue como corante alimentar e suplemento nutricional (Marova *et al.*, 2012). Curiosamente, a ingestão de carotenoides é comumente realizada por pássaros, peixes e invertebrados devido aos seus pigmentos, responsáveis pelas cores tão características destes (Havaux, 2013). Tem-se verificado um progressivo interesse pelos carotenoides como antioxidantes naturais, no tratamento de doenças crónicas, assim como noutras situações patológicas e decorrentes do envelhecimento (Marova *et al.*, 2012). No organismo humano, certos carotenoides podem ser convertidos em vitamina A e outros estão relacionados com a diminuição do risco de desenvolvimento de doenças crónico-degenerativas, devido à capacidade antioxidante que têm (Wondracek *et al.*, 2011).

A característica comum na estrutura dos carotenoides é a cadeia polieno, uma longa cadeia com ligações duplas conjugadas, que configura a “espinha dorsal” da molécula. Esta cadeia pode conter grupos terminais cíclicos com substituintes contendo oxigênio. O sistema conjugado, sendo rico em elétrons, torna-se responsável pela atividade antioxidante dos carotenoides. Estas ligações facilitam a oxidação dos carotenoides, conduzido à perda da coloração dos alimentos (Silva *et al.*, 2010).

Os carotenoides podem ser divididos em duas principais classes: (i) carotenos ou carotenoides hidrocarbonados, constituídos unicamente por carbono e hidrogênio, como por exemplo, α e β -caroteno e licopeno e (ii) xantofilas, que são derivados oxigenados dos carotenos, como por exemplo, luteína e zeaxantina (Silva *et al.*, 2010; Havaux, 2013). As estruturas químicas dos carotenoides anteriormente referidos podem ser observadas na figura 10.

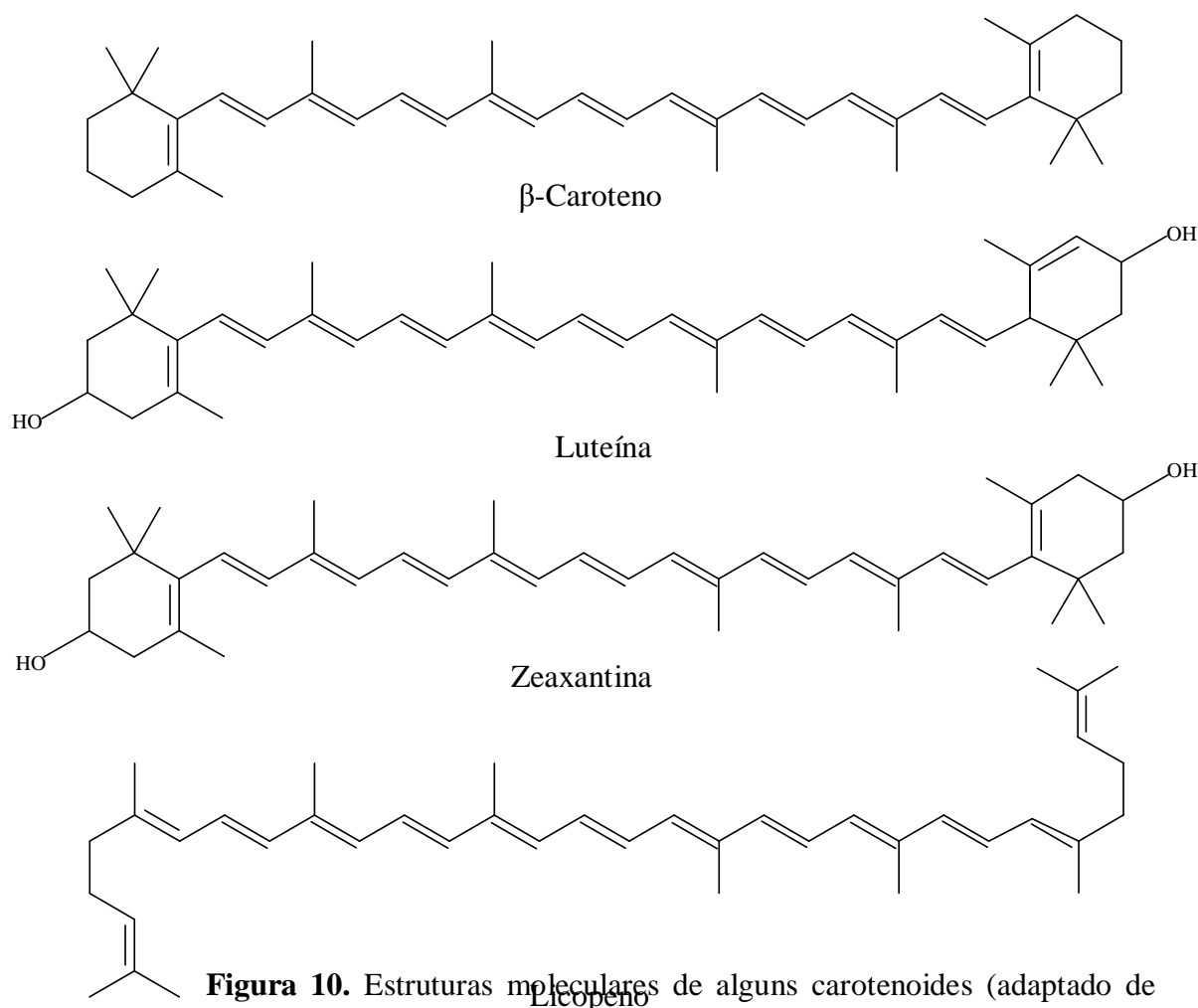


Figura 10. Estruturas moleculares de alguns carotenoides (adaptado de Silva *et al.*, 2010).

Segundo Li e Beta (2012), o β -caroteno desempenha um papel crucial na biossíntese da vitamina A, cujo fator é essencial na reprodução celular e no desenvolvimento saudável do embrião e feto, assim como a nível visual. Para além dos papéis desempenhados pelos carotenoides na promoção da saúde já referidos anteriormente, Silva *et al.* (2010) afirmam que existe uma forte associação entre uma dieta rica em β -caroteno e um baixo risco de morte prematura relacionada com as doenças coronárias. Quanto à luteína e à zeaxantina, estas também são responsáveis pela saúde dos olhos e da pele, o que se explica pelo facto de ambas constituírem os pigmentos amarelos que fazem parte da mácula lútea da retina do olho humano (Li e Beta, 2012).

CAPÍTULO III. OBJETIVOS

O objetivo primordial deste trabalho é dar a conhecer as características fitoquímicas e propriedades antioxidantes que possam estar presentes no grão de café verde. Para o estudo laboratorial das mesmas, realizou-se uma série de trabalhos experimentais, começando-se por extrair os compostos bioativos existentes no grão de café. Recorrendo a um método colorimétrico, quantificaram-se os compostos fenólicos totais, os flavonoides e os carotenoides.

CAPÍTULO IV. MATERIAIS E MÉTODOS

As experiências laboratoriais foram realizadas nos laboratórios da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa.

4.1. Recolha e tratamento da amostra

Os grãos de café verde utilizados laboratoriais têm origem em Cabo Verde e são embalados pela Sociedade Comercial Vasconcelos Lopes, Lda. A partir da trituração dos grãos dos cafés, obteve-se café verde moído, servindo este como amostra.

4.2. Reagentes e equipamentos

4.2.1. Reagentes

Acetona (Merck, Darmstadt, Germany)

Ácido gálico (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)

Carbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Germany)

Cloreto de alumínio (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)

n-Hexano (Merck, Darmstadt, Germany)

Hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Germany)

Nitrito de sódio (SIGMA Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)

Reagente Folin-Ciocalteau (RFC) (Merck, Darmstadt, Germany)

4.2.2. Equipamentos

Balança eletrónica (Ohaus Mb35)

Centrifuga (Haraeus Labofuge 2000)

Espectrofotómetro UV/Vis (Analytikjena, Jena Specord 200)

Moinho (Moulinex)

Vórtex (Heidolph Reax Top)

4.3. Procedimento experimental

4.3.1. Determinação do teor de humidade

Submeteu-se 1 g de café verde moído a uma temperatura de 105°C, até massa constante. O teor de humidade foi determinado instrumentalmente, recorrendo à balança eletrónica. Os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados expressos em percentagem (%) de humidade.

4.3.2. Determinação dos compostos bioativos

As experiências laboratoriais foram realizadas usando extratos de grão de café verde.

4.3.2.1. Preparação dos extratos

Misturou-se 2,5 g de café verde moído com 25,0 ml de água desionizada, agitou-se e mantendo a temperatura a 40° C durante 60 minutos, segundo Costa *et al.* (2014). Preparou-se os extratos aquosos em triplicado a partir de cada amostra de café verde. Os extratos obtidos foram filtrados e congelados a -25°C, para posterior análise.

4.3.2.2. Fenólicos totais

De acordo com a metodologia previamente explicada por Alves *et al.* (2010), colocaram-se num tubo de ensaio 500,0 µl de extrato aquoso, ao qual se adicionaram 2,5 ml de RFC diluído em água desionizada (1:10) e 2,0 ml de carbonato de sódio (Na₂CO₃, 7,5%). Os extratos aquosos foram colocados num banho a uma temperatura de 45°C, durante 15 minutos, ao abrigo da luz. De seguida, deixaram-se em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos. As leituras das absorvências foram efetuadas a 750 nm.

Os resultados foram traduzidos em equivalentes de ácido gálgico em mg por g de amostra, recorrendo à reta de calibração de ácido gálgico, elaborada no decorrer das determinações.

4.3.2.3. Flavonoides totais

Num tubo de ensaio juntaram-se 1,0 ml de extrato aquoso, 4,0 ml de água destilada e 300,0 µl de nitrato de sódio a 5%. Após 5 minutos acrescentaram-se 300,0 µl de cloreto de alumínio a 10% e esperou-se 1 minuto. Adicionaram-se 2,0 ml de solução de hidróxido de sódio 1,0 mol/l e 2,4 ml de água destilada e agitou-se no vortex. Leram-se as absorvências a 510 nm e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico em mg por g de amostra.

4.3.2.4. Antocianinas

Este método colorimétrico baseia-se na quantificação das absorvências de duas soluções com acidez diferente, preparadas para cada amostra em estudo, a 520 nm, segundo o protocolo publicado pela Farmacopeia Portuguesa (2010).

A solução I foi preparada através da adição de 1,0 ml de extrato, 1,0 ml de etanol com 0,1% de HCl concentrado e 10,0 ml de solução tampão (pH 3,5).

A solução II foi preparada através da adição de 1,0 ml de extrato, 1,0 ml de etanol com 0,1% de HCl concentrado e 10,0 ml de HCl a 2% (pH 6,0). O teor dos compostos antocianínicos foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Antocianinas totais (mg/L)} = 400 \times (\text{abs}_{\text{solução I}} - \text{abs}_{\text{solução II}})$$

Os resultados apresentados foram expressos em equivalentes de ácido gálico em mg por g de amostra.

4.3.2.5. Carotenoides

Pesou-se 1 g (massa rigorosa) de café verde e adicionaram-se 10,0 ml de acetona-hexano (4:6) para extrair os compostos bioativos presentes. Submeteu-se esta mistura a centrifugação a 5000 rpm durante 30 minutos. Mediu-se a absorvência do sobrenadante resultante a 663, 645, 505 e 453 nm. Este procedimento experimental realizou-se em triplicado. Os cálculos foram efetuados de acordo com as seguintes fórmulas:

- Clorofila a (mg/100ml) = $0,999A_{663} - 0,0989A_{645}$
- Clorofila b (mg/100ml) = $- 0,328A_{663} + 1,77A_{645}$
- β -Caroteno (mg/100ml) = $0,216A_{663} - 1,22A_{645} - 0,304A_{505} + 0,452 A_{453}$
- Licopeno (mg/100ml) = $- 0,0458A_{663} + 0,204A_{645} + 0,372A_{505} + 0,0806 A_{453}$

CAPÍTULO V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise do teor de humidade

A determinação do teor de humidade é fundamental no sentido de avaliar a quantidade de água presente num determinado produto, uma vez que esta em quantidades indesejáveis poderá ser um elemento a favor da alteração do alimento. A quantidade de água num alimento afeta parâmetros essenciais, como a sua segurança, qualidade, estrutura e deterioração (Fernandes, 2013). Assim sendo, determinou-se o teor de humidade presente nos grãos de café verde moídos.

Com base no resultado obtido verifica-se que o café verde apresenta um teor de humidade de 6,67%. Segundo a *Fucape Business School*, os compradores de café classificam-no como sendo seco, quando o teor de humidade varia entre 12 a 13% ou muito seco, quando este se encontra abaixo de 12,0%. Tendo em conta estes dados e comparando-os com o resultado obtido, pode-se concluir que o café estudado é um produto muito seco (Fucape Business School, 2011).

5.2. Análise dos compostos bioativos

Os compostos bioativos são substâncias que existem naturalmente nas plantas, como por exemplo, β -caroteno, licopeno, flavonoides, entre outras já mencionadas anteriormente. Devido à sua ação no sequestro de radicais livres, estes compostos são considerados antioxidantes que atuam no organismo pela intervenção da medicina, da alimentação ou da cosmética (Hamid *et al.*, 2010).

Nesta análise pretendeu-se determinar os teores em compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas e carotenoides (clorofila a, clorofila b, β -caroteno e licopeno), recorrendo à espectrofotometria. Os valores médios de concentração obtidos encontram-se nas Tabela II e III.

Tabela II. Resultados obtidos para a quantificação dos compostos bioativos (fenólicos totais, flavonoides totais e antocianinas) no café verde.

Compostos bioativos (mg/ g)			
Amostra	Fenólicos totais	Flavonoides totais	Antocianinas
Café verde	4,855±0,010	41,2 ± 0,9	0,465±0,022

Resultados expressos em média ± desvio padrão.

Notoriamente os compostos bioativos mais abundantes no café verde estudado foram os flavonoides totais, com um valor de 41,2 mg/g, seguindo-se os fenólicos totais (4,855 mg/g) e, por último, as antocianinas (0,465 mg/g).

Tendo em conta o resultado encontrado para os fenólicos totais (4,855 mg/g) e comparando-o com o valor médio obtido por Cheong *et al.* (2012), 31,01 mg/g, e com os 28,4 mg/g determinados por Stelmach *et al.* (2015), pode-se afirmar que o teor em compostos fenólicos é inferior para o café verde estudado, apresentando-se, no entanto, concordante com os valores publicados por Abrahão *et al.* (2010) (5,10 mg/g) e por Murthy *et al.* (2012) (4,55 mg/g).

No trabalho de Cheong *et al.* (2012), a discrepância de valores pode ser explicada pela diferente origem do café verde, sendo que o deste trabalho tem origem em Cabo Verde e os cafés referidos no artigo são da Indonésia (Kopi Luwak e Sidikalang), Tailândia (Doi Chang) e China (Yunnan). Apesar de terem usado o mesmo tempo de extração (60 minutos) e o mesmo método de determinação da capacidade antioxidante (Folin-Ciocalteu), o rácio massa de café verde moído utilizado para preparar os extratos / volume de solvente foi maior, além de que o solvente extrator foi diferente, sendo que o metanol, o hexano ou o diclorometano são quantitativamente mais promissores na extração deste tipo de compostos. O artigo de Stelmach *et al.* (2015) faz referência ao café provindo de diferentes regiões do mundo (Brasil, Índia, Nicarágua, Salvador, Etiópia, Peru, Guatemala, Costa Rica, Colombia). O facto de a origem do café analisado ser de Cabo Verde pode contribuir significativamente para a diferença de valores. Para além disso, a temperatura de extração (90°C) foi superior à usada neste estudo, o que

aumenta a eficácia do processo de purificação, justificando a média dos resultados obtidos para os fenólicos por Stelmach *et al.* (2015), 28,4 mg/g, relativamente ao determinado neste trabalho, 4,855 mg/g. É importante referir que, embora a temperatura de extração do estudo de Stelmach *et al.* (2015) tenha sido superior, o tempo de contacto entre a amostra de café verde moído e o solvente extrator foi da ordem de alguns segundos.

A origem do café analisado por Abrahão *et al.* (2010) também é diferente (Sul de Minas, Brasil) e a temperatura de extração superior (90°C). O método utilizado foi o de Folin-Denis, equivalente ao de Folin-Ciocalteu, e o solvente usado foi o mesmo que o empregue neste trabalho, o que explica a concordância de valores, embora o tempo de contacto entre a amostra e o solvente extrator tenha sido muito pequeno.

Comparando o valor de fenólicos totais (4,55 mg/g) referido no estudo de Murthy *et al.* (2012), que recorreu ao método Folin-Ciocalteu, usando uma mistura de HCl em metanol, durante 18 h a 4°C, com a concentração determinada no âmbito deste estudo, conclui-se que são semelhantes.

Relativamente ao resultado experimental obtido para a concentração de flavonoides presentes na amostra testada irá ser comparado com os do café *espresso* originário da Croácia, mais precisamente com os do café *espresso classic bean* e o *espresso super arabica 100% bean* incluídos no estudo realizado por Niseteo *et al.* (2012) e, também, com os do café verde (*Coffea arabica*) provenientes do Brasil e referidos no artigo de Moreira *et al.* (2013). Começando por analisar os resultados apresentados por Niseteo *et al.* (2012), pode-se afirmar que a concentração de flavonoides no café verde utilizado neste estudo, 41,2 mg/g (=4140,5 mg/L), é maior do que em ambos os cafés *espressos*, apresentando o *espresso classic bean* uma concentração aproximadamente igual a 30,0 mg/g e o outro *espresso*, 20,0 mg/g. De acordo com estes resultados, a torrefação parece diminuir a quantidade de flavonoides, o que está de acordo com o reportado por Moreira *et al.* (2013).

Repara-se que café *espresso* difere do café verde porque é preparado a partir dos grãos de café torrado, ou seja, os seus grãos são submetidos a um processo de torrefação que, por sua vez não é aplicado aos grãos de café verde (Oliveira *et al.*, 2015).

Embora o café expresso também seja preparado com água quente, que passa sob altas pressões pelo café moído (Andueza *et al.*, 2007), é de notar que os tempos e a temperatura de extração foram diferentes.

Para além da torrefação, também a temperatura e o tempo de extração podem influenciar na quantidade de flavonoides. De facto se compararmos os resultados obtidos (41,2 mg/g) com os de Moreira *et al.* verificamos que os resultados foram relativamente superiores o que tem a ver com a temperatura de extração usada. Os flavonoides da amostra foram extraídos com água, solvente este utilizado também para o trabalho em questão.

Comparativamente com a pesquisa feita por Murthy *et al.* (2012), a partir do grão do café proveniente da Índia, cujas condições experimentais já foram referidas anteriormente, o resultado para as antocianinas mostra ser ligeiramente inferior (0,24 mg/g) ao obtido no presente trabalho (0,465 mg/g). Segundo o estudo de Arancibia-Avila *et al.* (2008), a quantidade de antocianinas é mais elevada nos frutos maduros quando comparada com os imaturos ou em senescência. Esta afirmação pode significar que o café presente neste trabalho é relativamente mais maduro que o empregue no estudo de Murthy *et al.* (2012).

Os valores obtidos na quantificação de carotenoides apresentam-se na tabela seguinte (Tabela III).

Tabela III. Resultados obtidos na quantificação de carotenoides (clorofila a, clorofila b, β -caroteno e licopeno) na amostra de café verde.

Amostra	Carotenoides (mg/ g)			
	Clorofila a	Clorofila b	β -caroteno	Licopeno
Café verde	$1,5 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-4} \pm 4 \times 10^{-5}$	—	$6 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-4}$

Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Para termo de comparação com os resultados obtidos para os carotenoides, irá recorrer-se aos valores referidos por Simkin *et al.* (2010). Estes estudaram grãos de café verde de

duas espécies do genero *Coffea*, a *arabica* e a *robusta*, mencionando-se os valores da quantificação de β -caroteno, clorofila a e clorofila b para ambas as espécies.

No âmbito dos resultados conseguidos neste trabalho, pode-se verificar que o β -caroteno aparenta não estar presente na amostra, o que poderá ser explicado pelo uso de um método diferente do aplicado em Simkin *et al.* (2010), cujos resultados para este carotenoide foram de $0,1 \times 10^{-3}$ mg/g para a *Coffea arabica* e $0,2 \times 10^{-3}$ mg/g para a *Coffea robusta*. Quanto à clorofila a, os resultados obtidos $12,7 \times 10^{-3}$ mg/g e $6,7 \times 10^{-3}$ mg/g, respetivamente para a *arabica* e *robusta*, são notoriamente mais elevados do que o valor por nós obtido ($1,5 \times 10^{-4}$ mg/g). O mesmo acontece para a clorofila b, cujo os valores apresentados $8,1 \times 10^{-3}$ mg/g e $5,2 \times 10^{-3}$ mg/g, respetivamente para a *arabica* e *robusta*, são igualmente superiores ao valor por nós obtido ($1,6 \times 10^{-4}$ mg/g). É de notar que no estudo de Simkin *et al.* (2010), os resultados para a clorofila a e b foram evidentemente mais elevados e que o β -caroteno foi quantificado, o que não aconteceu no presente trabalho. Mediante estes factos, pode-se afirmar que as razões para tais divergências de valores sejam as seguintes: a origem dos cafés usados no estudo de Simkin *et al.* (2010) (França e Equador) e o solvente extrator usado neste estudo de 2010 ser uma mistura de acetoneitrilo/metanol (85%) e água (15%). Não obstante as razões mencionadas anteriormente e com base nas evidências comprovadas no estudo realizado por Vizzotto e Pereira (2011), a clara divergência de resultados poderá se dever maioritariamente, ao uso do solvente extrator metanol. De acordo com Vizzotto e Pereira (2011), o metanol foi considerado um solvente eficaz na extracção de compostos bioativos, sendo a água, solvente utilizado por nós neste trabalho, indicado como um solvente extrator não tão eficiente como o metanol.

No que diz respeito à quantificação do licopeno nos grãos de café verde, não foram encontrados valores para serem utilizados como termo de comparação com o resultado obtido neste trabalho, nas referências bibliográficas consultadas.

CAPÍTULO VI. CONCLUSÃO

Com base na pesquisa bibliográfica realizada para a elaboração do presente trabalho, conclui-se que, de um modo geral, os compostos bioativos como os fenólicos, os flavonoides, as antocianinas e os carotenoides, presentes no café, são de grande importância fisiológica, e contribuem para as características organolépticas deste fruto. Os compostos bioativos presentes no café apresentam uma potencial atividade antioxidante, estando esta fortemente associada à prevenção de diversos tipos de doenças degenerativas.

O processo de torrefação, a temperatura e o tempo de extração alteram a quantidade de compostos bioativos presentes no café (Abrahão *et al.*, 2008). Segundo Vignoli *et al.* (2014), os compostos fenólicos são parcialmente degradados quando a torrefação dos grãos de café verde, ao contrário de outros compostos antioxidantes, como as melanoidinas, que são formados durante este processo.

Na apreciação dos resultados obtidos pode-se concluir que a amostra de café verde empregue neste estudo contém compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e carotenoides, sendo estes últimos clorofila a, clorofila b e licopeno. A comparação dos resultados experimentais obtidos com outros estudos previamente realizados revela que fatores como a origem geográfica da planta do café, o método de determinação da capacidade antioxidante, o solvente extrator ou a fase de desenvolvimento do grão podem influenciar os resultados e assim justificar a discrepância de valores que possa existir. O teor de humidade determinado para a amostra de café verde indica que este é um produto muito seco.

O estudo destes compostos bioativos no café verde deverá, sem dúvida, ser intensificado com a finalidade de permitir uma melhor avaliação dos seus efeitos e, consequentemente, uma melhor compreensão e certeza na recomendação deste produto para uma dieta mais saudável e equilibrada.

CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFIA

Abrahão, S. A., *et al.* (2008). Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(12), pp. 1799-1804.

Abrahão, S. A., *et al.* (2010). Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). *Ciência Agrotecnologia*, 34(2), pp. 410-420.

Alves, R. C., *et al.* (2010). Antiradical activity, phenolics profile and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: influence of technological factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp. 12221-12229.

Amorim, H. V., *et al.* (1973). Métodos de análise orgânica do café. I. Comparação entre métodos de determinação do ácido clorogênico. Tese. Brasil, Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Andueza, S., *et al.* (2007). Influence of coffee/water ratio on the final quality of espresso coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, pp. 586-592.

Arancibia-Avila, P., *et al.* (2008). Antioxidant properties of durian fruit as influenced by ripening. *LWT – Food Science and Technology*, 41, pp. 2118-2125.

Bagyaraj, D. J., *et al.* (2015). Below ground microbial diversity as influenced by coffee agroforestry systems in the Western Ghats, India. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 202, pp. 198-202.

Belguidoum, K., *et al.* (2014). HPLC coupled to UV-vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45, pp. 1314-1320.

Bertone, E., *et al.* (2016). Simultaneous determination by NIR spectroscopy on the roasting degree and arabica/robusta ratio in roasted and ground coffee. *Food Control*, 59, pp. 683-689.

Bonita, J. S., *et al.* (2007). Coffee and cardiovascular disease: *in vitro*, cellular, animal, and human studies. *Pharmacological Research*, 55(3), pp. 187-198.

Budryn, G., *et al.* (2013). Influence of addition of green tea and green coffee extracts on the properties of fine yeast pastry fried products. *Food Research International*, 50, pp. 149-160.

Bresciani, L., *et al.* (2014). Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. *Food Research International*, 61, pp. 196-201.

Cheong, M. W., *et al.* (2012). Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. *Food Research International*, 51(1), pp. 388-396.

Cieslik, E., Greda, A. e Adamus, W. (2006). Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chemistry*, 94, pp. 135-142.

Costa, A. S. G. (2012). Pele de prata do café: desenvolvimento de um método sustentável de extração de compostos bioativos. Dissertação. Porto, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Costa, A. S. G., *et al.* (2014) Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. *Industrial Crops and Products*, 53, pp. 350-357.

Cruz, A. P. G. (2008). Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante. Dissertação. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Czamanski, R. T. (2013). Prospecção de atividade antibacteriana em resíduos da viticultura na perspectiva da desinfecção e antissepsia aplicadas à saúde e à produção animal, bem como à agroindústria familiar. Tese. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Daglia, M., *et al.* (2000). *In vitro* antioxidant and *ex vivo* protective activities of green and roasted coffee. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48(5), pp. 1449-1454.

Dziki, D., *et al.* (2015). Ground green coffee beans as a functional food supplement. *LWT - Food Science and Technology*, 63, pp. 691-699.

Farah, A. e Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), pp. 23-26.

Farah, A., *et al.* (2008). Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *Journal Nutrition*, 138, pp. 2309-2315.

Farhoosh, R., *et al.* (2016). Structure-antioxidant activity relationships of *o*-hydroxyl, *o*-methoxy, and alkyl ester derivatives of *p*-hydroxybenzoic acid. *Food Chemistry*, 194, pp. 128-134.

Farinhoto, R. J. C. R. (2012). Análise física e química de cafés verdes com diferentes origens geográficas. Dissertação. Lisboa, Universidade Nova de Lisboa.

Fernandes, J. M. P. L. (2013). Estudo de desenvolvimento de um sistema de embalagem ativa para queijo marinhas. Tese. Porto, Universidade Católica Portuguesa.

Firmino, L. A. (2011). Avaliação da qualidade de diferentes marcas de chá verde (*camellia sinensis*) comercializadas em salvador-bahia. Dissertação. Bahia, Universidade Federal da Bahia.

Fucape Business School, (2011). A influência do teor de umidade do café arábica na rentabilidade do produtor rural de Iúna-es. [Em linha]. Disponível em <http://www.fucape.br/premio_excelencia_academica/upld/trab/11/54.pdf>. [Consultado em 18/09/2015].

Garambone, E. e Rosa, G. (2007). Possíveis benefícios do ácido clorogénico à saúde. *Alimentos e Nutrição*, 48(2), pp. 229-235.

Gawlik-Dziki, U., *et al.* (2014). Lipoxygenase inhibitors and antioxidants from green coffee-mechanism of action in the light of potential bioaccessibility. *Food Research International*, 61, pp. 48-55.

- Hamid, A. A., *et al.* (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(8), pp.142-151.
- Havaux, M. (2013). Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *The plant journal*, 79, pp. 597-606.
- Kraljic, K., *et al.* (2015). Changes in 4-vinylsyringol and other phenolics during rapeseed oil refining. *Food Chemistry*, 187, pp. 236-242.
- Lapointe, A., Couillard, C. e Lemieux, S. (2006). Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(10), pp. 645-658.
- Lee, L. W., Cheong, M. W. e Curran, P. (2015). Coffee fermentation and flavor – an intricate and delicate relationship. *Food Chemistry*, 185, pp. 182-191.
- Li, W. e Beta, T. (2012). An evaluation of carotenoid levels and composition of glabrous canaryseed. *Food Chemistry*, 133, pp.782-786.
- Lilamand, M., *et al.* (2014). Flavonoids and arterial stiffness: promising perspectives. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 24, pp. 698-704.
- Lima, A. R., *et al.* (2010). Compostos bioativos do café: atividade antioxidante *in vitro* do café verde e torrado antes e após a descafeinação. *Química Nova*, 33(1), pp. 20-24.
- Loureiro, A. P. M., Mascio, P. e Medeiros, M. H. G. (2002). Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagénese e carcinogénese. *Química Nova*, 25, p. 777.
- Marova, I., *et al.* (2012). Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environment Management*, 95, pp. S338-S342.
- Martín-Sánchez, A. M., *et al.* (2014). Phytochemicals in date co-products and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 158, pp. 513-520.

Milene, A. P. e Neuza, J. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66(1), pp. 1-9.

Monakhova, Y. B., *et al.* (2015). Rapid approach to identify the presence of arabica and robusta species in coffee using HNMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 182, pp. 178-184.

Moreira, M. (2013). Avaliação de potencial farmacológico de café (*Coffea arabica* L.) verde e torrado. Tese. Lavras, Universidade Federal de Lavras.

Moreira, M. E. C., *et al.* (2013). Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of roasted and green *Coffea arabica* L. *Journal of Functional Food*, 5(1), pp. 466-474.

Murthy, P. S., *et al.* (2012). Extraction, characterization and bioactivity of coffee anthocyanins. *European Journal of Biological Sciences*, 4(1), pp. 13-19.

Narita e Inouye. (2011). Inhibitory effects of chlorogenic acids from green coffee beans and cinnamate derivatives on the activity of porcine pancreas α -amylase isozyme I. *Food Chemistry*, 127(4), pp. 1532-1539.

Niseteo, T., *et al.* (2012). Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chemistry*, 134, pp. 1870-1877.

Oliveira, M., *et al.* (2015). Espresso beverages of pure origin coffee: mineral characterization, contribution for mineral intake and geographical discrimination. *Food Chemistry*, 177, pp. 330-338.

Oliveira, R. J. C. (2014). Estudo comparativo do potencial anti-inflamatório e antioxidante da cianidina-3-glucósido e do ácido protocatecuico em células intestinais. Dissertação. Coimbra, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Oliveira-Neto, J. R., *et al.* (2016). Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples. *Food Chemistry*, 190, pp. 506-512.

Panusa, A., *et al.* (2013). Recovery of natural antioxidants from spent coffee grounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, pp. 4162-4168.

Pellegrini, N., *et al.* (2003). The total antioxidant capacity of plant food beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *Journal of Nutrition*, 33, pp. 2812-2819.

Ramalakshmi, K., *et al.* (2009). Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different *in vitro* model systems. *Food Chemistry*, 115, pp. 79-85.

Richelle, M., Tavazzi, I. e Offord, E. (2001) Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, pp. 343-3442.

Rodriguez-Amaya, D. B., *et al.* (2008). Updated Brazilian database on food carotenoids: factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(6), pp. 445-463.

Sadowska-Bartosz, I., Adamczyk, R. e Bartosz, G. (2014). Protection against peroxynitrite reactions by flavonoids. *Food Chemistry*, 164, pp. 228-233.

Santos, M. H. S., *et al.* (2007). Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). *Química Nova*, 30(3), pp. 20-24.

Scalbert, A., Johnson, I. T. e Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87, pp. 215S-217S.

Shimoda, H., Seki, E. e Aitani, M. (2006). Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, pp. 6-9.

Silva, M. L. C., *et al.* (2010). Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3), pp. 669-682.

Simkin, A. J., *et al.* (2010). Carotenoid profiling and the expression of carotenoid biosynthetic genes in developing coffee grain. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, pp. 434-442.

Stelmach, E., Pohl, P. e Szymczycha-Madeja, A. (2015). The content of Ca, Cu, Fe, Mg and Mn and antioxidant activity of green coffee brews. *Food Chemistry*, 182, pp. 302-308.

Sui, X., Dong, X. e Zhou, W. (2014). Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. *Food Chemistry*, 163, pp. 163-170.

Sulaiman, S. F., Moon, J. e Shibamoto, T. (2011). Investigation of optimum roasting conditions to obtain possible health benefit supplement, antioxidants from coffee beans. *Journal of Dietary Supplements*, 8(3), pp. 293-310.

Urias-Lugo, D.A., *et al.* (2015). Anthocyanins and phenolic acids of hybrid and native blue maize (*Zea mays* L.) extracts and their antiproliferative activity in mammary (MCF7), liver (HepG2), colon (Caco2 and HT29) and prostate (PC3) cancer cells. *Plants Foods for Human Nutrition*, 70, pp. 193-199.

Vignoli, J. A., *et al.* (2014). Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. *Food Research International*, 61, pp. 279-285.

Vinha, A. F. (2005). Importância dos compostos fenólicos como agentes antioxidantes. Provas de Estudos Avançados (DEA). Espanha, Faculdade de Ciências da Universidade de Vigo.

Vizzotto, M. e Pereira, M. C. (2011). Amora-preta (*rubus* sp.): otimização do processo de extracção para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(4), pp. 1209-1214.

Wang, X. e Lim, L. T. (2014). Effect of roasting conditions on carbon dioxide degassing behavior in coffee. *Food Research International*, 61, pp. 144-151.

Wang, Y. e Ho, C. (2009). Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, pp. 8109-8114.

Willcox, J. K., Ash, S. L. e Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), pp. 275-295.

Wondracek, D. C., Faleiro, F. G. e Sano, S. M. (2011). Composição de carotenoides em passifloras do cerrado. *Revista Brasileiro de Fruticultura*, 33(4), pp. 1222-1228.

Yin, D., *et al.* (2015). Assessment of flavonoids and volatile compounds in tea infusions of water lily flowers and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 185, pp. 20-28.

Zheng, W. e Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, pp. 5165-5170.

Zuorro, A. e Lavecchia, R. (2012). Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*, 34, pp. 49-56.