

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Miguel Gontijo Siqueira Palmieri

Atividade antioxidante de extratos de café verde biotransformado pelo fungo
Aspergillus oryzae

Juiz de Fora
2017

Miguel Gontijo Siqueira Palmieri

**Atividade antioxidante de extratos de café verde biotransformado pelo fungo
*Aspergillus oryzae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria da Penha Henriques do Amaral
Coorientador: Prof.^a Dr.^a Fernanda Maria Pinto Vilela
Prof.^a Dr.^a Mirian Pereira Rodarte

**Juiz de Fora
2017**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Palmieri, Miguel Gontijo Siqueira.

Atividade antioxidante de extratos de café verde biotransformado pelo fungo *Aspergillus oryzae* / Miguel Gontijo Siqueira Palmieri. -- 2017.

69 p. : il.

Orientadora: Maria da Penha Henriques do Amaral

Coorientadoras: Fernanda Maria Pinto Vilela, Mirian Pereira Rodarte

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. *Coffea arabica* L.. 2. fermentação em estado sólido. 3. *Aspergillus oryzae*. 4. antioxidante. 5. ácido clorogênico. I. Amaral, Maria da Penha Henriques do , orient. II. Vilela, Fernanda Maria Pinto , coorient. III. Rodarte, Mirian Pereira , coorient. IV. Título.

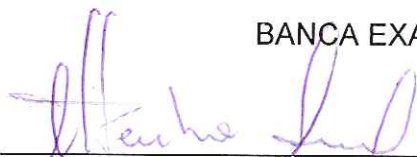
Miguel Gontijo Siqueira Palmieri

Atividade antioxidante de extratos de café verde biotransformado pelo fungo
Aspergillus oryzae

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos

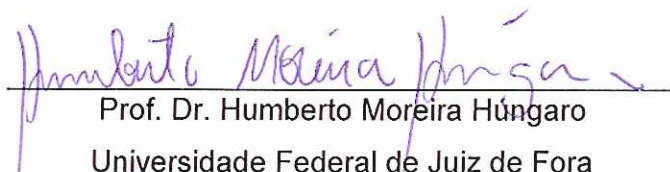
Aprovada em 03 de fevereiro de 2017

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Maria da Penha Henriques do Amaral - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Universidade de São Paulo

Dedico este trabalho a minha família que sempre me apoiou e a minha esposa Larissa que me incentivou a ingressar no programa e perseverar até o fim.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria da Penha Henriques do Amaral por ter possibilitado mais essa conquista.

Agradeço as coorientadoras deste trabalho, Profa. Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela e Profa. Dra. Mirian Pereira Rodarte pelos valiosos ensinamentos durante a execução deste projeto.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial ao amigo Lucas Taffarel Cruz que esteve comigo no laboratório durante todo o período dos experimentos me ajudando sempre.

A todos os professores da Faculdade de Farmácia que de alguma forma me permitiram vencer mais esta jornada. Agradeço especialmente a técnica Carolina Miranda Gasparetto e a CentralBio da Faculdade de Farmácia – UFJF, pela orientação na execução das análises cromatográficas e ao técnico Jêsus de Paula Sarmiento pela ajuda na moagem do café.

Ao Prof. Dr. Luís Roberto Batista do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras por ter cedido o fungo para a realização deste estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro concedido.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*Educação nunca foi despesa.
Sempre foi investimento com retorno garantido
(Sir Arthur Lewis)*

RESUMO

O café verde é conhecido principalmente por suas propriedades antioxidantes e antibacterianas. Compostos fenólicos como os ácidos clorogênicos, que são formados através de ácidos hidroxicinâmicos (ácidos cafeico, ferúlico e outros) ligados ao ácido quínico, estão presentes em grandes quantidades e têm sido reconhecidos como antioxidantes naturais. Entretanto, os ácidos hidroxicinâmicos são encontrados principalmente na forma esterificada com ácidos orgânicos, açúcares, lipídeos e covalentemente ligados a parede celular, o que reduz sua biodisponibilidade. Diante disso, o objetivo deste estudo foi realizar a biotransformação da farinha de café verde utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* (CCDCA102604) visando o aumento da atividade antioxidante. A farinha de café verde foi fermentada em estado sólido usando o fungo *Aspergillus oryzae* a 25 °C por 24, 48 e 72 horas. Após a fermentação os compostos fenólicos foram extraídos utilizando uma solução hidroetanólica. A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelos métodos DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e poder redutor e a determinação dos teores de fenólicos totais foi realizada utilizando o método de Folin-ciocateu. Foi realizada também a quantificação de ácido clorogênico (5-ACQ), ácido cafeico e cafeína nos extratos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência. De acordo com os resultados ocorreu um aumento significativo de 115,7% e 66,4% da atividade antioxidante dos extratos de farinha de café verde fermentados por 24 horas em relação ao extrato de café não fermentado, determinada pelos métodos DPPH• e poder redutor, respectivamente. Além disso, o processo de fermentação pelo fungo *A. oryzae* durante 24 horas também promoveu um aumento de 68,6% na concentração de compostos fenólicos em relação aos extratos não fermentados. Os extratos fermentados por 24 horas apresentaram um aumento significativo nos teores de ácido clorogênico e ácido cafeico quando comparados aos extratos não biotransformados. O aumento da atividade antioxidante não foi observado nos extratos fermentados por 48 e 72 horas. Os resultados deste estudo demonstraram que o processo de biotransformação é uma estratégia para a obtenção de um extrato enriquecido de compostos antioxidantes em suas formas livres com potencial aplicação nas indústrias alimentícias, de suplementos alimentares e cosmética.

Palavras chave: *Coffea arabica* L., fermentação em estado sólido, *Aspergillus oryzae*, antioxidante, ácido clorogênico, ácido cafeico

ABSTRACT

Green coffee is known mainly for its antioxidant and antibacterial properties. Phenolic compounds such as chlorogenic acids, which are formed through hydroxycinnamic acids (caffeic, ferulic and other acids) linked to quinic acid, are present in large quantities in green coffee and have been recognized as natural antioxidants. However, hydroxycinnamic acids are found mainly in the esterified form with organic acids, sugars, lipids and are covalently bound to the cell wall, which reduces their bioavailability. Therefore, the objective of this study was to perform the biotransformation of the green coffee flour using the *Aspergillus oryzae* fungus aimed at increasing the antioxidant activity. The green coffee flour was fermented in solid state using the fungus *Aspergillus oryzae* (CCDCA102604) at 25 °C for 24, 48 and 72 hours and after fermentation the phenolic compounds were extracted using a hydroethanolic solution. The antioxidant activity of the extracts was evaluated by the DPPH• and reducing power methods, and the determination of total phenolic contents was performed using Folin-ciocateu method. Quantification of chlorogenic acid (5-ACQ), caffeic acid and caffeine in the extracts was also performed using high performance liquid chromatography. The results showed a significant increase of 115.7% and 66.4% of the antioxidant activity of the green coffee flour extracts fermented for 24 hours in relation to the unfermented coffee extract, measured by the DPPH• and reducing power methods, respectively. In addition, the fermentation process by the *A. oryzae* fungus for 24 hours also promoted a 68.6% increase in the content of phenolic compounds in relation to the unfermented extracts. The extracts fermented for 24 hours showed an increase in the content of chlorogenic acid and caffeic acid when compared to the non-biotransformed extracts. The increase in antioxidant activity was not observed in the extracts fermented for 48 and 72 hours. The results of this study showed the biotransformation process as a strategy to obtain an enriched extract of antioxidant compounds in their free forms with potential application in the food, supplementation and cosmetic industries.

Key words: *Coffea arabica* L., solid state fermentation, *Aspergillus oryzae*, antioxidant, chlorogenic acid, caffeic acid

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	A árvore do café da espécie <i>Coffea arabica</i>	17
Figura 2 -	Ácidos clorogênicos e compostos relacionados quimicamente ..	21
Figura 3 -	Rota biossintética dos ácidos clorogênicos	22
Figura 4 -	<i>Aspergillus oryzae</i> visto por microscopia eletrônica	33
Figura 5 -	Mecanismo de reação do DPPH• com uma molécula antioxidante	38
Figura 6 -	Atividade antioxidante dos extratos de farinha de café verde não fermentada e fermentada durante 24, 48 e 72 horas determinada pelo método DPPH•	44
Figura 7 -	Atividade antioxidante dos extratos de farinha de café verde não fermentada e fermentada durante 24, 48 e 72 horas determinada pelo método do poder redutor	45
Figura 8 -	Teores de fenólicos totais nos os extratos de farinha de café verde não fermentada e fermentada durante 24, 48 e 72 horas determinados pelo método de Folin–Ciocalteu	47
Figura 9 -	Cromatogramas das soluções padrões de ácido clorogênico (5-ACQ), cafeína (CAF) e ácido cafeico (AC) obtidos nos comprimentos de onda de 272 nm (superior) e 330 nm (inferior)	49
Figura 10 -	Cromatogramas do extrato de café verde não fermentado obtidos nos comprimentos de onda de 272 nm (superior) e 330 nm (inferior)	50
Figura 11 -	Cromatogramas do extrato de café verde fermentado por 24 horas obtidos nos comprimentos de onda de 272 nm (superior) e 330 nm (inferior)	51
Figura 12 -	Cromatogramas de extrato de café verde fermentado por 48 horas obtidos nos comprimentos de onda de 272 nm (superior) e 330 nm (inferior)	52
Figura 13 -	Cromatogramas de extrato de café verde fermentado por 72 horas obtidos nos comprimentos de onda de 272 nm (superior) e 330 nm (inferior)	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Equações das retas e coeficientes de correlação linear (r) obtidos a partir da injeção das soluções padrões de ácido clorogênico (5-ACQ), ácido cafeico e cafeína.....	48
Tabela 2 - Concentrações de ácido clorogênico (5-ACQ), cafeína e ácido cafeico nos extratos não fermentados e fermentados por 24, 48 e 72 horas.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Ácido azinobis (etilbenzenotiazolinasulfônico)
ACQ	Ácido cafeoilquínico
AFQ	Ácido feruloilquínico
ApCoQ	Ácido para cumaroilquínico
A.a	Atividade de água
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CGA	Ácido clorogênicos
DiCQA	Ácido dicafeoilquínico
DPPH	Difenilpicrilhidazila
EC ₅₀	Concentração eficiente
FES	Fermentação em estado sólido
FS	Fermentação submersa
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
OIC	Organização Internacional do Café
ORAC	Capacidade de absorção dos radicais oxigenados
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.2	CAFÉ VERDE.....	19
1.3	PROPRIEDADES BIOATIVAS DO CAFÉ.....	24
1.4	BIOTRANSFORMAÇÃO.....	27
1.5	O fungo <i>Aspergillus oryzae</i>	32
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVO GERAL.....	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	CAFÉ VERDE.....	36
3.2	MANUTENÇÃO DO FUNGO E PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS.....	36
3.3	BIOTRANSFORMAÇÃO DO CAFÉ VERDE POR <i>A. oryzae</i> EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	36
3.4	EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	37
3.5	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS.....	37
3.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS.....	37
3.6.1	Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH	37
3.6.2	Determinação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor	39
3.6.3	Determinação do teor de fenólicos totais	40
3.7	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ÁCIDO CAFEICO E CAFEÍNA POR CLAE UV-DAD.....	40
3.7.1	Padrões e solventes	40
3.7.2	Condições cromatográficas	41
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4	RESULTADOS	43
4.1	EFEITOS DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS.....	43

4.1.1	Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH•.....	43
4.1.2	Determinação da atividade antioxidante pelo método do poder reduztor.....	44
4.1.3	Determinação do teor de fenólicos totais.....	46
4.2	DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ÁCIDO CAFEICO E CAFEÍNA POR CLAE UV-DAD.....	47
5	DISCUSSÃO.....	56
6	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos produtos mais consumidos no mundo principalmente devido às propriedades psicoativas (AMAMO, 2014; GOMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007). É a segunda maior *commodity* mundial em valor de mercado, atrás somente do petróleo, sendo de grande importância econômica para o Brasil (ABIC (a), 2015; EMBRAPA, 2015).

O café possui diversas atividades biológicas e seus diferentes constituintes têm sido sugeridos como potencialmente quimioprotetores em diferentes sistemas químicos e biológicos. O consumo do café está associado a vários benefícios para o organismo tais como redução do risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2, atividade antioxidante frente a radicais livres, além de inibição da peroxidação lipídica. A bebida do café possui compostos com atividade antibacteriana frente a estirpes de *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Porém, a propriedade mais conhecida é como estimulante, devido principalmente a cafeína, responsável por aumentar o estado de alerta por meio da estimulação do sistema nervoso central, aumentando a circulação sanguínea e a respiração. Outros possíveis benefícios do café incluem a melhora do humor, melhora da performance na prática de exercícios e redução dos sintomas associados a doença de Parkinson (CHU, Y. et al., 2011; DAGLIA et al., 1998; ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; LIMA et al., 2010; RAMALAKSHMI et al., 2009).

O café verde possui uma concentração significativa de compostos fenólicos. Esses compostos fenólicos podem ser divididos em três grupos: os poucos distribuídos na natureza, os polímeros e os largamente distribuídos na natureza. No grupo dos pouco distribuídos na natureza encontram-se os fenóis simples, a hidroquinona, o pirocatecol e o resorcinol. O grupo dos polímeros é composto pelas ligninas e taninos. Finalmente, no grupo dos compostos fenólicos largamente distribuídos, encontram-se os flavonoides, as cumarinas e os ácidos fenólicos. Dentro do subgrupo dos ácidos fenólicos, estão presentes o ácido benzóico, o ácido cinâmico e seus derivados, subgrupo do qual os ácidos clorogênicos fazem parte e que são os principais compostos responsáveis pela atividade antioxidante do café verde (ANGELO; JORGE, 2007).

Os flavonoides e também a maior parte dos compostos fenólicos são encontrados nas plantas predominantemente em sua forma glicosilada, conjugados com diferentes tipos de carboidratos como a glicose, galactose, ramnose, xilose e

arabinose, e não como agliconas. De forma similar, ácidos hidroxicinâmicos são encontrados nos alimentos na forma conjugada, esterificado ao ácido quínico, ácido tartárico ou ligados a carboidratos e derivados. Esses fitoconstituintes (fenólicos, glicosídeos e flavonoides) ligados a polissacarídeos, possuem atividade antioxidante reduzida, são predominantemente hidrofílicos e possuem alto peso molecular, fatores limitantes da biodisponibilidade desses compostos, uma vez que não são capazes de serem absorvidos nas vilosidades intestinais quando ingeridos ou de atravessar a barreira lipídica do estrato córneo quando aplicados na pele. As formas não glicosiladas dos flavonoides e fenólicos possuem maior atividade antioxidante que as formas glicosiladas uma vez que a disponibilidade de grupos hidroxilas livres é potencialmente importante para a estabilização da ressonância de radicais livres (FERREIRA et al., 2013; OLIVEIRA; BASTOS, 2011; MANACH et al., 2004; MILLER; RUIZ-LARREA, 2002; TORRES-MANCERA et al., 2013).

Diante do exposto, verifica-se a possibilidade de obtenção de extratos de café verde com maior atividade antioxidante e maior biodisponibilidade a partir da biotransformação utilizando microrganismos produtores de enzimas. Sendo assim, pretende-se com este estudo realizar a biotransformação da farinha de café verde utilizando-se o fungo filamentosso *Aspergillus oryzae*.

O objetivo da biotransformação foi obter um extrato biotransformado com maior atividade antioxidante que contenha os polifenóis na forma livre, mais lipofílicos e com menor massa molecular. Diante disso espera-se uma maior absorção desses compostos nas vilosidades intestinais e penetração dos mesmos na epiderme quando aplicados topicamente, aumentando assim a biodisponibilidade e potencializando desta forma a atividade antioxidante no organismo.

1.1 REVISÃO DA LITERATURA

O café foi descoberto entre os séculos IX e X na província de Keffa na Etiópia por pastores de cabras que perceberam o efeito estimulante nos animais que ingeriam o fruto. Desde então, o café tornou-se um dos produtos mais consumidos no mundo na forma de bebida, principalmente devido às propriedades psicoativas (AMAMO, 2014; GOMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007). Porém, foram os árabes os responsáveis por difundir o café pelo mundo. O café começou a ser consumido pelos Europeus por volta de 1615, e mais tarde o café foi levado para ser cultivado em suas respectivas colônias na África e na América (MUSSATTO et al., 2011).

Segundo informações da Embrapa e da Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC), o café é a segunda maior *commodity* mundial em valor de mercado, atrás somente do petróleo, sendo o Brasil o maior exportador e produtor de café do mundo, seguido pelo Vietnã, Colômbia e Indonésia. De acordo com dados fornecidos pela Organização Internacional do Café (OIC), o Brasil exportou 33,17 milhões de sacas no período de outubro de 2014 a setembro de 2015, o que corresponde a aproximadamente 30% das exportações mundiais de café nesse mesmo período, que foram de 110,74 milhões de sacas (ABIC (a), 2015; EMBRAPA, 2015; ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; MUSSATTO et al., 2011).

O cafeeiro é uma planta pertencente à família *Rubiaceae* e ao gênero *Coffea*. Existem mais de 100 espécies de café distintas em todo o mundo e todas elas se encontram ao longo da faixa equatorial da África, Ásia e América. Entretanto, as espécies cultivadas que possuem importância econômica são a *Coffea arabica* L. e a *Coffea canephora*, comumente conhecida como Robusta ou Conilon. A espécie arábica corresponde a 75% da produção mundial de café, enquanto que a espécie *canephora* corresponde a 24%. No Brasil, a produção de café da espécie arábica é entre três a quatro vezes maior do que a produção da espécie *canephora* o que levou a ser a espécie de escolha do presente estudo (ABIC (b), 2016; KY et al., 2001; NARITA; INOUE, 2014).

A espécie arábica apresenta plantas com 2 a 7 metros de altura, bastante sensíveis, requerem clima temperado, possuem folhas adultas de coloração verde e frutos vermelhos ou amarelos quando maduros (Figura 1). As plantas da variedade robusta apresentam ótimo vigor, sendo bastante resistentes ao agente da ferrugem e a outras doenças. Podem atingir até 12 metros de altura, apresentam frutos

amarelos ou vermelhos quando maduros e desenvolvem-se bem em climas quentes e úmidos (AGUIAR, 2005; BISHT; SISODIA, 2010).

Figura 1 - A árvore do café da espécie *Coffea arabica* L.



Fonte: O AUTOR, 2015.

A espécie *Coffea arabica* L. é considerada superior devido as suas propriedades sensoriais, principalmente por apresentar menor amargor e melhor aroma e por esse motivo possui preços mais elevados no mercado, chegando a custar aproximadamente o dobro do valor da *Coffea canephora*. A qualidade superior de um determinado tipo de café está envolvida com altos níveis de

sacarose e a baixos níveis de ácido gama amino butírico, ácido quínico, colina, ácido acético e ácidos graxos (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; KWON et al., 2015).

O fruto do café possui um formato oval e mede aproximadamente 100 milímetros de comprimento. Na parte mais interna encontram-se dois grãos de café verde coberto pela película prateada (*silverskin*), recoberta por um endocarpo chamado pergaminho e por uma camada adesiva péctica. A camada péctica é envolta pela polpa e por último pela camada mais externa, a pele (epicarpo). O café verde possui composição centesimal de aproximadamente 14,9% de proteínas, 5,9% de óleos, 18,13% de fibras brutas, 9,19% de umidade, 3,83% de cinzas e 68,47% de carboidratos (LAGO; ANTONIASSI; FREITAS, 2001; MUSSATTO et al., 2011; NARITA; INOUE, 2014).

Após a colheita dos frutos, o café deve ser despulpado a fim de se obter o grão de café verde. O despulpamento pode ser realizado pelos métodos seco, úmido ou semi-seco. Os diferentes métodos de processamento, assim como a origem geográfica e a espécie do grão, irão influenciar a população de microrganismos presentes nos grãos de café. No método úmido é possível identificar a presença de bactérias ácido-lácticas. No método seco, o fruto inteiro é seco ao sol ou por secadores mecânicos, seguido por remoção mecânica das partes secas. O produto final resultante do método seco é um café "natural" (DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010; HAMDUCHE et al., 2016).

O método úmido requer equipamentos específicos e quantidades substanciais de água. Neste método a polpa é eliminada por um removedor de polpa, seguido por remoção da mucilagem. Isto é realizado por produtos químicos ou por fermentação natural por períodos de tempos variáveis, que por sua vez dependerá das condições climáticas e do estágio de maturação do fruto. A fermentação fará com que os níveis de açúcares totais diminuam, pois os açúcares presentes nos frutos são substratos para os microrganismos que farão a fermentação. Terminada a fermentação, as sementes são lavadas e submetidas ao processo de secagem. O produto final é um café "lavado" (DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010; SANTOS; CHALFOUN; JOS, 2009).

O método semi-seco é o intermediário entre o método seco e o úmido, que começou a ser usado no Brasil em 1990. A polpa é removida e as sementes são colocadas para secagem, porém com a mucilagem ainda presa ao grão. Não há etapa de fermentação. O café processado através do processo úmido possui maior

qualidade, é menos encorpado, mais ácido e tem mais aroma (DUARTE; PEREIRA; FARAH, 2010).

O “método seco” é mais simples e geralmente é usado para processar os grãos da espécie *canephora*, enquanto que o “método úmido” é mais utilizado para processar os grãos da espécie arábica (VINCENT, 1987).

1.2 CAFÉ VERDE

O café é comercializado internacionalmente na forma de grãos verdes. O café verde é composto pelos grãos e dependendo do processo de produção, pela “película prateada” (*silverskin*) (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

Os grãos verdes possuem uma concentração significativa de compostos fenólicos, que são metabólitos secundários de plantas superiores geralmente envolvidos na defesa contra a radiação ultravioleta e agressão de patógenos. Os fenólicos constituem um grupo muito numeroso de substâncias, possuindo cerca de cinco mil compostos. As plantas que produzem compostos fenólicos sintetizam essas substâncias a partir da L-tirosina ou da L-fenilalanina através da via do ácido chiquímico (ANGELO; JORGE, 2007; MILLER; RUIZ-LARREA, 2002).

Os compostos fenólicos ou polifenólicos são caracterizados pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um radical hidroxila e/ou outros substitutos e podem ser divididos em três grupos: os poucos distribuídos na natureza, os polímeros e os largamente distribuídos na natureza (ANGELO; JORGE, 2007; EDREVA, 2005; MARTINS et al., 2011).

No grupo dos pouco distribuídos na natureza encontram-se os fenóis simples, a hidroquinona, o pirocatecol e o resorcinol. O grupo dos polímeros é composto pelas ligninas e taninos. Finalmente, no grupo dos compostos fenólicos largamente distribuídos, encontram-se os flavonoides, as cumarinas e os ácidos fenólicos. Dentro do subgrupo dos ácidos fenólicos, estão presentes o ácido benzóico, o ácido cinâmico e seus derivados, subgrupo do qual os ácidos clorogênicos fazem parte e que são os principais compostos responsáveis pela atividade antioxidante do café verde (ANGELO; JORGE, 2007).

Os ácidos fenólicos apresentam um grupo funcional carboxila e são divididos em ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos como o ácido cafeico, p-cumárico, ferúlico e sináptico. Os ácidos hidroxicinâmicos, na maioria das vezes,

são encontrados nos alimentos na forma esterificada ligados ao ácido quínico, ácido tartárico ou ligados a carboidratos e derivados e também na sua forma livre, porém a forma livre representa somente uma pequena parcela do total de compostos fenólicos consumidos na dieta (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

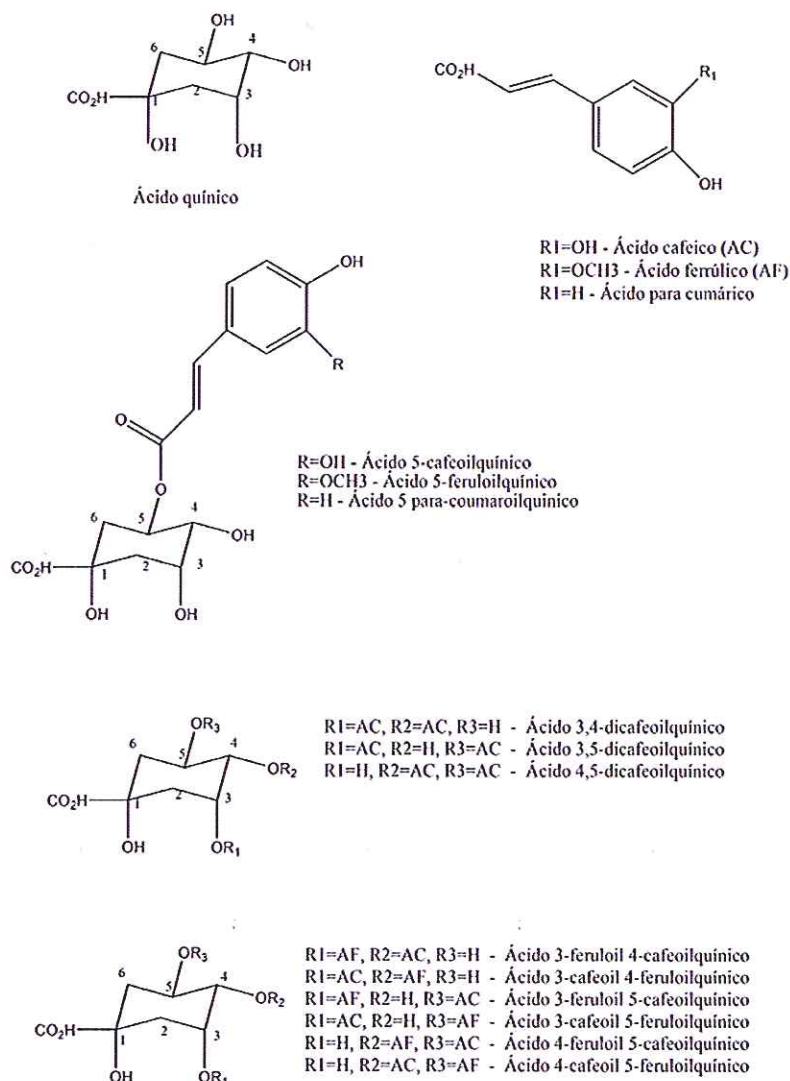
Os flavonoides são encontrados nas plantas predominantemente em sua forma glicosilada, conjugados com diferentes tipos de carboidratos como a glicose, galactose, ramnose, xilose e arabinose, e não como agliconas. As formas não glicosiladas dos flavonoides possuem maior atividade antioxidante que as formas glicosiladas (MILLER; RUIZ-LARREA, 2002).

Os taninos condensados são os principais compostos fenólicos encontrados na polpa do café. Nos grãos, os ácidos clorogênicos (CGA) vêm sendo estudados por mais de um século como sendo os principais componentes da fração fenólica dos grãos de café verde. Os ácidos clorogênicos geralmente se encontram na camada cuticular do grão de café junto com outros compostos como terpenos e derivados da 5-hidroxitriptamina (BICHO et al., 2013; MANACH et al., 2004).

Os ácidos clorogênicos são compostos fenólicos formados pela esterificação de uma molécula de ácido quínico com uma a três moléculas de derivados do ácido cinâmico, como o ácido cafeico, ferúlico e ácido p-cumárico (Figura 2) (FARAH; DONANGELO, 2006; FARAH et al., 2008). Eles possuem atividade contra doenças relacionadas com espécies reativas de oxigênio, como desordens cardiovasculares, doenças neurológicas e câncer (FORINO et al., 2015). Os ácidos clorogênicos e compostos relacionados são os principais compostos da fração fenólica dos grãos de café verde, atingindo teores de até 14% (em peso seco) (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ; JIMÉNEZ-ESCRIG; SAURA-CALIXTO, 2005).

A atividade antioxidante exercida pelos ácidos clorogênicos e seus metabólitos acontece por várias razões. Uma delas é a presença de grupos hidroxilas e a capacidade destes compostos em neutralizar a atividade de radicais peróxidos. A outra é a presença de uma ligação dupla na cadeia dos ácidos hidroxicinâmicos que estabiliza a ressonância dos radicais por deslocamento do elétron desemparelhado (ANGELO; JORGE, 2007; GOMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007).

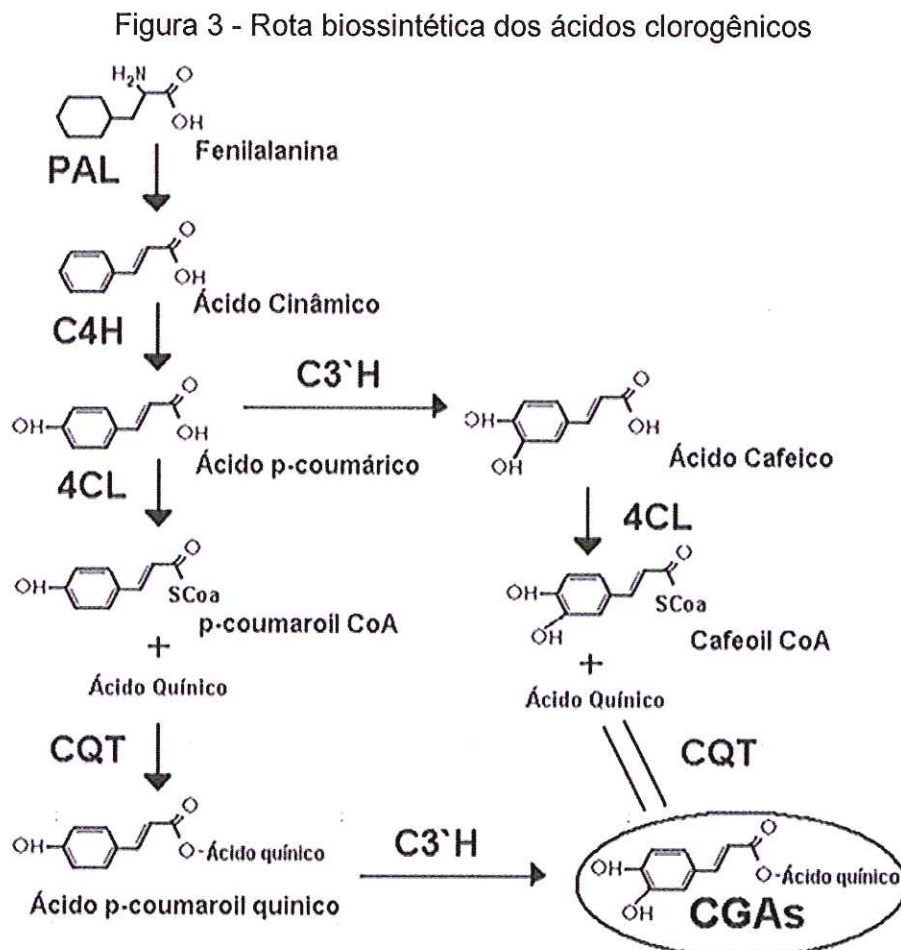
Figura 2 - Ácidos clorogênicos e compostos relacionados quimicamente



Fonte: O AUTOR – CHEM DRAW PRO 8.0, 2015.

Os ésteres do ácido quínico geralmente são formados no carbono 4 e 5, mas também podem ser formados a partir do carbono 3 e 4 e menos comumente a partir do carbono 1 (Figura 2). Os principais ácidos clorogênicos encontrados no café verde incluem: ácidos cafeoilquínicos (ACQ) com 3 isômeros (3-, 4- e 5-ACQ), ácidos dicafeoilquínicos (diCQA) com 3 isômeros (3,4-diACQ; 3,5-diACQ; 4,5-diACQ); ácidos feruloilquínicos (AFQ) com 3 isômeros (3-, 4- and 5-AFQ); ácidos *p*-cumaroilquínicos (ApCoQ), com 3 isômeros (3-, 4- and 5-ApCoQ), e ésteres dos ácidos cafeico e ferúlico com ácido quínico (FARAH; DONANGELO, 2006). A rota biosintética dos ácidos clorogênicos demonstra que os mesmos são derivados da biossíntese da fenilalanina pela via dos fenilpropanóides e do ácido quínico como é

mostrado na figura abaixo (Figura 3) (IVOMOTO et al., 2013; KOSHIRO et al., 2007).



Fonte: IVOMOTO et al., 2013.

Nota: (PAL) FENILALANINA AMONIALIASE, (C4H) CINAMATO4HIDROXILASE, (4CL) 4 COURAMATO COA LIGASE, (C3'H) 4-COURAMATO 3-HIDROXILASE, (CQT) HIDROXICINAMOIL TRANSFERASE QUINATO

Dentre os ácidos clorogênicos o componente majoritário é o ácido cafeoilquinico (5-ACQ), formado pela esterificação do ácido cafeico com o ácido quínico. O principal efeito fisiológico do 5-ACQ é a sua ação antioxidante e queladora de íons metálicos, principalmente do seu produto de hidrólise, o ácido cafeico (3,4-ácido dihidroxicinâmico) (ABRAHÃO, 2007; JIN et al., 2005; OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001).

O ácido cafeico possui atividade antioxidante superior ao butil hidroxitolueno (BHT) ou ao butil hidroxianisol (BHA). Além disso, ácido cafeico já demonstrou ser

protetor do alfa tocoferol em ensaios com lipoproteínas de baixa densidade (LDL). O ácido cafeico pode ter atividade neuroprotetora quando o estresse oxidativo é induzido em células do hipocampo pela acroleína. Em um estudo feito com células de ratos, o ácido cafeico conseguiu aumentar o número de células viáveis, diminuir o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e diminuir a depleção da glutathiona. Esses efeitos demonstram que o ácido cafeico tem potencial para ser utilizado no tratamento da doença de Alzheimer. Além disso, o ácido cafeico possui atividade anticarcinogênica contra cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele (ANGELO; JORGE, 2007; GULCIN, 2006; HUANG et al., 2013).

Durante o processo de torrefação do café, parte dos ácidos clorogênicos passam por isomerizações, parte é degradada em compostos de baixo peso molecular, parte é transformada em quinolactonas devido a desidratação e por último há formação de ligações intramoleculares. Ocorrem também reações de polimerizações dos ácidos clorogênicos com outros componentes do café para formar compostos de coloração marrom chamados de melanoidinas. Estas melanoidinas são formadas através da reação de Maillard. Apesar da degradação de compostos como os ácidos clorogênicos, os compostos formados nestas reações são responsáveis pelo aroma e o sabor característico da bebida do café (CAPORASO et al., 2014; FARAH; DONANGELO, 2006; NARITA; INOUE, 2014; TRUGO; MACRAE, 1984).

Quando o café é submetido a torrefação excessiva (procedimento comum de acordo com o padrão brasileiro para grãos da espécie arábica), com temperaturas superiores a 220 °C por 12 a 15 minutos, os ácidos clorogênicos são degradados e há redução da atividade antioxidante que pode ser medida através do método de DPPH•. Ratos suplementados com extrato aquoso de café que passou por torrefação moderada (180 °C por dez minutos), tiveram os tecidos plasmático, hepático, cerebral e cardíaco protegidos da oxidação quando avaliados através do método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (ARAUJO, 2007).

Além dos ácidos hidroxicinâmicos, os grãos de café verdes são também importantes fontes de cafeína, o alcaloide mais consumido no mundo. A cafeína pode ser encontrada nos grãos de café em concentrações que podem variar de 1-4% do peso seco. Para os humanos, a cafeína possui vários efeitos fisiológicos importantes como a estimulação do sistema nervoso, diurese e secreção gástrica. Entretanto, em altas doses pode provocar tremores, náusea, nervosismo,

convulsões e efeitos mutagênicos como a inibição do DNA (DE AZEVEDO et al., 2008; ŠVORC, 2013).

A trigonelina, outro alcaloide que também está presente no café, é encontrada em maior concentração na espécie arábica. Esta substância é precursora de compostos de aroma do café. A presença de maiores concentrações de trigonelina na espécie arábica é um indicativo desta espécie ser considerada mais nobre, tendo maior representatividade no mercado, levando em conta suas propriedades sensoriais e conseqüentemente sendo a preferida dos consumidores. Vale ressaltar que o café verde da espécie *canephora* possui em média valores mais altos de pH, sólidos solúveis, cafeína, ácidos cafeoilquínicos totais, ácidos dicafeoilquínicos totais e ácidos feruloilquínicos totais quando comparado com a espécie arábica (BICHO et al., 2013; FARAH; DONANGELO, 2006; KY et al., 2001; MAZZAFERA, 1991; MUSSATTO et al., 2011; STENNERT; MAIER, 1996).

O café verde ainda contém em sua composição ácidos alifáticos não voláteis como os ácidos cítrico, málico e quínico; ácidos voláteis como os ácidos acético, propanóico, butanóico, isovalérico, hexanóico e decanóico. Óleos e ceras também fazem parte de sua composição que representam de 8 a 18% da massa seca, junto com proteínas, aminoácidos e minerais (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; PABLOS; GONZA, 1998).

Além disso, o café verde também possui polissacarídeos insolúveis como a celulose e a hemicelulose, carboidratos solúveis como a frutose, glicose, galactose e arabinose (monossacarídeos), oligossacarídeos como a sacarose, rafinose e estaquiose, polímeros de galactose e manose (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

1.3 PROPRIEDADES BIOATIVAS DO CAFÉ

O consumo do café está associado ao menor risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2, atividade antioxidante frente a radicais livres, além de inibir a peroxidação lipídica. O café também possui compostos com atividade antibacteriana frente a estirpes de *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Além de diversas atividades biológicas, diferentes constituintes do café têm sido sugeridos como potencialmente quimioprotetores em diferentes sistemas químicos e biológicos. A propriedade mais conhecida é como estimulante, devido principalmente a cafeína, responsável por aumentar o estado de alerta por meio da estimulação do sistema nervoso central,

aumentando a circulação sanguínea e a respiração. Outros possíveis benefícios do café incluem a melhora do humor, melhora da performance na prática de exercícios e redução dos sintomas associados a doença de Parkinson (CHU, Y. et al., 2011; DAGLIA et al., 1998; ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; LIMA et al., 2010; RAMALAKSHMI et al., 2009).

As substâncias presentes no café, após serem metabolizadas pela microbiota intestinal, vão originar outras moléculas que também possuem atividade antioxidante. Algumas dessas estruturas possuem atividade antioxidante superior ao butilhidroxi tolueno (BHT), apresentando valores EC_{50} muito inferiores ao antioxidante utilizado como padrão. Através da incubação anaeróbica do ácido 4,5-O-dicafeoilquínico com a microbiota intestinal humana por 24 horas a 37 °C, quatro compostos foram gerados, o ácido 3,4-O-dicafeoilquínico-metil-éster, o ácido 3-hidroxifenilpropiónico, o ácido transcafeico e o ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico. A identificação das estruturas moleculares dos compostos formados após a biotransformação pela microbiota intestinal foi realizada através da análise de dados espectroscópicos e a análise da atividade antioxidante foi realizada utilizando o método de DPPH• (YANG et al., 2013).

O consumo regular da bebida do café pode trazer vários benefícios para a saúde. Em um estudo duplo cego randomizado de quatro semanas realizado com oitenta e quatro pessoas que consumiram regularmente a bebida do café, foi possível observar a diminuição da gordura corporal, aumento dos níveis de serotonina no plasma sanguíneo e diminuição dos níveis do hormônio grelina, que está associado com a sensação de saciedade. Além disso, foi observado também através do ensaio cometa, efeitos protetores do DNA associado a ingestão regular da bebida do café (BAKURADZE et al., 2014).

Os ácidos clorogênicos, que fazem parte da composição do grão do café, também possuem algumas atividades biológicas relevantes como hepatoproteção, ação hipoglicemiante e atividade antiviral. O óleo do café verde é usado na indústria cosmética devido a sua capacidade de manter a umidade da pele e por possuir também atividade fotoprotetora. A fração diterpênica do óleo do café verde possui propriedades anticarcinogênicas. O extrato do café verde é utilizado como antioxidante, para o controle do peso corporal, diminuição da pressão arterial e como antimicrobiano (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012).

Iwai et al (2004) demonstraram que o ácido di-cafeoilquínico, presente no

café, além de exibir atividade antioxidante, também possui atividade anti-tirosinase, enzima esta que participa na formação da melanina. A atividade deste composto teve atividade superior a de substâncias tradicionais usadas no tratamento para redução da produção de melanina, tais como o arbutin e ácido ascórbico.

Produtos com propriedades benéficas a saúde estão cada vez mais sendo consumidos. Dziki et al (2015) realizaram um trabalho em que se testou a fabricação de pão enriquecido com farinha de café verde (*Coffea arabica* L.) provenientes de diversos países, inclusive do Brasil. Os grãos de café foram transformados em farinha com granulometria padronizada e testes de digestibilidade e biodisponibilidade *in vitro* foram realizados, demonstrando que mesmo após a digestão, havia polifenóis em quantidade significativa e atividade antioxidante relevante. Os pesquisadores concluíram que o pão enriquecido com farinha de café verde possui alta aceitabilidade, confirmado através de testes de palatabilidade com consumidores e que o pão fabricado utilizando café brasileiro possuía a maior atividade antioxidante dentre as amostras testadas.

O uso tópico de produtos que contenham extratos de café verde também é alvo de interesse de grandes indústrias de cosméticos. A Stiefel Laboratories possui um produto chamado RevaleSkin™ que possui em sua formulação extrato de café verde. O motivo pelo qual o extrato de café verde foi escolhido foi devido ao fato de que é nesta fase de maturação da planta que há o pico concentração de antioxidantes. Este extrato nomeado de CoffeeBerry® foi testado pelo ensaio ORAC e demonstrou ser superior a outros antioxidantes consagrados como o extrato de chá verde, extrato de romã, vitamina C e vitamina E. Além disso, o teste de PCR (reação em cadeia da polimerase) revelou que o CoffeeBerry® a 0,001% foi capaz de aumentar a expressão de fatores de crescimento sintetizadores de colágeno e conectores de tecido além de diminuir a expressão de metaloproteinases (FARRIS, 2007).

Outro exemplo da utilização do uso do extrato de café por indústrias para produção de suplementos com propriedades funcionais está no estudo realizado por pesquisadores franceses. A empresa Naturex SA da França desenvolveu um extrato de café descafeinado (Svetol®) com alto teor de ácidos clorogênicos (45% de CGAs totais e 10% de 5-ACQ) onde foi testada a capacidade desse extrato em reduzir o peso corporal através da liberação de ácidos graxos livres de adipócitos humanos. O extrato foi testado em diferentes concentrações (0,04, 0,2 e 1 mg/ml) através de

um método colorimétrico enzimático quantitativo para ácidos graxos livres não esterificados. Os adipócitos foram incubados em diferentes tempos (2, 48, 96, 144 e 192 horas) e os resultados demonstraram grande liberação de ácidos graxos livres nas células tratadas com Svetol[®] em relação ao grupo controle (FLANAGAN et al., 2014).

Existe uma procura cada vez maior por antioxidantes naturais derivados de materiais de plantas, buscando substituir os sintéticos. Presume-se que as substâncias antioxidantes naturais sejam mais seguras, além de apresentarem implicações na saúde e funcionalidade nos sistemas alimentícios (CHANWITHEESUK; TEERAWUTGULRAG; RAKARIYATHAM, 2005).

1.4 BIOTRANSFORMAÇÃO

Os ácidos clorogênicos e o ácido cafeico presentes no café são comumente encontrados covalentemente ligados a polissacarídeos da parede celular da planta (arabinosilanas, xiloglucanas e pectinas) através de ligações ésteres (ASTHER et al., 2002).

Esses fitoconstituintes (fenólicos, glicosídeos e flavonoides) ligados a polissacarídeos encontram-se na forma conjugada e são predominantemente hidrofílicos possuindo alto peso molecular, fatores limitantes da biodisponibilidade desses compostos, uma vez que não são capazes de serem absorvidos nas vilosidades intestinais quando ingeridos ou de atravessar a barreira lipídica do estrato córneo quando aplicados na pele (MANACH et al., 2004).

A baixa absorção intestinal ou transdérmica desses compostos antioxidantes em suas formas nativas compromete as propriedades bioativas no organismo. Estudos demonstraram que alguns fitocompostos que apresentaram boa atividade em ensaios *in vitro* não reproduziram os resultados *in vivo*, uma vez que não foram capazes de serem absorvidos (AJAZUDDIN; SARAF, 2010; MANACH et al., 2004).

Diante disso, tem crescido o interesse em processos biotecnológicos de biotransformação que rompem essas ligações químicas, de forma a isolar a molécula do composto fenólico das que lhe estão associadas. A biotransformação das fontes vegetais dos polifenóis, ou dos produtos delas advindos, leva ao aumento da concentração de compostos fenólicos livres e melhora a atividade funcional desses antioxidantes (FERREIRA et al., 2013).

A biotransformação de compostos bioativos é uma alternativa que merece atenção. Pode ser definida como transformações químicas em substâncias a partir da ação de enzimas isoladas ou de microrganismos por meio da fermentação em estado sólido (FES) ou submersa (FS). Este tipo de fermentação (FES) tem recebido muito interesse por parte das indústrias em pesquisas, uma vez que é um processo de baixo custo e com alto rendimento quando comparado aos processos de fermentação submersa (MARTINS et al., 2011; SINGHANIA et al., 2009).

Os processos de biotransformação têm sido bastante utilizados uma vez que possuem o potencial de conversão de fontes vegetais e resíduos industriais em uma grande variedade de compostos de interesse econômico (MADEIRA JUNIOR; TEIXEIRA; MACEDO, 2013).

Sistemas isolados de enzimas ou microrganismos podem ser utilizados para a biotransformação. Muitos sistemas isolados de enzimas estão comercialmente disponíveis ou são relativamente fáceis de isolar e podem ser estáveis e simples de serem utilizados, muitas vezes gerando produtos simples. Porém, em algumas reações em que co-fatores são utilizados, existe a necessidade de regenerar o co-fator, o que pode tornar o processo inviável. Microrganismos não possuem esta desvantagem e geralmente apresentam custos mais baixos em sua utilização se comparados a sistemas de enzimas. Além disso, possuem tendência de gerar mais de um produto (HANSON, 1995).

A vantagem do uso de sistemas biológicos (microrganismos ou enzimas isoladas) em relação aos métodos químicos é que as reações são realizadas em condições suaves (o que é útil para compostos sensíveis a condições drásticas) e geralmente os custos são mais baixos, além de ser um processo sustentável do ponto de vista ecológico (ALEU; COLLADO, 2001).

Os microrganismos mais utilizados na biotransformação são os fungos filamentosos, as bactérias e as leveduras. As enzimas produzidas por estes microrganismos possuem aplicabilidade em diversos processos industriais. Como exemplos de enzimas, podemos citar as celulases fúngicas, as amilases, as β -glicosidases e as ligninases (COUTO; SANROMÁN, 2006; HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004).

Os fungos filamentosos são os mais importantes e melhores adaptados para a FES. O modo de crescimento dos fungos através de hifas, sua boa tolerância a baixa atividade de água (A.a) e boa tolerância a altas pressões osmóticas dão aos

fungos maiores vantagens sobre organismos unicelulares na colonização de substratos sólidos e utilização de nutrientes disponíveis. Genericamente, enzimas hidrolíticas, como por exemplo, celulasas, xilanasas e pectinases são produzidas por estirpes de fungos (KRISHNA, 2005).

Geralmente, existem dois tipos de inóculos: os esporos e as células vegetativas. Os esporos possuem algumas vantagens dentre as quais podemos citar: servem como biocatalisadores em reações de bioconversão, pois geralmente são capazes de carregarem consigo as mesmas reações dos micélios dos quais foram gerados; conveniência, melhor flexibilidade na coordenação da preparação do inóculo, maior tempo de estocagem e maior resistência no manuseio. Porém, existem desvantagens como maior tempo de fase lag, maior tamanho do inóculo; os esporos são metabolicamente dormentes e conseqüentemente sua atividade metabólica precisa ser induzida por um sistema de enzimas apropriado e este precisa ser sintetizado antes dos fungos começarem a utilizar o substrato e crescer (KRISHNA, 2005).

Para que a FES ocorra de forma adequada, é necessário controlar os níveis de umidade que variam de 30% a 85%, interferindo diretamente na produção dos compostos de interesse. Para bactérias, a umidade da matriz sólida deve ser superior a 70% e para fungos filamentosos de 20% a 70% (BHANJA et al., 2008; KRISHNA, 2005).

Além da umidade, outros aspectos devem ser levados em consideração. Fatores como o pH, temperatura e a concentração do substrato são de suma importância. Em reatores industriais a temperatura torna-se um fator crucial, pois esta eleva-se muito quando grandes quantidades de substratos são aplicadas, podendo levar a desnaturação das enzimas produzidas, que muitas vezes são exatamente os compostos de interesse no processo (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004; HÖLKER; LENZ, 2005).

As vantagens da FES com relação a FS são várias. Na FES existe grande variedade de matrizes, menor gasto de energia, menor desperdício de água e produtos obtidos com concentrações maiores. As enzimas produzidas pelos microrganismos na FES possuem mais estabilidade, maior atividade. Na FES há maior produção de biomassa e maior reprodutibilidade. Há menor necessidade de espaço para a FES e maior facilidade de controlar possíveis contaminações (ASTHER et al., 2002; BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012; KRISHNA, 2005).

Diversos estudos já demonstraram a aplicação da biotransformação, com o café, por exemplo, utiliza-se a fermentação em estado sólido para o aproveitamento de resíduos agroindustriais e obtenção de polifenóis (MIENDA; IDI; UMAR, 2011; SINGHANIA et al., 2009). Resíduos agroindustriais do café são fontes para obtenção de compostos fenólicos como a catequina, ácidos clorogênicos, ácido protocatecúico, ácido ferúlico e ácido cafeico através da fermentação em estado sólido utilizando estirpes de fungos do gênero *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* e *Neurospora*. Os resíduos foram inoculados com uma suspensão contendo 5×10^5 esporos/ grama⁻¹ e incubado por 6 dias a 30 °C (MACHADO et al., 2012).

Em um estudo no qual foram utilizados extratos enzimáticos e o fungo filamentosso *Aspergillus niger* C23308, foi possível transformar os ácidos clorogênicos em ácido quínico e cafeico, havendo aumento da atividade antirradicais da polpa do café fermentada com relação a polpa do café não fermentada. A atividade enzimática máxima foi atingida entre os períodos de 20 a 48 horas (TORRES-MANCERA et al., 2013). Outro estudo realizado utilizando-se a polpa do café fermentado pelo fungo *Aspergillus tamarii* mostrou um aumento significativo na quantidade de ácidos hidroxicinâmicos livres (ácido ferúlico, ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido para-cumárico) no café fermentado e conseqüente redução dos ácidos hidroxicinâmicos ligados às paredes celulares. Houve um acréscimo de 13 para 47% na quantidade de ácidos hidroxicinâmicos livres após o processo fermentativo (ARELLANO-GONZÁLEZ et al., 2011).

Outro microrganismo utilizado na biotransformação de resíduos da indústria do café foi o fungo *Penicillium purpurogenum*. No estudo realizado por Rossana et al (2015), houve um aumento na quantidade extraída de compostos fenólicos realizada por meio da fermentação em estado sólido de resíduos do café (polpa e cascas de grãos de café) que foram processados por dois diferentes métodos de despulpamento, a via úmida e a via seca. Os extratos dos resíduos processados pela via seca apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos. Neste mesmo estudo foram avaliadas as condições ideais para otimizar a extração destes compostos. A umidade na faixa de 50-75%, temperatura de incubação entre 33-35 °C e pH abaixo de 5 foram as melhores condições (ROSSANA et al., 2015).

A biotransformação de ácidos clorogênicos do extrato de café verde em ácido cafeico e 4-vinil-catecol foi observada por Bel-Rhlid et al (2013) após 16 horas de incubação do café com bactérias da estirpe *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. A

metabolização ocorreu devido a produção de esterases e da hidroxicinamato descarboxilase por esta bactéria, porém neste estudo não foi avaliada a atividade antioxidante (BEL-RHLID et al., 2013).

O emprego da biotransformação com o objetivo de aumentar as propriedades bioativas também foi relatado em estudos utilizando a soja. O uso do farelo de soja com o objetivo de melhorar as propriedades bioativas demonstrou que a soja é rica em isoflavonas glicosiladas passíveis de hidrólise enzimática, produzindo formas agliconas que mostraram-se mais ativas contra radicais livres, tumores da mama e próstata, entre outras atividades biológicas (MATSUDA et al., 1994; ONOZAWA et al., 1998).

Handa et al (2016) demonstraram aumento da atividade antioxidante e na quantidade de fenólicos extraídos por meio de fermentação em estado sólido usando o fungo *Aspergillus oryzae*. O substrato utilizado foi a farinha de soja desengordurada (10 gramas) inoculada com 10^7 esporos e incubada a 30 ° C por 48 horas. Neste estudo o rendimento do *Aspergillus oryzae* foi superior ao do *Monascus purpureus* quanto ao poder de extração de compostos fenólicos e aumento da atividade antioxidante (HANDA et al., 2016).

Resultados de pesquisas realizados por Aguiar e Park (2004) permitiram concluir que a enzima β -glicosidase produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 22786 foi capaz de converter as isoflavonas glicosiladas daidzina e genistina às suas respectivas formas agliconas, daidzeína e genisteína, após 24 horas de fermentação em estado sólido a 30 °C.

Outro exemplo de conversão dos polifenóis glicosilados da soja em suas formas não glicosiladas foi demonstrado por Georgetti et al 2009. A partir da fermentação em estado sólido pelos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* e *Aspergillus awamori*, acompanhada pela produção da enzima β -glicosidase, houve aumento da atividade antioxidante. Estas enzimas possuem a capacidade de hidrolisar ligações β -glicosídicas em vários tipos de compostos fenólicos que estão ligados a resíduos de açúcar.

Estudos realizados por pesquisadores chineses demonstraram um aumento de 230 e 790% dos compostos fenólicos, ácidos cafeico e ferrúlico respectivamente, após a fermentação da *Avena Sativa* L. em estado sólido por *Aspergillus oryzae* var. *effuses*, e 170 e 450% após a fermentação pelo *Aspergillus niger*. Os resultados mostraram que os ácidos cafeico e ferúlico, presentes em grandes quantidades na

aveia na forma esterificada, após sofrerem hidrólise pelos microrganismos tiveram a solubilidade aumentada o que facilitou a extração desses compostos (CAI et al., 2012).

Pesquisadores indianos também demonstraram que os fungos filamentosos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus awamori* usados na fermentação em estado sólido são eficientes em melhorar as quantidades de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de grãos de trigo em relação ao grupo dos grãos não-fermentados. Eles incubaram durante 4 dias o substrato com o fungo *Aspergillus oryzae* e realizaram testes de atividade antioxidante como o DPPH• e o ABTS. Além disso, perceberam também uma correlação linear entre o aumento dos polifenóis quantificados e o aumento da atividade de três enzimas, a α -amilase, β -glicosidase e xilanase (BHANJA; KUMARI; BANERJEE, 2009).

1.5 O fungo *Aspergillus oryzae*

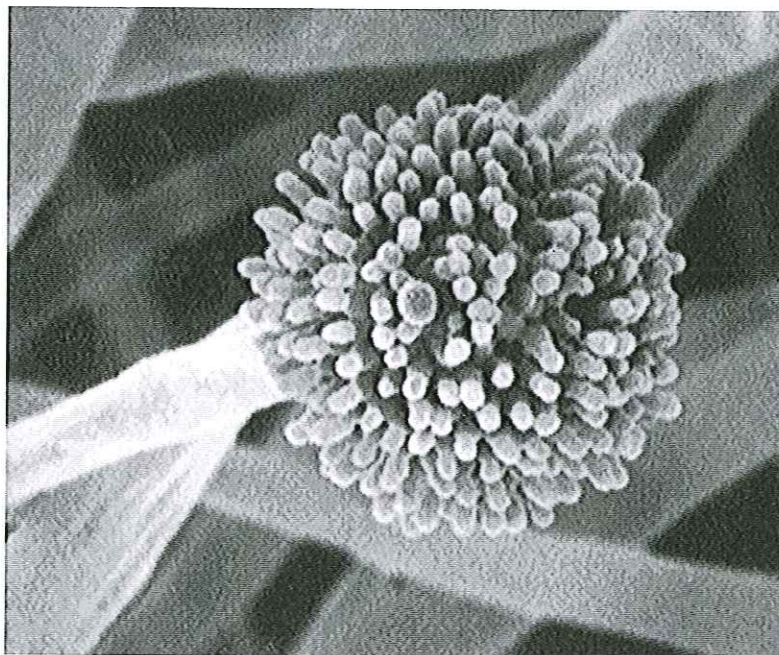
O gênero *Aspergillus* possui aproximadamente 378 espécies de fungos. Eles são endofíticos e os metabólitos produzidos por estes microrganismos possuem diversas atividades biológicas. As plantas hospedeiras destes fungos fornecem os nutrientes necessários para o crescimento das estirpes. Em troca, os metabólitos produzidos pelas estirpes dos *Aspergillus* endofíticos protegem a planta contra fatores biológicos adversos como a invasão de patógenos, infecção viral e alimentação de herbívoros (ZHANG et al., 2015).

O fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* é um importante microrganismo aeróbio usado milenarmente na produção de alimentos e bebidas fermentadas no Japão e na China (Figura 4). Este fungo pertence à seção *Flavis* do subgênero *Circumdati* que por sua vez pertence ao gênero *Aspergillus*. Atualmente este fungo é morfológicamente e metabolicamente modificado para que não produza aflatoxina e seja considerado seguro. As colônias possuem coloração esverdeada ou marrom. O *A. oryzae* é responsável pela produção de várias proteínas, dentre elas as enzimas β -glicosidases, que podem ser usadas para quebrar moléculas de glicose que ficam ligadas a compostos fenólicos. Além destas enzimas, *A. oryzae* também produz as tanases que dentre suas várias funções, são capazes de hidrolizar ligações ésteres de ácidos clorogênicos (BARBESGAARD; HELDT-HANSEN; DIDERICHSEN, 1992; HAMZA; KHOUFI; SAYADI, 2012; KAYA et al., 2008;

MACHADO et al., 2012; MACHIDA et al., 2005; MADEIRA JUNIOR; TEIXEIRA; MACEDO, 2013).

Algumas enzimas produzidas por microrganismos, como por exemplo, as ferruloilesterases (FAE, também conhecidas como ácido ferrúlicoesterases) são subclasses das esterases do ácido carboxílico capazes de clivar as ligações ésteres entre os ácidos hidroxicinâmicos e os polissacarídeos da parede celular da planta. Estas esterases são caracterizadas e divididas em quatro subclasses (A, B, C e D). A enzima ácido clorogênico hidrolase ou clorogenatoesterase catalisa a hidrólise da ligação éster presente nos ácidos clorogênicos (ACG). Ela é usada para produzir ácido cafeico a partir de fontes naturais ricas em ACG (ARELLANO-GONZÁLEZ et al., 2011; ASTHER et al., 2002; RAMIREZ et al., 2008; TENKANEN et al., 1991).

Figura 4 - *Aspergillus oryzae* visto através de microscopia eletrônica



Fonte: [HTTP://WWW.DIARK.ORG/DIARK/SPECIES_LIST/ASPERGILLUS_ORYZAE](http://www.diark.org/diark/species_list/aspergillus_oryzae)

Nota: Título da figura no site - *Aspergillus oryzae* 100-8

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são conhecidos como produtores de várias enzimas do tipo ferruloilesterases e cinâmoilesterases. Estas enzimas são capazes de liberar ácidos fenólicos que estão conjugados com outras

moléculas. Especificamente o *Aspergillus oryzae* é capaz de produzir ferruloilesterases do tipo B e C. As ferruloilesterases do tipo B se mostram mais específicas para ácidos hidroxicinâmicos hidroxilados enquanto que as do tipo C são inespecíficas. Além disso, o fungo *A. oryzae* é capaz de produzir endoproteases neutras, ácidas e básicas capazes de hidrolisar proteínas em polipeptídeos e exoproteases como, por exemplo, aminopeptidases e carboxipeptidases que vão hidrolisar proteínas em peptídeos menores. Diante das diversas aplicações do *A. oryzae*, este fungo filamentoso foi escolhido para o presente trabalho (LI et al., 2016; RAMÍREZ-VELASCO et al., 2016).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a biotransformação de compostos fenólicos presentes na farinha de café verde (*Coffea arabica* L.) utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* visando obter um extrato fermentado com maior atividade antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o melhor tempo de incubação no processo de biotransformação do café pelo fungo baseando-se nos parâmetros de atividade doadora de H⁺ ao radical DPPH•, poder redutor e teor de compostos fenólicos totais.
- Determinar os teores de ácido clorogênico (5-ACQ), cafeína e ácido cafeico nos extratos fermentados durante diferentes períodos de tempo e no extrato não biotransformado e realizar uma comparação dos perfis cromatográficos dos extratos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CAFÉ VERDE

Os grãos de café verde (*Coffea arabica* L.) foram adquiridos da Cooperativa dos Cafeicultores das Matas de Minas, Viçosa - MG. Os grãos foram moídos em moinho de facas (marca - SOLAB; modelo SL30) e passados em tamiz de malha número 20. A farinha de café finamente processada foi armazenada e mantida sob refrigeração (2-8 °C).

3.2 MANUTENÇÃO DO FUNGO E PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS

O fungo filamentososo da estirpe *Aspergillus oryzae* CCDCA 102604 isolado de amostras de pimenta do reino foi gentilmente cedido pela Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras. O departamento é credenciado como fiel depositária de amostras pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético do Ministério do Meio Ambiente.

O fungo foi ativado por repique em meio batata dextrose Agar (BDA) inclinado, seguido por incubação a 22 °C. Os repiques foram realizados a cada 15 dias e para o preparo da suspensão de esporos foram utilizados esporos após 7 dias do repique. Adicionou-se solução salina aos tubos e os esporos da superfície do meio foram suspensos com auxílio de alças. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer e a suspensão foi ajustada de modo a obter-se uma suspensão com 10^7 esporos/mL.

3.3 BIOTRANSFORMAÇÃO DO CAFÉ VERDE POR *A. oryzae* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Alíquotas de 10 g da farinha de café foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL, adicionadas de 10 mL de água deionizada e homogeneizadas com bastão de vidro. Em seguida, os Erlenmeyers contendo a farinha de café foram esterilizados por calor úmido a 121 °C por 15 minutos.

Após esterilização e resfriamento da farinha de café, alíquotas de 1mL da suspensão de esporos (10^7 esporos/mL) foram uniformemente espalhadas sobre o café com o auxílio de um bastão de vidro para homogeneização. Os Erlenmeyers foram incubados a 25 °C por 24, 48 e 72 horas. O controle não fermentado foi obtido pelo emprego de 10 g da farinha do café, o qual passou por todos os procedimentos, exceto a adição de 1mL da suspensão de esporos, que foi substituído por 1 mL de solução salina.

3.4 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Após cada tempo de incubação, foi realizada a extração dos compostos fenólicos utilizando etanol 80% (v/v) como solvente. Foram adicionados 70 mL do solvente aos Erlenmeyers contendo 10 g da farinha de café fermentada ou não. A extração foi realizada sob agitação em *shaker* a 200 rpm por 2 horas a 25 °C. Os extratos hidroetanólicos foram filtrados em papel de filtro de 12,5 µm e mantidos sob refrigeração.

3.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS TOTAIS

Os teores de sólidos totais dos extratos hidroetanólicos (mg de sólidos totais/mL de extrato) foram determinados em balança com sistema de aquecimento por infravermelho, na qual os extratos obtidos foram submetidos à temperatura de 105 °C até peso constante.

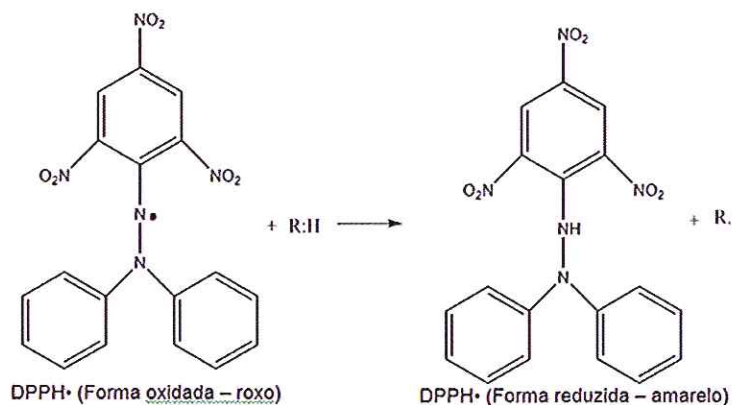
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS

3.6.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH•

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada empregando-se o método DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), que avalia a capacidade dos compostos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH• (Figura 5). A solução de DPPH• em sua forma oxidada possui coloração roxa e quando o radical transfere seu elétron, devido a redução promovida pela espécie antioxidante, esta solução se descolore até atingir coloração amarela clara

de forma estequiométrica ao número de moléculas de radicais DPPH• reduzidas. A reação é monitorada pelo decréscimo da absorvância (BLOIS, 1958).

Figura 5 - Mecanismo de reação do DPPH• com uma molécula antioxidante



Fonte: O AUTOR - CHEM DRAW PRO 8.0, 2016.

Para a avaliação da atividade antioxidante, os diferentes extratos obtidos foram diluídos em etanol 80% a fim de se obter cinco concentrações: 30, 60, 120, 180 e 240 $\mu\text{g/mL}$. As concentrações dos extratos em $\mu\text{g/mL}$ foram calculadas considerando os valores de sólidos totais, calculados em balança de infravermelho. A critério de comparação foram avaliadas também as atividades antioxidantes dos padrões de ácido cafeico, ácido clorogênico, rutina e quercetina nas concentrações de 1, 3, 5, 6, 12, 15 e 17 $\mu\text{g/mL}$.

O ensaio consistiu da adição de 3mL de solução etanólica dos extratos ou dos padrões nas diferentes concentrações no meio reacional e 1 mL da solução etanólica de DPPH• a 0,5 mM. Todas as análises, realizadas em triplicata, foram acompanhadas de um tubo controle positivo que continha todos os constituintes do meio reacional, exceto a amostra, e do branco que continha todos os constituintes do meio reacional, exceto a solução do DPPH•. Após 30 minutos da reação as absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro (Micronal; modelo B582) no comprimento de onda de 517nm.

A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de redução da absorvância da amostra, no meio reacional, em relação à absorvância do controle positivo, como demonstrado pela fórmula abaixo. A partir dos percentuais de inibição obtidos foram calculados os valores de CE_{50} para cada extrato, isto é, a

concentração eficaz de extrato capaz de reduzir em 50% a absorvância do controle positivo. O CE_{50} foi calculado através do gráfico de porcentagem de redução do radical DPPH• versus concentração do extrato no meio reacional.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{absorbância controle} - \text{absorbância amostra})}{\text{absorbância controle}} \times 100$$

3.6.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor

Adicionalmente ao método do DPPH• a atividade antioxidante dos extratos foi determinada empregando-se também o método do poder redutor. Neste ensaio, avalia-se a atividade antioxidante da amostra de acordo com a capacidade dos compostos fenólicos presentes em reduzir o íon ferricianeto (que possui coloração amarela) para ferrocianeto que, na presença do íon férrico (proveniente do $FeCl_3$), forma o azul da Prússia (HENRIQUE et al., 2007). Foram preparadas soluções das amostras nas concentrações de 5, 15, 30, 60 e 100 μ L utilizando água destilada como solvente. A critério de comparação foram avaliadas também as atividades antioxidantes dos padrões de ácido cafeico, ácido clorogênico, rutina e quercetina nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 5, 8 e 10 μ g/mL.

As soluções das amostras foram então adicionadas de 1,5 mL de solução de tampão fosfato (0,2M, pH 6,6), seguido por 1,5 mL de solução de ferrocianeto de potássio a 1%. Os tubos foram incubados em banho maria a 50 °C por 20 minutos. Em seguida 1,5 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) foi adicionado, seguido por 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico ($FeCl_3$) a 0,1% (p/v) (OYAIZU, 1986). As análises foram realizadas em triplicata e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 700 nm de modo que, quanto maior a atividade antioxidante da amostra, maior será a leitura obtida no espectrofotômetro.

As atividades redutoras das amostras foram expressas como concentração eficiente (CE_{50}), que consiste na concentração da amostra na qual a absorvância atinge o valor de 0,5.

3.6.3 Determinação do teor de fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais baseou-se na reação dos fenólicos com um reagente colorimétrico no qual permite a mensuração na porção visível do espectro. No teste de Folin-Ciocalteu há transferência de elétrons dos compostos fenólicos em meio alcalino para complexos de ácidos fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$), que ao oxidar fenóis, se reduzem a óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e de molibdênio (Mo_8O_{23}), este último com coloração azul (SINGLETON; ROSSI, 1965). Primeiramente foi construída uma curva de calibração com o padrão de ácido gálico nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 $\mu\text{g/mL}$. A partir da utilização desta curva os resultados das amostras foram expressos como gramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 gramas de extrato (g de EAG / 100 g de extrato).

Foram preparadas soluções dos diferentes extratos na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ e dos padrões de ácido cafeico, ácido clorogênico, rutina e quercetina na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$. Retirou-se 1 mL dessas soluções e em tubos de ensaios, foram adicionados 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu a 10% e após oito minutos, 4 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 7,5%.

Após duas horas de reação, em que os tubos ficaram armazenados ao abrigo da luz a temperatura ambiente, foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (Micronal; modelo B582) a 765 nm utilizando cubeta de quartzo. Para cada amostra foi preparado um "branco" que continha a amostra e todos os reagentes com exceção do reagente Folin-Ciocalteu.

3.7 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ÁCIDO CAFEICO E CAFEÍNA POR CLAE UV-DAD

3.7.1 Padrões e solventes

Foram utilizados os reagentes metanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA), água deionizada ultrapurificada em sistema Milli-Q (Millipore®) e ácido fosfórico P.A. (Quimex®, pureza de 85%). Todos os solventes foram previamente filtrados em membrana de 0,45 μm com o auxílio de um sistema acoplado a bomba de vácuo e degaseificados durante 15 minutos em banho de ultrassom.

Os padrões de ácido cafeico (pureza $\geq 98\%$), ácido clorogênico 5-ACQ (pureza $\geq 95\%$) e cafeína (pureza $\geq 99\%$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

Antes das injeções todas as amostras e soluções padrões foram centrifugados por 5 minutos a 10000 rpm e filtrados em filtros de 0,45 micras acoplados a seringas.

3.7.2 Condições cromatográficas

O equipamento utilizado foi o HPLC modular (Waters[®]) composto por uma bomba binária (Waters[®] 1525), detector de fotiodo (Waters[®] 2998) e injetor automático (Waters[®] 2707). Os dados coletados das amostras e padrões foram tratados e analisados utilizando o software Empower[®] 3. A cromatografia foi realizada em coluna de fase reversa de sílica C18 modelo Promosil[®] (Agela Technologies) de 150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 μm .

O eluente utilizado foi uma combinação de água ultrapurificada acidificada com 0,1% de ácido fosfórico (Solvente A) e metanol (Solvente B). Primeiramente a coluna foi equilibrada por 20 minutos com a fase móvel, composta por 5% do solvente B. Após a injeção dos extratos e padrões (50 μL), a eluição dos compostos ocorreu com um gradiente de concentração dos solventes de forma que a concentração do solvente B aumentou de 5% para 40% em 20 minutos e de 40% para 100% em 10 minutos, permanecendo em 100% por 10 minutos. O fluxo de eluição foi de 1 mL/minuto e a coluna foi mantida em forno de aquecimento a 30 °C.

Os padrões de ácido clorogênico, cafeína e os extratos foram diluídos em água/metanol (95:5 v/v) e o ácido cafeico foi diluído em 100% de metanol. Foram feitas triplicatas das soluções de padrões em diferentes concentrações (25, 100, 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$) para construção da curva de calibração através do método do padrão externo, enquanto que as amostras foram analisadas em triplicatas na concentração de 2 mg/mL . Os padrões de ácido clorogênico, ácido cafeico e os extratos foram analisados em 272 e 330 nm, obtendo-se os picos de cada substância e seus respectivos valores de área. O padrão de cafeína foi analisado em 272 nm.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa de estatística GraphPadPrism® (versão 6.0). Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão (DP), comparando os diferentes grupos por análise de variância (ANOVA), seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas os valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITOS DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS

4.1.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH•

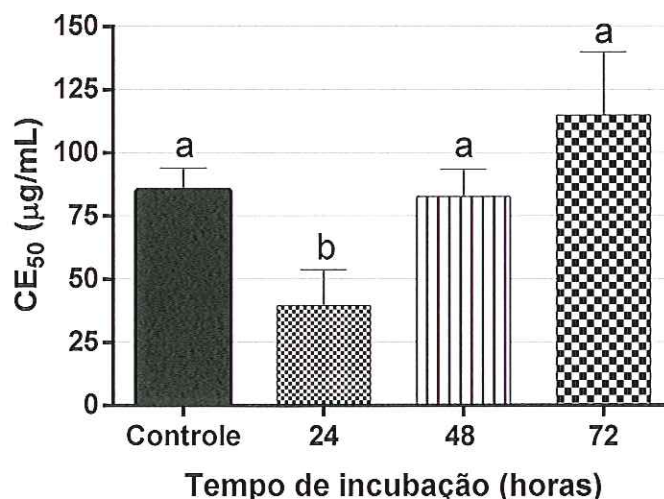
O efeito do tempo de incubação de 24, 48 e 72 horas a 25 °C sobre a biotransformação do café pelo fungo *A. oryzae* (10^7 esporos/10 g de café) foi avaliado considerando-se a atividade antioxidante dos extratos, medida primeiramente pela capacidade desses extratos em doar íons H^+ ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•).

Os resultados foram expressos em valores de CE_{50} , que é a concentração mínima necessária de extrato capaz de inibir em 50% a atividade oxidante dos radicais livres. Portanto, quanto menor os valores de CE_{50} , maior é a capacidade antioxidante dos extratos.

De acordo com os resultados, o processo de biotransformação pelo fungo durante 24 horas foi efetivo para o aumento significativo da atividade antioxidante em aproximadamente 115,7% quando comparados os extratos de café não fermentados ($85,05 \pm 9,06 \mu\text{g/mL}$) com os extratos de café fermentados por 24 horas ($39,42 \pm 14,43 \mu\text{g/mL}$). Entretanto, nos tempos de 48 e 72 horas foram observados aumentos nos valores de CE_{50} calculados, de $82,66 \pm 10,87$ e $114,93 \pm 24,96 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, o que representa um decréscimo da atividade antioxidante dos extratos em comparação com o extrato fermentado por 24 horas (Figura 6).

Os resultados fornecidos pelo método DPPH• demonstraram que o melhor tempo para a fermentação do café verde pelo fungo *A. oryzae* foi de 24 horas, uma vez que após esse tempo foram obtidos extratos com menores atividades antioxidantes, sendo até mesmo inferiores à atividade do extrato de café não fermentado.

Figura 6 - Atividade antioxidante dos extratos de farinha de café verde não fermentada e fermentada durante 24, 48 e 72 horas determinada pelo método DPPH•



Fonte: O AUTOR, 2017.

Nota: Os resultados representam a média (n=3) ± desvio padrão.

Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (p<0,05, ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey).

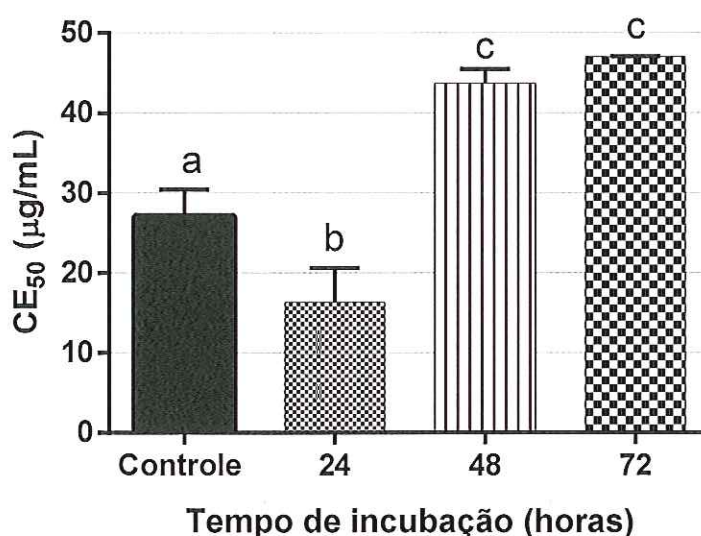
Para fins de comparação foi realizado o teste de DPPH• com os padrões de ácido cafeico, ácido clorogênico, rutina e quercetina nas concentrações de 1, 3, 5, 8, 12, 15 e 18 µg/mL. A quercetina demonstrou ser o padrão com maior atividade antioxidante (CE₅₀ = 5,97 ± 0,32 µg/mL) seguido pelo ácido cafeico (CE₅₀ = 6,31 ± 0,38 µg/mL), rutina (CE₅₀ = 11,79 ± 0,24 µg/mL) e ácido clorogênico (CE₅₀ = 13,05 ± 0,27 µg/mL).

4.1.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método poder redutor

Os resultados de atividade antioxidante medida pelo método do poder redutor demonstraram similaridades com os resultados obtidos pelo método do DPPH•. Os valores de atividade antioxidante, expressos como CE₅₀, obtidos nos extratos fermentados por 24 horas (16,34 ± 4,28 µg/mL) apresentaram um aumento na atividade antioxidante de 66,4% em relação aos extratos não fermentados (27,19 ± 3,22 µg/mL). Similarmente aos resultados empregando o método do DPPH•, a

atividade antioxidante dos extratos fermentados por 48 horas ($43,76 \pm 1,74 \mu\text{g/mL}$) e 72 horas ($47,01 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$) foram inferiores aos resultados referentes as amostras de 24 horas e no grupo controle não fermentado (Figura 7).

Figura 7 - Atividade antioxidante dos extratos de farinha de café verde não fermentada e fermentada durante 24, 48 e 72 horas determinada pelo método do poder redutor.



Fonte: O AUTOR, 2017.

Nota: Os resultados representam a média ($n=3$) \pm desvio padrão. Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p<0,05$, ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey).

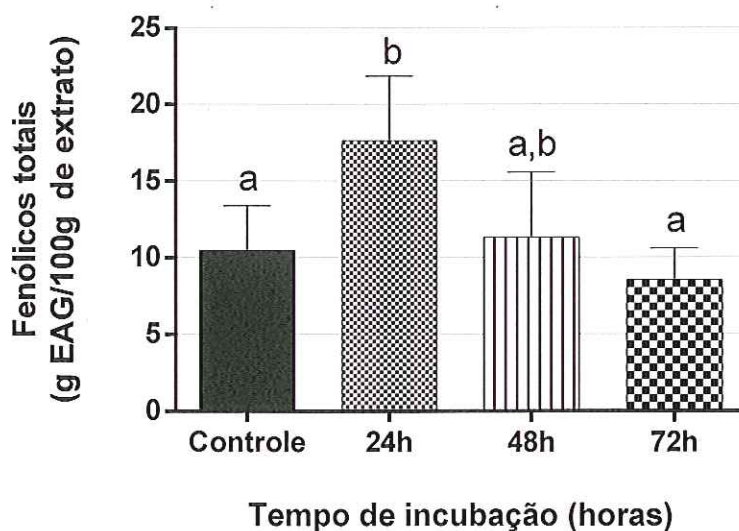
O método do poder redutor também foi realizado com os padrões de ácido cafeico, ácido clorogênico, rutina e quercetina nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 5, 8 e 10 $\mu\text{g/mL}$. O ácido cafeico demonstrou ser o padrão com maior atividade antioxidante ($\text{CE}_{50} = 2,54 \pm 0,42 \mu\text{g/mL}$) seguido pela quercetina ($\text{CE}_{50} = 3 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$), ácido clorogênico ($\text{CE}_{50} = 4,16 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$) e rutina ($\text{CE}_{50} = 7,7 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$).

4.1.3 Determinação do teor de fenólicos totais

Empregando-se a reação do ácido gálico e o reagente Folin-Ciocalteu foi determinada a análise de regressão linear, com equação da reta $y = 0,1145x - 0,0075$ ($r = 0,9963$) a partir da qual foram calculados os teores de fenólicos totais nos extratos.

Os teores de fenólicos totais nos diferentes extratos mostraram que o processo de fermentação da farinha de café verde pelo fungo *A. oryzae* durante 24 horas ($17,63 \pm 4,22$ g de EAG/100 g de extrato) promoveu um aumento de 70% dos compostos fenólicos em relação ao extrato não fermentado ($10,56 \pm 1,53$ g de EAG/100 g de extrato) (Figura 8). Os teores de fenólicos totais nos extratos fermentados por 48 ($11,35 \pm 4,22$ g de EAG/100 g de extrato) e 72 horas ($8,55 \pm 2,06$ g de EAG/100 g) foram inferiores a aquele obtido no extrato biotransformado durante 24 horas.

Figura 8 - Teores de fenólicos totais nos os extratos de farinha de café verde não fermentada e fermentada durante 24, 48 e 72 horas determinados pelo método de Folin–Ciocalteu.



Fonte: O AUTOR, 2017.

Nota: Os resultados representam a média ($n=3$) \pm desvio padrão. Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey).

Para fins de comparação foi realizado o teste dos fenólicos totais com os padrões de ácido cafeico, ácido clorogênico, rutina e quercetina na concentração de 3 µg/mL. A quercetina apresentou o maior valor de EAG (136,34 ± 0,007 g de EAG/100 g de extrato) seguido pelo ácido cafeico (120,74 ± 0,001 g de EAG/100 g de extrato), rutina (66,27 ± 0,008 g de EAG/100 g de extrato) e ácido clorogênico (58,45 ± 0,004 g de EAG/100 g de extrato).

Sacchetti et al, (2009) mensuraram os polifenóis totais do café verde extraído com água a 100 °C e obteve uma concentração de 0,38 gramas por 100 gramas de extrato. Este resultado foi inferior ao resultado obtido no presente estudo (17,63 gramas por 100 gramas de extrato biotransformado em 24 horas), o que sugere que o solvente constitui um aspecto importante para a extração dos polifenóis principalmente no que concerne a polaridade das moléculas. Além disso, as enzimas produzidas pelos microrganismos podem ter contribuído para que os compostos fenólicos ficassem mais disponíveis e mais fáceis de serem extraídos por estarem na forma livre (SACCHETTI et al., 2009).

4.2 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ÁCIDO CAFEICO E CAFEÍNA POR CLAE UV-DAD

Os teores de ácido clorogênico, ácido cafeico e cafeína nos diferentes extratos foram quantificados a partir de curvas de calibração construídas a partir da área dos picos obtidas em diferentes concentrações (25, 50, 100, 150 e 200 µg/ mL) das soluções padrões desses compostos. Foram obtidas as equações das retas e os coeficientes de correlação linear para cada padrão utilizado (Tabela 1).

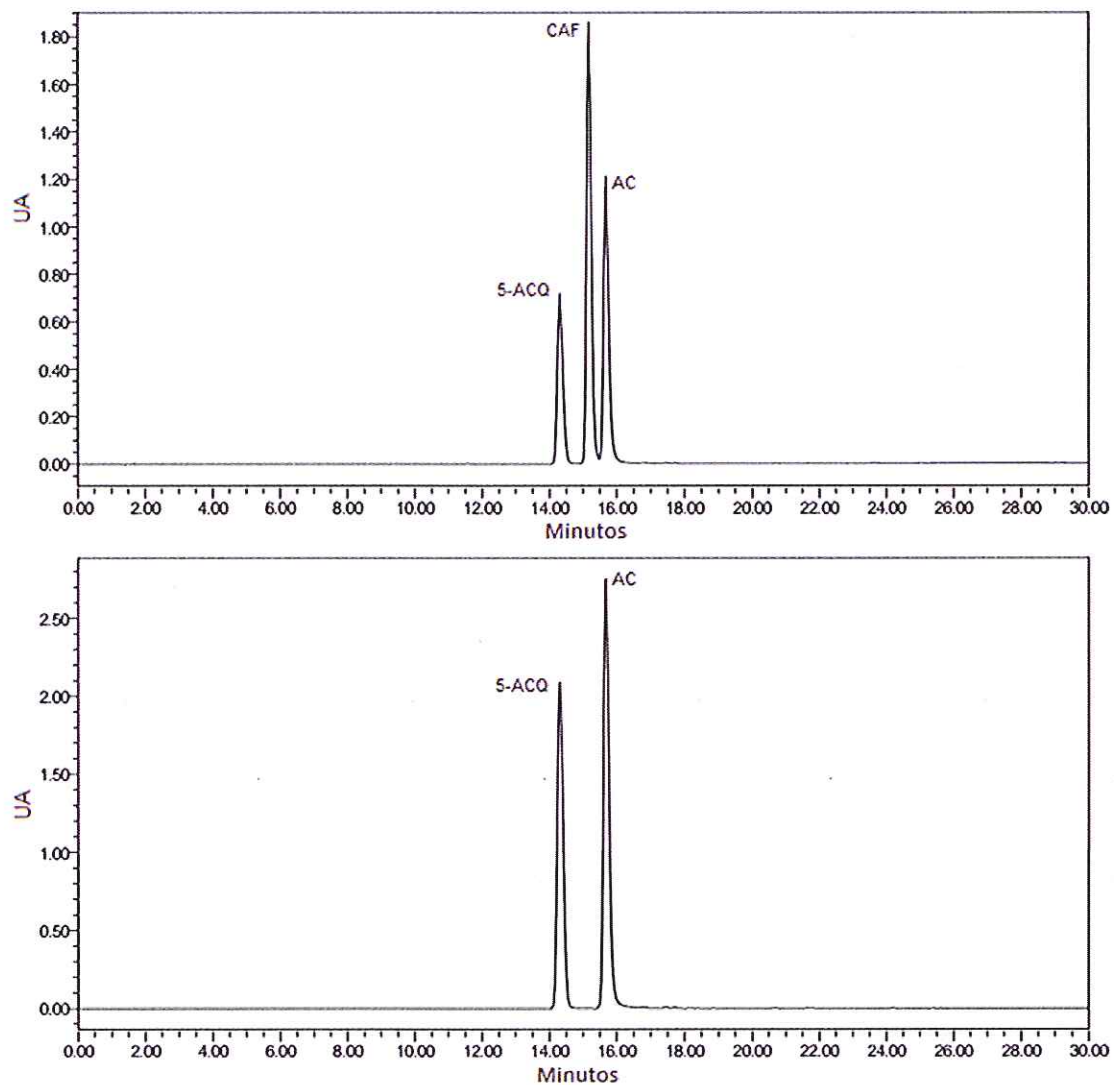
Tabela 1 - Equações das retas e coeficientes de correlação linear (r) obtidos a partir da injeção das soluções padrões de ácido clorogênico (5-ACQ), ácido cafeico e cafeína.

Padrão	Comprimento de onda (nm)	Equação da reta	Coefficiente de correlação linear (r)
5-ACQ	330	$y = 161329,35x + 617200,83$	0,9990
Ácido cafeico	330	$y = 207558x + 587734$	0,9982
Cafeína	272	$y = 120460x - 81113$	0,9987

Fonte: O AUTOR, 2017

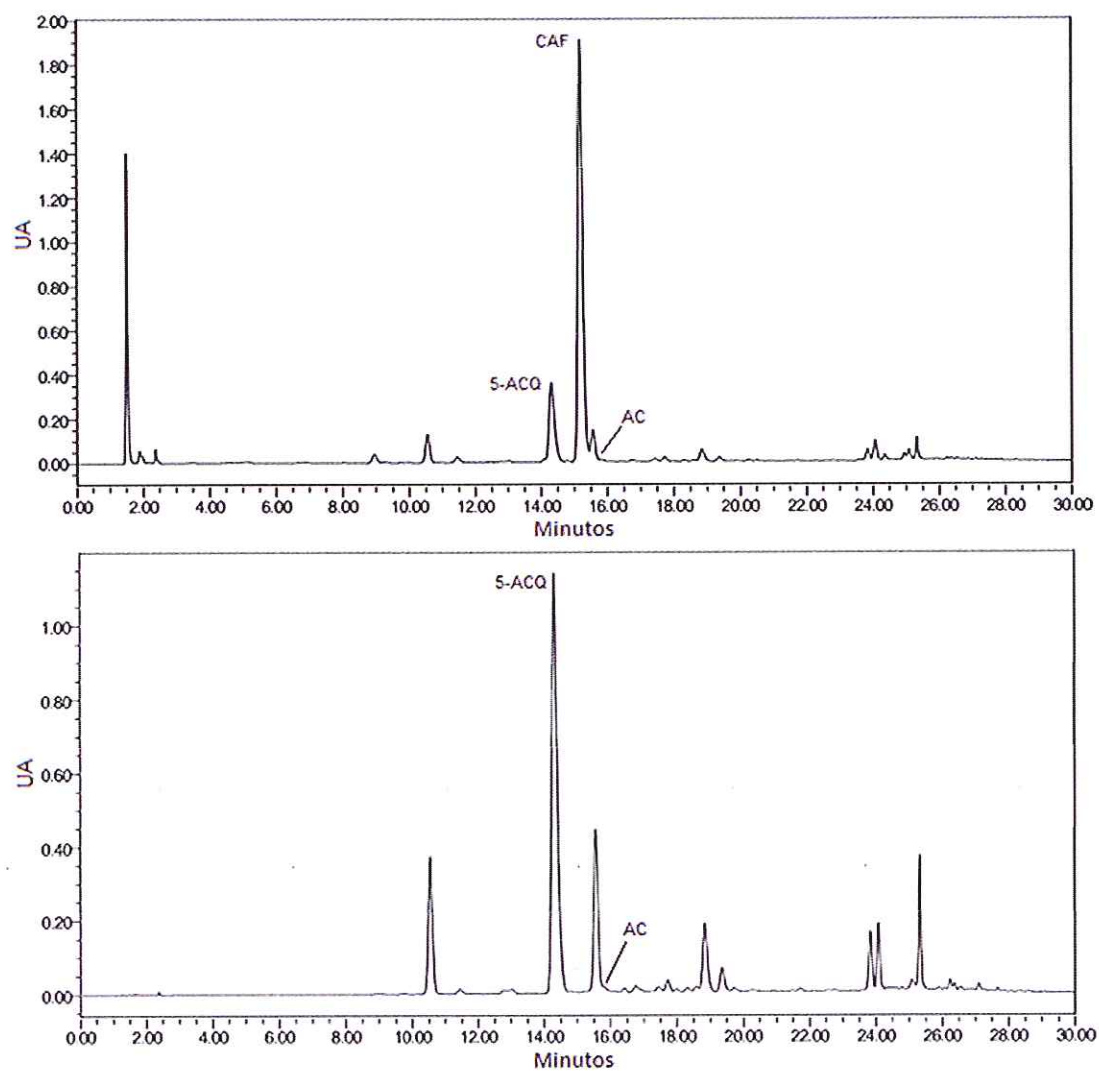
O método cromatográfico desenvolvido no presente estudo para a quantificação de ácido clorogênico, cafeína e ácido cafeico nos extratos possibilitou a separação entre os picos das substâncias de interesse além de apresentar linearidade. Os cromatogramas referentes aos padrões e diferentes extratos estão representados nas figuras 9, 10, 11, 12 e 13.

Figura 9 - Cromatogramas das soluções padrões de ácido clorogênico (5-ACQ), cafeína (CAF) e ácido cafeico (AC) obtidos nos comprimentos de onda de 272 nm (superior) e 330 nm (inferior).



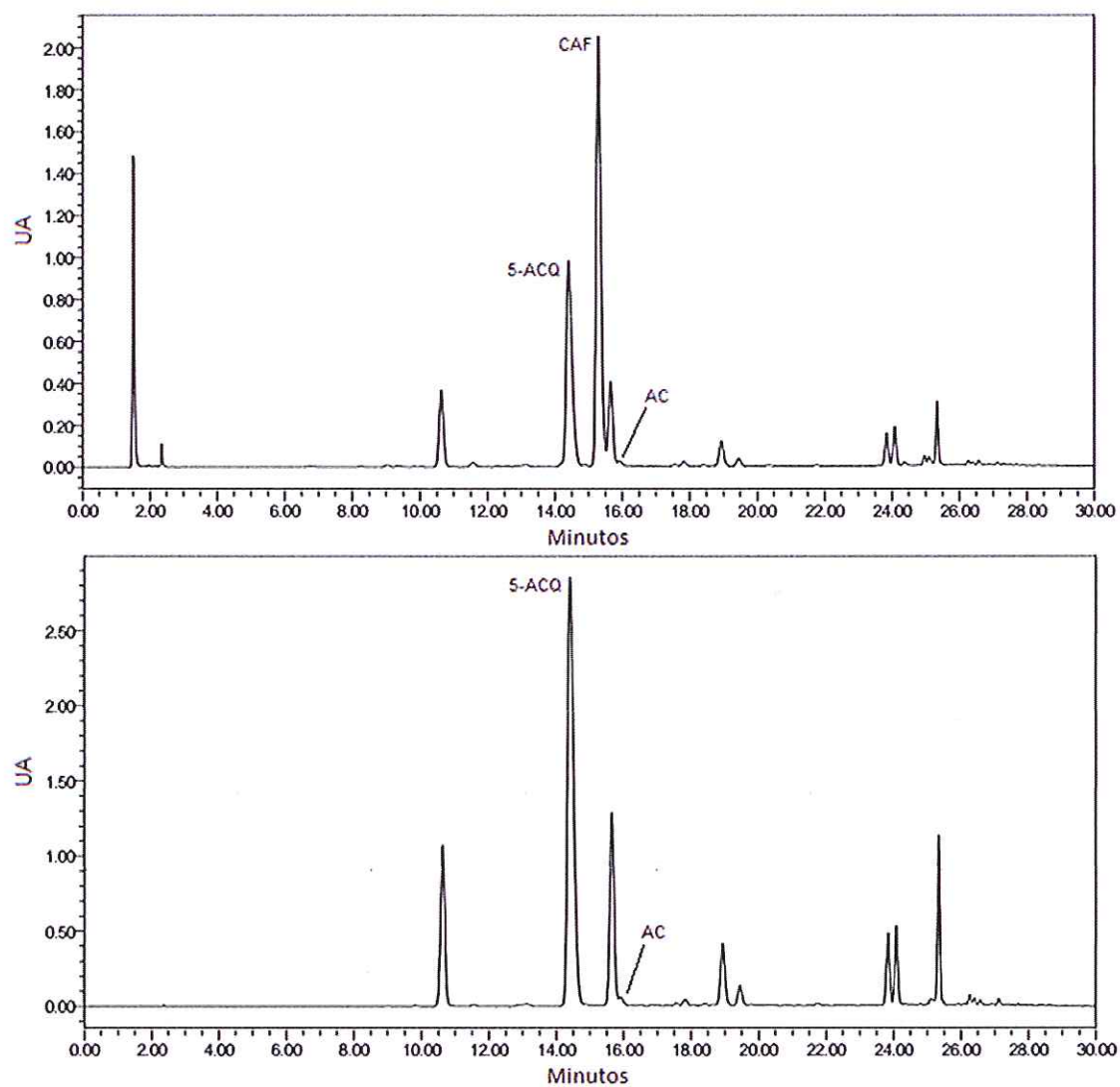
Fonte: O AUTOR, 2017.

Figura 10 - Cromatogramas do extrato de café verde não fermentado obtidos nos comprimentos de onda de 272 nm (superior) e 330 nm (inferior).



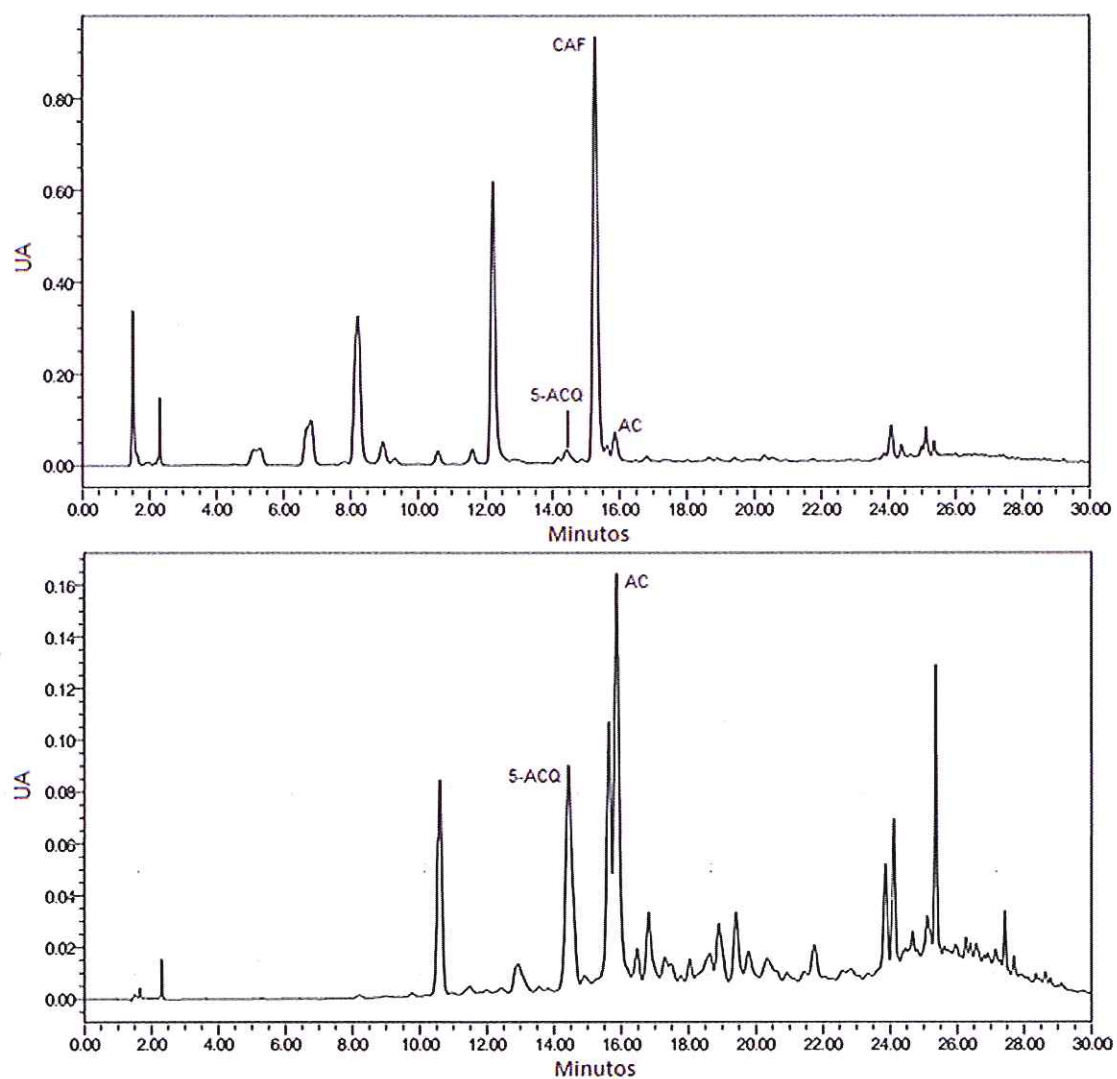
Fonte: O AUTOR, 2017.

FIGURA 11 - Cromatogramas do extrato de café verde fermentado por 24 horas obtidos nos comprimentos de onda de 272 nm (superior) e 330 nm (inferior).



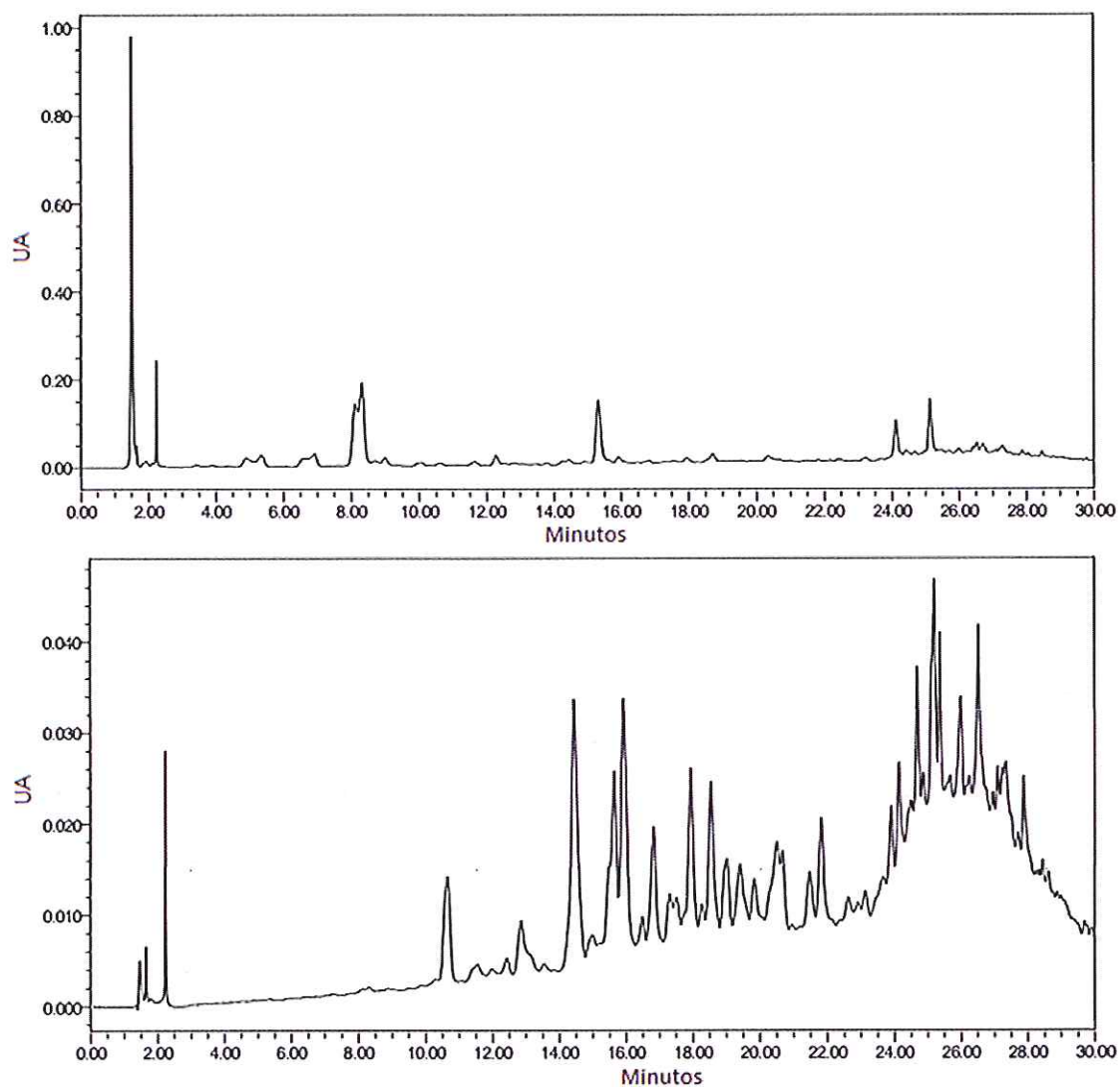
Fonte: O AUTOR, 2017.

Figura 12 - Cromatogramas do extrato de café verde fermentado por 48 horas obtidos nos comprimentos de onda de 272 nm (superior) e 330 nm (inferior).



Fonte: O AUTOR, 2017.

Figura 13 - Cromatogramas de extrato de café verde fermentado por 72 horas obtidos nos comprimentos de onda de 272 nm (superior) e 330 nm (inferior).



Fonte: O AUTOR, 2017.

Os teores de ácido clorogênico, cafeína e ácido cafeico nos diferentes extratos foram calculados considerando-se as curvas de calibração obtidas e os valores estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações de ácido clorogênico (5-ACQ), cafeína e ácido cafeico nos extratos não fermentados e fermentados por 24, 48 e 72 horas

Extrato	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		
	5-ACQ	Cafeína	Ácido cafeico
Controle	75,41 \pm 3,54 ^a	169,51 \pm 14,99 ^a	6,56 \pm 0,07 ^a
24 horas	199,53 \pm 67,35 ^b	181,15 \pm 8,34 ^a	8,21 \pm 0,23 ^b
48 horas	6,30 \pm 3,49 ^c	93,57 \pm 44,26 ^b	19,10 \pm 7,15 ^c
72 horas	0,00 \pm 0,00 ^c	8,27 \pm 4,93 ^c	0,00 \pm 0,00 ^d

Fonte: O AUTOR, 2017.

Nota: Os valores representam a média \pm DP (n=3). Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$, ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey).

Os resultados do presente estudo apresentaram um aumento significativo na concentração de ácido clorogênico (5-ACQ) no extrato de café verde fermentado por 24 horas com relação ao extrato não fermentado. Nos tempos de fermentação de 48 e 72 horas, houve redução drástica na concentração de ACG a ponto de não ser possível detectá-lo no extrato de café verde fermentado por 72 horas.

Os ácidos clorogênicos são compostos formados por ácidos cinâmicos e ácido quínico através de ligações éster e possuem atividade antioxidante e antimicrobiana. A atividade antioxidante dos ácidos clorogênicos ocorre pela remoção de espécies reativas de oxigênio como por exemplo, os radicais peróxido de alquila, além de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade. Os grãos de café verde são a fonte mais rica de ácidos clorogênicos, entretanto esses compostos podem ser encontrados em outras fontes como nas maçãs, batatas, tomates e folhas de erva mate. A concentração de ácidos clorogênicos pode variar de 3,4 a 7,5% do peso seco de grãos de café verde da espécie *Coffea arabica* L. (BAJKO et al., 2016; NIGGEWEG; MICHAEL; MARTIN, 2004).

Não foi observado aumento do teor da cafeína no extrato fermentado por 24 horas, conforme observado com os ácidos clorogênicos. No entanto, nos tempos de fermentação de 48 e 72 horas houve redução significativa nos teores de cafeína.

De forma semelhante ao ocorrido com o ácido clorogênico, a fermentação da farinha de café verde por 24 horas também promoveu aumento nos teores de ácido cafeico dos extratos, sendo superior aos teores encontrados nos extratos não fermentados. No tempo de 48 horas, o aumento de ácido cafeico foi de

aproximadamente três vezes em relação ao café não fermentado. Entretanto, nos tempos de 72 horas foi observada uma grande redução nas concentrações de ácido cafeico dos extratos fermentados.

5 DISCUSSÃO

O conjunto de resultados do presente estudo demonstrou um aumento significativo da atividade antioxidante dos extratos de farinha de café verde fermentados por 24 horas em relação ao extrato de café não fermentado, conforme demonstrado pelos métodos DPPH• e poder redutor. Além disso, o processo de fermentação pelo fungo *A. oryzae* durante 24 horas também promoveu o aumento na concentração de compostos fenólicos.

Diante dos resultados de teores de ácido clorogênico e ácido cafeico obtidos neste trabalho, empregando a técnica de CLAE, foi possível estabelecer uma relação entre o aumento da atividade antioxidante nos extratos biotransformados por 24 horas e o aumento das quantidades desses compostos nestes extratos. Os teores de ácido clorogênico e ácido cafeico foram significativamente aumentados. O teor de ácido clorogênico foi aumentado em aproximadamente três vezes pelo processo fermentativo durante 24 horas em relação ao extrato não biotransformado.

O teor de ácido cafeico foi significativamente aumentado também no tempo de fermentação de 48 horas. Entretanto, neste mesmo tempo, o teor de ácido clorogênico foi significativamente reduzido. Diante disso, foi visto que o aumento do teor de ácido cafeico não foi capaz de compensar a redução do ácido clorogênico quando avaliada a atividade antioxidante dos extratos fermentados por 24 horas, que foi inferior a dos extratos fermentados por 24 horas.

Adicionalmente, as análises de atividade antioxidante das substâncias padrões revelaram que dentre todos os compostos analisados, o ácido cafeico foi o padrão que apresentou a maior atividade antioxidante, portanto, um aumento no teor de ácido cafeico conforme observado teria uma contribuição expressiva para a atividade sequestradora de radicais livres do extrato. O ácido clorogênico, apesar de possuir uma atividade antioxidante menor do que a do ácido cafeico estava presente nos extratos em quantidades muito maiores, o que também sugere uma grande contribuição deste composto na atividade antioxidante.

O mecanismo que possivelmente explicaria o aumento da atividade antioxidante dos extratos de café verde fermentados por 24 horas inicia-se com o crescimento do fungo *A. oryzae* sobre a farinha de café no processo de fermentação em estado sólido utilizando os nutrientes presentes no substrato. A farinha de café verde utilizada no presente estudo possui em sua composição açúcares tais como

sacarose e glicose. O esgotamento destes açúcares ocorre geralmente nas primeiras 24 horas (TORRES-MANCERA et al., 2013).

Com o crescimento das colônias no processo fermentativo há a produção de vários tipos de enzimas. Dentre elas, podemos destacar as β -glicosidases, as ferruloilesterases e as cinamoilesterases que possuem capacidade de liberar os ácidos hidroxicinâmicos que estão ligados a parede celular, aumentando suas frações livres e também degradar compostos já presentes nas formas livres tais como os ácidos clorogênicos, havendo formação dos ácidos cafeico, quínico, ferúlico e isoferúlico (ARELLANO-GONZÁLEZ et al., 2011; GOMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007; RAMÍREZ-VELASCO et al., 2016; TORRES-MANCERA et al., 2013; WATANABE et al., 2016).

Portanto, dois mecanismos paralelos parecem contribuir para o aumento da atividade antioxidante: o aumento da fração livre dos ácidos hidroxicinâmicos pela quebra da ligação dos mesmos com a parede celular vegetal devido a ação de enzimas específicas produzidas pelo fungo e a própria degradação dos ácidos clorogênicos em suas formas livres, gerando metabólitos com maior atividade antioxidante tais como os ácidos cafeico, ferúlico, isoferúlico e vanílico que possuem alta atividade antioxidante (ASTHER et al., 2002; GOMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007).

Sugere-se que o declínio na atividade antioxidante e dos teores de ácido clorogênico e ácido cafeico, observado no presente estudo após as 24 horas do processo fermentativo se deva a contínua degradação dos ácidos hidroxicinâmicos livres para a obtenção de energia. Sendo assim, são degradados os ácidos quínico, cafeico, ferúlico e isoferúlico, com conseqüente formação de ácido protocatecuico, que devido a sua estrutura química possui fraca atividade antioxidante (ANGELO; JORGE, 2007; TORRES-MANCERA et al., 2013).

Os resultados do presente estudo corroboram com outros trabalhos que também verificaram que bioprocessos como a fermentação em estado sólido ou hidrólise enzimática de fontes vegetais ou seus metabólitos, são capazes de liberar os compostos fenólicos em suas formas livres e conseqüentemente melhorar a atividade antioxidante.

Resultados de um estudo no qual foi realizada a fermentação em estado sólido do trigo pelo fungo *Rhizopus oryzae* RCK2012 (1×10^6 esporos/mL) durante três dias a 30 °C mostraram que a atividade antioxidante do extrato foi aumentada

de maneira significativa. Os resultados foram comprovados pelas análises cromatográficas e outros métodos de avaliação de atividade antioxidante, como por exemplo, o ABTS• (BHANJA DEY; KUHAD, 2014).

Em outro trabalho, utilizando diversos microrganismos, dentre eles *A. oryzae*, foi verificado o aumento da atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir do substrato que foi fermentado pelos microrganismos. O substrato utilizado foi o grão de arroz preto utilizado para fazer o koji, alimento típico da culinária japonesa. A quantidade de inóculo utilizado foi de (1×10^6) esporos/mL e o tempo de incubação foi de três dias a 30 °C (LEE; HUNG; CHOU, 2008).

Juan e Chou (2010) também obteve resultados semelhantes quando realizou a fermentação em estado sólido de grãos pretos de soja. O substrato foi incubado durante 18 horas a 40 °C. O microrganismo utilizado foi a bactéria *Bacillus subtilis* BCRC14715 e os testes que demonstraram o aumento da atividade antioxidante foram o DPPH• e o teste de quelatação dos íons Fe^{2+} .

Pesquisadores indianos obtiveram resultados semelhantes de aumento da atividade antioxidante de extratos de soja fermentados por 7 dias. Foi verificado aumento na concentração de ácido cafeico e ácido clorogênico. Esses compostos foram extraídos com metanol e água. Houve um aumento de 76,77% de ácido clorogênico e de 45,66% de ácido cafeico nas amostras extraídas com metanol (SINGH et al., 2010).

Bel-Rhlid et al (2013) demonstraram aumento da concentração do ácido cafeico através da fermentação em estado sólido pelo microrganismo *Lactobacillus johnsonii* de 30 miligramas de extrato de café verde. Este aumento na concentração de ácido cafeico foi testada em diferentes temperaturas e valores de pH. A condição que apresentou melhor resultado foi obtido com temperatura a 37 °C e pH 6.

Em estudo recente, avaliou-se o aumento da atividade antioxidante de extratos de ameixa fermentado em estado sólido por 14 dias, retirando-se amostras no segundo, terceiro, sexto, nono e décimo quarto dia de fermentação. A biotransformação foi feita com a utilização dos microrganismos *Aspergillus niger* ATCC-6275 e *Rhizopus oligosporus* ATCC-22959 inoculando-se 2×10^7 esporos/g de substrato. Houve aumento dos fenólicos totais, dos flavonóides totais e da atividade antioxidante que foi medida pelo teste de DPPH•. Esse aumento nestes três parâmetros foi associado ao aumento da atividade da enzima β -glicosidase produzida pelos fungos que teve seu pico máximo no sexto dia de fermentação.

Esta enzima foi capaz de liberar as moléculas de açúcar que normalmente estão associadas aos polifenóis aumentando assim sua biodisponibilidade e atividade antioxidante (DULF; VODNAR; SOCACIU, 2016).

Ramírez-Velasco et al (2016) também executaram a fermentação em estado sólido com o fungo filamentoso *Aspergillus ochraceus* com o objetivo de liberar ácido cafeico da polpa de café. Neste trabalho, os autores ressaltaram a especificidade das enzimas ferruloilesterase e cinâmoilesterases e destacaram que os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são os principais produtores destes tipos de enzimas e que o *Aspergillus oryzae* produz as ferruloilesterases tipo B e C. Estas enzimas são capazes de hidrolisar ésteres de ácidos hidroxicinâmicos. Os pesquisadores identificaram atividade enzimática máxima após 96 horas de fermentação e foram capazes de hidrolisar 90% do ácido cafeico esterificado presente na polpa de café.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a fermentação da farinha de café verde pelo fungo *Aspergillus oryzae* durante 24 horas mostrou ser uma estratégia promissora para a obtenção de extratos com maior atividade antioxidante quando comparado com a farinha de café não fermentada.

Os resultados de atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir da capacidade desses extratos em doar íons H^+ ao radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•) foram confirmados pelos resultados das análises de avaliação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor e pelo teste dos fenólicos totais. Além disso, foi possível estabelecer uma relação entre o aumento do poder antioxidante dos extratos fermentados por 24 horas com o aumento da concentração de ácido clorogênico (5-ACQ) e de ácido cafeico quantificados por CLAE.

Os resultados deste estudo indicaram o processo de biotransformação como uma estratégia para a obtenção de um extrato enriquecido de compostos antioxidantes em suas formas livres com potencial aplicação nas indústrias alimentícias, de suplementos alimentares e cosmética. É importante ressaltar a importância de estudos empregando a técnica CLAE acoplada a espectrometria de massas para a identificação e quantificação de todos os compostos presentes nos extratos que também poderiam estar contribuindo para o aumento da atividade antioxidante nos extratos fermentados por 24 horas.

É importante a realização de estudos de permeabilidade desses extratos biotransformados para que se possa comprovar o aumento de biodisponibilidade dos compostos presentes de forma que futuramente esses extratos possam ser incorporados em produtos dermatológicos de uso tópico com a finalidade antioxidante, anti-envelhecimento e pós-sol.

REFERÊNCIAS

ABIC (a), ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=80&sid=49&tpl=printerview>>. Acesso em: 15 out. 2016.

ABIC (b), ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?inford=5191&sid=48&tpl=printerview>>. Acesso em: 15 out. 2016.

ABRAHÃO, S. A. **Qualidade da Bebida e Atividade Antioxidante do Café *in vivo* e *in vitro***. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

AGUIAR, Adriano Tosoni da Eira. **Atributos químicos de espécies de café**. 2005. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

AGUIAR, C. L.; PARK, YOUNG KUN. Conversão Da Gínestina E Daidzina Da Soja Por Beta-Glicosidase. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 183–195, 2004.

AJAZUDDIN; SARAF, S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 680–689, 2010.

ALEU, J.; COLLADO, I. G. Biotransformations by *Botrytis* species. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 13, n. 4-6, p. 77–93, 2001.

AMAMO, A. A. Coffee Production and Marketing in Ethiopia. **European Journal of Business and Management**, v. 6, n. 37, p. 109–122, 2014.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ARAUJO, Fabiana Amaral. **Café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes condições de torrefação: caracterização química e avaliação da atividade antioxidante e sensorial**. 2007. Tese (Doutorado em Nutrição Experimental) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

ARELLANO-GONZÁLEZ, M. A. et al. Antioxidant activity of fermented and nonfermented coffee (*Coffea arabica* L.) pulp extracts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 374–378, 2011.

ASTHER, M. et al. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 685–691, 2002.

BAJKO, E. et al. 5- O -Caffeoylquinic acid : A spectroscopic study and biological

screening for antimicrobial activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 471–479, 2016.

BAKURADZE, T. et al. Four-week coffee consumption affects energy intake, satiety regulation, body fat, and protects DNA integrity. **Food Research International**, v. 63, p. 420–427, 2014.

BARBESGAARD, P.; HELDT-HANSEN, H. P.; DIDERICHSEN, B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 569–572, 1992.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation : Physiology of solid medium , its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175–185, 2012.

BEL-RHLID, R. et al. Biotransformation of caffeoyl quinic acids from green coffee extracts by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. **AMB Express**, v. 3, p. 4–10, 2013.

BHANJA DEY, T.; KUHAD, R. C. Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. **Biotechnology Reports**, v. 4, p. 120–127, 2014.

BHANJA, T. et al. Studies on the performance of a new bioreactor for improving antioxidant potential of rice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 1459–1465, 2008.

BHANJA, T.; KUMARI, A.; BANERJEE, R. Enrichment of phenolics and free radical scavenging property of wheat koji prepared with two filamentous fungi. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 11, p. 2861–2866, 2009.

BICHO, N. C. et al. Identification of Chemical Clusters Discriminators of Arabica and Robusta Green Coffee. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 4, p. 895–904, 2013.

BISHT, S.; SISODIA, S. *Coffea arabica* L.: A wonder gift to medical science. **Journal of Natural Pharmaceuticals**, v. 1, n. 1, p. 58, 2010.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determination by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199–1200, 1958.

CAI, S. et al. Comparative Study of the Effects of Solid-State Fermentation with Three Filamentous Fungi on the Total Phenolics Content (TPC), Flavonoids, and Antioxidant Activities of Subfractions from Oats (*Avena sativa* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n.1, p. 507-513, 2012.

CAPORASO, N. et al. Neapolitan coffee brew chemical analysis in comparison to espresso, moka and American brews. **Food Research International**, v. 61, p. 152–160, 2014.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening

of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 491–497, 2005.

CHU, Y. et al. Type 2 diabetes-related bioactivities of coffee: Assessment of antioxidant activity, NF- κ B inhibition, and stimulation of glucose uptake. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 914–920, 2011.

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

DAGLIA, M. et al. Isolation of an antibacterial component from roasted coffee. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 18, p. 219–25, 1998.

DE AZEVEDO, A. B. A. et al. Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 3, p. 543–552, 2008.

OLIVEIRA, Daniela Moura de; BASTOS, Deborah Helena Markowicz. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

DUARTE, G. S.; PEREIRA, A. A.; FARAH, A. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 851–855, 2010.

DULF, F. V.; VODNAR, D. C.; SOCACIU, C. Effects of solid-state fermentation with two filamentous fungi on the total phenolic contents, flavonoids, antioxidant activities and lipid fractions of plum fruit (*Prunus domestica* L.) by-products. **Food Chemistry**, v. 209, p. 27–36, 2016.

DZIKI, D. et al. Ground green coffee beans as a functional food supplement e Preliminary study. **Food Science and Technology** v. 63, p. 691-699, 2015.

EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 106, p. 119-133, 2005.

EMBRAPA. **Produção mundial de café em 2014 foi de 143,2 milhões de sacas e o Brasil já exportou 29,85 milhões de sacas de café neste ano de 2015**, 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/7166323/producao-mundial-de-cafe-em-2014-foi-de-1432-milhoes-de-sacas-e-o-brasil-ja-exportou-2985-milhoes-de-sacas-de-cafe-neste-ano-de-2015>>. Acesso em: 23 jan. 2016.

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

FARAH, A. et al. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 12, p. 2309-2315, 2008.

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

FARRIS, P. Idebenone , green tea , and Coffeeberry ® extract : new and innovative antioxidants. **Dermatologic Therapy**, v. 20, n. 13, p. 322–329, 2007.

FERREIRA, L. R. et al. Improving the chemopreventive potential of orange juice by enzymatic biotransformation. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 526–535, 2013.

FLANAGAN, J. et al. Lipolytic Activity of Svetol ® , a Decaffeinated Green Coffee Bean Extract. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. december 2013, p. 946–948, 2014.

FORINO, M. et al. (1 S , 3 R , 4 S , 5 R) 5-O-Caffeoylquinic acid : Isolation , stereo-structure characterization and biological activity. **Food Chemistry**, v. 178, p. 306–310, 2015.

GEORGETTI, S. R. et al. Enhanced *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and mobilization of free phenolic compounds of soybean flour fermented with different beta-glucosidase-producing fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 459–466, 2009.

GOMEZ-RUIZ, J. A.; LEAKE, D. S.; AMES, J. M. *In vitro* antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 6962–6969, 2007.

GULCIN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, n. 2-3, p. 213–220, 2006.

HAMDOUCHE, Y. et al. Discrimination of post-harvest coffee processing methods by microbial ecology analyses. **Food Control**, v. 65, p. 112–120, 2016.

HAMZA, M.; KHOUFI, S.; SAYADI, S. Fungal enzymes as a powerful tool to release antioxidants from olive mill wastewater. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1430–1436, 2012.

HANDA, C. L. et al. Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. **Food Chemistry**, v. 197, p. 175–184, 2016.

HANSON, J. R. **An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry**. Nova York: W.H. Freeman, 1995.

HENRIQUE, M. et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604–610, 2007.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175–186, 2004.

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

HUANG, Y. et al. Protective effects of caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester against acrolein-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. **Neuroscience Letters**, v. 535, p. 146–151, 2013.

IVOMOTO, S. et al. Nucleotide diversity of genes related to chlorogenic acid biosynthesis of *Coffea*. **Coffee Science**, v. 8, p. 148–156, 2013.

IWAI, K. et al. *In vitro* antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4893–4898, 2004.

JIN, U. H. et al. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. **Life Sciences**, 2005.

JUAN, M.; CHOU, C. Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715. **Food Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 586–591, 2010.

KAYA, M. et al. Isoflavone aglycones production from isoflavone glycosides by display of β -glucosidase from *Aspergillus oryzae* on yeast cell surface. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 1, p. 51–60, 2008.

KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems — An Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1–30, 2005.

KOSHIRO, Y. et al. Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* plants. **Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 62, n. 9-10, p. 731–742, 2007.

KWON, D.-J. et al. Assessment of green coffee bean metabolites dependent on coffee quality using a ¹H NMR-based metabolomics approach. **Food Research International**, v. 67, n. 2015, p. 175–182, 2015.

KY, C.-L. et al. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry**, v. 75, n. 2, p. 223–230, 2001.

LAGO, R. C. A.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. C. Composição centesimal e de aminoácidos de café verde, torrado e de borra de café solúvel. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001. **Anais...** Local, [s.n.], 2001. p. 1473–1478.

LEE, I. H.; HUNG, Y. H.; CHOU, C. C. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 150–156, 2008.

- LI, S. et al. Analysis of the hydrolytic capacities of *Aspergillus oryzae* proteases on soybean protein using artificial neural networks. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 40, n. 2015, p. 918–924, 2016.
- LIMA, A.R.; PEREIRA, R.G.F.A.; ABRAHAO, A.S.; DUARTE, S.M.S.; PAULA, F.B.A. Compostos bioativos do café: Atividade antioxidante *in vitro* do café verde e torrado. **Química Nova**, v. 33, p. 20-24, 2010.
- MACHADO, E. M. S. et al. Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, n. 0, p. 87–90, 2012.
- MACHIDA, M. et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1157–1161, 2005.
- MADEIRA JUNIOR, J. V.; TEIXEIRA, C. B.; MACEDO, G. A. Biotransformation and bioconversion of phenolic compounds obtainment: an overview. **Critical reviews in biotechnology**, v. 8551, n. January, p. 1–7, 2013.
- MANACH, C. et al. Polyphenols: Food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.
- MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365–373, 2011.
- MATSUDA, S. et al. Solubilization of a Novel Isoflavone Glycoside-Hydrolyzing - Glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp *raamnosus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 439–441, 1994.
- MAZZAFERA, P. Trigonelline in Coffee. **Phytochemistry**, v. 30, n. 7, p. 2309–2310, 1991.
- MIENDA, B. S.; IDI, A.; UMAR, A. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - An overview. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 21–26, 2011.
- MILLER, N. J.; RUIZ-LARREA, M. B. Flavonoids and other plant phenols in the diet: Their significance as antioxidants. **Journal of Nutritional & Environmental Medicine**, v. 12, n. 1, p. 39–51, 2002.
- MUSSATTO, S. I. et al. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 5, p. 661–672, 2011.
- NARITA, Y.; INOUE, K. Review on utilization and composition of coffee silverskin. **Food Research International**, v. 61, p. 16–22, 2014.
- NIGGEWEG, R.; MICHAEL, A. J.; MARTIN, C. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 6, p.

746–754, 2004.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 1, p. 66–71, 2001.

ONOZAWA, M. et al. Effects of Soybean Isoflavones on Cell Growth and Apoptosis of the Human Prostatic Cancer Cell Line LNCaP. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 6, p. 360–363, 1998.

OYAIZU, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. **Japanese Journal of Nutrition**. v. 44, p. 307–315, 1986.

PABLOS, F.; GONZA, A. G. Discrimination between arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. **Talanta**, v. 46, p. 1259–1264, 1998.

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

RAMIREZ, L. et al. A new microplate screening method for the simultaneous activity quantification of feruloyl esterases, tannases, and chlorogenate esterases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 2-3, p. 711–723, 2008.

RAMÍREZ-VELASCO, L. et al. Liberation of caffeic acid from coffee pulp using an extract with chlorogenate esterase activity of *Aspergillus ochraceus* produced by solid state fermentation. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 15, n. 2, p. 503–512, 2016.

ROSSANA, LADY et al. Enhanced extraction of phenolic compounds from coffee industry 's residues through solid state fermentation by *Penicillium purpurogenum*. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 704–711, 2015.

SACCHETTI, G. et al. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 1, p. 74–80, 2009.

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

SANTOS, A.; CHALFOUN, M.; JOS, C. Influência do processamento sobre a composição , físico química e química do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 213–218, 2009.

SINGH, H. B. et al. Bioresource Technology Solid-state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soybean seed matrix. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6444–6453, 2010.

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

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1 jan. 1965.

STENNERT, A.; MAIER, H. G. Trigonelline in coffee. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v 202, n. 1 p. 45–47, 1996.

ŠVORC, L. Determination of caffeine: A comprehensive review on electrochemical methods. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, n. 4, p. 5755–5773, 2013.

TENKANEN, M. et al. Production, purification and characterization of an esterase liberating phenolic acids from lignocellulosics. **Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 1-2, p. 69–83, 1991.

TORRES-MANCERA, M. T. et al. Biotransformation and improved enzymatic extraction of chlorogenic acid from coffee pulp by filamentous fungi. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 2, p. 337–345, 2013.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. **Food Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 219–227, 1984.

Vincent J-C. Green Coffee Processing. In: R. J. Clarke; R. Macrae. **Coffee Technology**. Houten: Springer Netherlands, 1987. Capítulo 1, p. 1-33, 1987.

WATANABE, A. et al. Purification and enzymatic characterization of a novel β -1, 6-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 3, p. 259–264, 2016.

ZHANG, H. et al. Bioactive secondary metabolites from the endophytic *Aspergillus* genus. **Records of Natural Products**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2015.

YANG, X.-W. et al. Biotransformation of 4,5-O-dicaffeoylquinic acid methyl ester by human intestinal flora and evaluation on their inhibition of NO production and antioxidant activity of the products. **Food and chemical toxicology** : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, v. 55, n. January, p. 297–303, 2013.