1. INTRODUÇÃO

Desde 2000, quando foi lançado no mercado, o consumo de café *espresso* em cápsulas vem crescendo e já ultrapassa 20 bilhões de unidades, movimentando em torno de 17 bilhões de dólares por ano só na Europa (GETTY, 2010). Esse aumento tem como consequência a geração de grande quantidade de borra, fazendo-se necessário o estudo de processos tecnológicos que agreguem valor ao resíduo proporcionando oportunidades de reaproveitamento do mesmo.

A fração lipídica da borra de café *espresso* pode vir a ser um produto de interesse das indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. O óleo de café apresenta um perfil de voláteis representativo do *flavor* do grão com propriedades benéficas geralmente associadas, como atividade antioxidante e proteção em relação à radiação UV. (ARRUDA, et al., 2012).

O processo convencional de obtenção de óleos vegetais é realizado por prensagem da matéria-prima seguida, em geral, da extração com hexano. Este solvente é inflamável e mais denso que o ar, colocando em risco os empregados e comunidades próximas à fábrica (FREITAS, 2007).

Para cada tonelada de grão processado, cerca de 2 litros de solvente são perdidos para o meio ambiente. Por esta razão, o processo de extração de óleos vegetais é considerado pelos órgãos de proteção ambiental como um dos maiores responsáveis pela emissão de gases do efeito estufa (SCHWARZBACH, 1997). A busca de alternativas para substituição de solventes de origem fóssil na extração de óleos vegetais tem como meta reduzir a dependência tecnológica em relação aos derivados de petróleo, além da preservação do meio ambiente e do homem. O uso do álcool etílico para substituir o hexano apresenta boas perspectivas, uma vez que o etanol pode ser obtido a partir de diferentes fontes renováveis, a preços competitivos (FREITAS, 2000).

O óleo de café torrado é um produto que possui alto valor agregado como aromatizante natural, para as indústrias de doces, biscoitos, bombons, café instantâneo, café gelado, sorvetes, sobremesas, café *capuccino*, pudins, e produtos à base de leite, dado ao seu aroma pronunciado e agradável. Na indústria de café solúvel, o óleo de café torrado é incorporado como realçador de sabor (KOCH et al., 1994)

Na indústria de cosméticos, o óleo de café é aplicado na formulação de produtos onde se deseja principalmente, (i) bloquear as radiações UV nocivas a pele, (ii) hidratar, lubrificar e melhorar a textura da pele, além de promover a regeneração da camada hidrolipídica da mesma (GROLLIER e PLESSIS, 1988; CONNOCK, 1999).

O presente trabalho visou caracterizar o óleo extraído com etanol a partir da borra de café *espresso* comercializado em cápsulas. Para este fim foram avaliados o perfil de voláteis por Headspace – Microextração em fase sólida – Cromatografia gasosa – Espectrometria de massas (*HS*-MEFS-CG-EM), a atividade antioxidante e o fator de proteção solar (FPS).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Caracterizar, quanto à funcionalidade, o extrato etanólico da borra de café *espresso* de diferentes origens, comercializado em cápsulas.

Objetivos específicos*:*

- Obter o extrato com etanol anidro, a partir da borra desidratada;
- Avaliar o perfil de voláteis por microextração em fase sólida, seguida de separação cromatográfica em fase gasosa, acoplada ao espectrômetro de massas *(HS*-MEFS-CG-EM);
- Comparar os resultados das diferentes amostras usando o método estatístico por análise de componentes principais.
- Determinar a capacidade antioxidante por meio do acompanhamento espectrofotométrico de estabilização do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH• .);
- Determinar o fator de proteção solar (FPS) por meio da absorção na região ultravioleta (UV).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Café

O café é uma das bebidas mais populares e consumidas em todo o mundo. Na natureza, existem algumas espécies do gênero *Coffea,* dentre elas, *Coffea canephora* ou “Café Robusta” e *Coffea arabica* ou “Café Arábica” são as espécies de maior valor comercial, chegando a 75% da produção total (WINTGENS, 2009). O café arábica é considerado de melhor qualidade devido a presença de substâncias características do *flavor* que são produzidas durante a torra do grão a partir, principalmente, de açúcares e proteínas, que conferem propriedades organolépticas agradáveis à bebida (BERTRAND *et al.,* 2003). Já a variedade robusta possui um valor comercial menor e é muito utilizado na indústria para a produção de café solúvel, por possuir maior teor de sólidos solúveis (CLARKE e VITZHUM, 2001).

O grão de café cru é composto por mais de 2000 substâncias divididas em diferentes classes. Boa parte das substâncias características do aroma da bebida do café é formada durante o processo de torra do grão pelas “Reações de Maillard” e “Degradação de Strecker” (ALVES et al., 2009; HECIMOVIC *et al*, 2011). A tabela 1 apresenta a composição química dos cafés robusta e arábica.

Tabela 1: Composição química do grão cru de cafés arábica e robusta (% em base seca)

Composição	Robusta	Arábica
Cafeína	1,6 - 2,4	0,90 - 1,2
Lipídios	9,0 - 13	12 – 18
Ácidos clorogênicos	7,0 - 10	5,5 - 8,0
Oligossacarídeos	5,0 - 7,0	6,0 - 8,0
Polissacarídeos	37 – 57	50 – 55
Aminoácidos	2,0	2,0
Proteínas	11 - 13	11 – 13
Minerais	4,0 - 4,5	3,0 - 4,2

Fonte: Cortez, (2001)

Segundo a *International Coffee Organization* (ICO), foram produzidas 7 milhões de toneladas de grãos de café em 2011 (ICO, 2012). O Brasil é o maior produtor de café, sendo responsável por 32,4% da produção mundial. Além de maior produtor, o Brasil é o segundo maior consumidor, sendo superado pelos Estados Unidos. Quando calculado o consumo *per capita*, alguns países como Dinamarca, Finlândia e Noruega também ultrapassam o Brasil, chegando a um consumo anual de aproximadamente 13 kg de café/habitante. Entretanto, o consumo do café no Brasil é crescente nas últimas décadas, como mostra a série histórica ilustrada na figura 1 (ABIC, 2012).

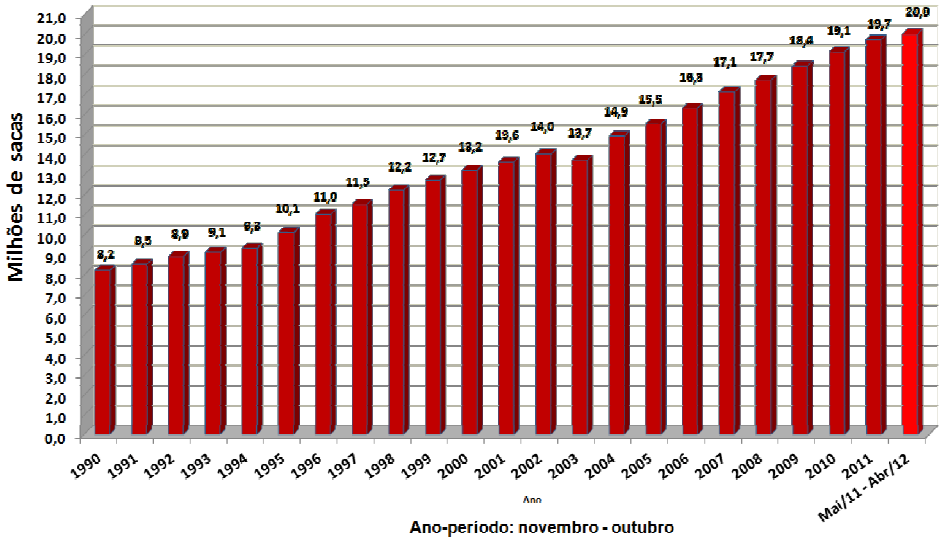

Figura 1 – Consumo de café no Brasil nos últimos 20 anos.

Fonte: ABIC (2012)

O aumento do consumo interno foi de 5,34 % de 2011 para 2012. Segundo a Associação Brasileira da Indústria do Café (ABIC), o aumento no consumo observado nos últimos anos deve-se, principalmente ao crescimento do consumo fora do lar, à entrada no mercado de novos produtos inovadores e a melhoria da qualidade, com a ampliação da oferta de produtos diferenciados (ABIC, 2012). O café *espresso* é uma bebida que se enquadra neste novo perfil do consumidor brasileiro, que procura produtos de qualidade e pode pagar um preço maior por isso, devido à situação econômica favorável do país.

3.2. Aproveitamento de resíduos da agroindústria

Ao longo dos últimos anos muitos esforços têm sido feitos para a valorização dos resíduos e coprodutos agroindustriais, através de processos que transformam estes rejeitos em novos produtos com alto valor agregado (MAKRIS *et al.,* 2007).

Entretanto, no Brasil, ainda existem poucas iniciativas para a utilização em grande escala da maior parte dos resíduos agroindustriais. Considerando os impactos negativos no meio ambiente, que tem contribuído para o aumento nos problemas de saúde ocupacional, associados à degradação do ar, água e vegetação, é imperativo que se concentre esforços para desenvolver soluções concretas para o uso de resíduos com potencial para contribuir na oferta de novos produtos de alto valor agregado.

Existem hoje alguns grupos de pesquisa dedicados a produzir conhecimento e tecnologia para aproveitamento de resíduos da agroindústria, através de metodologias mais limpas, gerando materiais com propriedades nutracêuticas, funcionais e bioativas (atividades antioxidante, antimicrobiana, antialergênica, antiaterogênica, anti-inflamatória, antitrombótica ou efeitos cardioprotetores ou vasodilatadoras) (MELLO, 2006; CRUZ et al., 2011; PAGE et al., 2012; SILVA, et al., 2012).

O resíduo da indústria de vinho e suco de uva, por exemplo, é rico em polifenóis que apresentam potencial antioxidante, auxiliando os organismos vivos no combate aos radicais livres e ao stress oxidativo (SPIGNO *et al.,* 2007). Usando etanol e metanol como solventes, Casazza *et al*. (2010) compararam a extração de compostos fenólicos da semente e casca de uva com 4 diferentes técnicas: extração em *shaker*, extração em microondas, extração em ultrassom e extração em reator com controle de pressão (200 bar) e temperatura (350 ºC). Os compostos fenólicos foram medidos quali e quantitativamente por métodos absorciométricos e cromatográficos. O extrato etanólico apresentou maior capacidade antioxidante de 14,6 ± 0,4 e 1,1 ± 0,3 $\mu L_{extrato}/\mu g_{DPPH}$. para a semente e casca de uva, respectivamente.

Um dos resíduos de biomassa mais pesquisados atualmente no Brasil é o bagaço da cana de açúcar, gerado em grandes quantidades pelo setor sucroalcooleiro. Dantas Filho (2009) mostrou que o bagaço é um produto viável técnica e economicamente na geração de energia elétrica e concluiu que alguns custos envolvidos no processo tendem a cair com a curva de aprendizado e o aumento da escala de produção. Estudos recentes de viabilidade técnica e econômica constataram a potencialidade desta biomassa lignocelulósica para produção do etanol de segunda geração (ADEN & FAUS, 2009; SASSNERS, GALBI & ZACCHI, 2008; LYND *et al.,*2005). Segundo Gnansounou e Dariat (2010) o etanol de segunda geração será comercializado nas próximas décadas, a preços competitivos, como energia renovável para transporte e ressalta que o bagaço de cana, principal resíduo da produção de etanol convencional no Brasil é a biomassa mais promissora. Este fato coloca o país em uma posição de destaque na produção de bioetanol.

O etanol, além de apresentar a vantagem de ser um solvente obtido a partir de fontes renováveis e ser menos tóxico que os solventes derivados de fontes fósseis, já é produzido no Brasil em grande escala, com potencial para ampliar sua oferta nas próximas décadas. A extração do óleo de café com álcool etílico é mais recomendada dos pontos de vista ambiental e da saúde ocupacional, e poderá ser muito vantajosa, pois seu caráter mais polar que o hexano (solvente mais utilizado na indústria de óleos) permite carrear substâncias características do flavor, compostos fenólicos, que são os maiores responsáveis pelo potencial antioxidante do café, e diterpenos como caveol e cafestol, que são associados à proteção contra raios UV (KOHL *et al.,* 2003).

3.3. Borra de café

A bebida do café é preparada com água quente e, quando se trata de café *espresso*, utiliza-se pressão (entre 10 e 20 bar) para favorecer a extração de compostos que contribuem para uma maior qualidade sensorial da bebida. O material insolúvel resultante da extração da bebida do café a quente é chamado borra de café. A borra é um resíduo que ainda não possui valor comercial e usualmente é descartado. Nos últimos anos, a necessidade de mitigação de

resíduos e proteção ambiental tem estimulado pesquisas que visam o uso da borra como fonte de novos compostos de interesse industrial (ZUORRO e LAVECCHIA, 2012).

As principais fontes de borra de café são as cafeterias comerciais que utilizam majoritariamente o café do tipo arábica para o preparo do café *espresso* e a indústria de café solúvel, que por sua vez faz maior uso do café robusta e é responsável por quase 50% da geração total de borra de café em todo o mundo (RAMALAKSHMI *et al.,* 2009; PANUSA *et al.,* 2013). Em média, para cada tonelada de café verde obtém-se cerca de 550 kg da borra. O café solúvel possui apenas 0,1% de lipídios, em base seca, enquanto a borra possui cerca de 20% (VEGRO e CARVALHO, 2006; FREITAS, 2000).

A Tabela 2 ilustra as faixas de composição centesimal da borra de café a partir dos trabalhos publicados por Ravindranath *et al*. (1972), Adams e Dougan (1985), Lago (2001) e Azevedo (2007).

Tabela 2 – Composição da borra de café

Substância	**(% em base seca)**
Proteína	10,7 – 19,9
Lipídio	7,90 – 27,0
Carboidrato	5,70
Cinzas	0,490
Fibra	14,0 – 44,0

Fontes: Ravindranath *et al*. (1972), Adams e Dougan (1985), Lago (2001) e Azevedo (2007)

Cada vez mais a aplicabilidade da borra de café desperta interesse socioeconômico de diversas áreas. Laranja (2001) sugeriu a utilização da borra de café como alternativa aos inseticidas tradicionais, pois altas concentrações de cafeína prejudicam o desenvolvimento, aumentam a taxa de mortalidade e diminuem a longevidade do mosquito *Aedes aegypti* (transmissor da dengue e febre amarela). Já Utomo e Hunter, (2006) aplicaram a borra de café na remoção de íons metálicos como Cd^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+} e Cu^{2+} em amostras de águas contaminadas. Em um estudo

mais recente, Leite *et al*. (2011) verificaram que o produto final da compostagem da borra de café fornece ao solo uma variedade nutricional que pode ser útil na agricultura.

Outra vertente crescente é o reaproveitamento para obtenção de compostos com potencial bioativo, onde o resíduo é tratado ainda como um produto natural capaz de fornecer substâncias de interesses diversos. O café é rico em ácidos clorogênicos e compostos fenólicos que apresentam alta capacidade antioxidante *in vitro*. A presença destes compostos, que apresentam efeitos benéficos para a saúde, torna a borra de café uma potencial fonte de antioxidantes naturais e tem motivado diversas pesquisas (YEN *et al.,* 2005; FARAH e DONANGELO, 2006; BREZOVÁ *et al.,* 2009; DAÍ e MUMPER, 2010; ESQUIVEL e JIMÉNEZ, 2012).

Em uma interessante discussão sobre o uso da borra de café como combustível para caldeiras na indústria de café solúvel no Brasil, Silva *et al.* (1998) concluíram que este resíduo é um excelente combustível, pois possui um calor de combustão maior que outros tipos de biomassa utilizados para a mesma finalidade. Estudos e ações que aperfeiçoem algumas etapas limitantes como a secagem e estocagem da borra e que, adicionalmente, possam fornecer as principais características físicas das partículas, como diâmetro, esfericidade, área superficial e temperatura de ignição espontânea, poderá tornar a indústria de café solúvel autosuficiente em energia térmica.

O reaproveitamento da borra de café para fins energéticos é um bom exemplo do potencial para a indústria química e indústrias afins colaborarem com os princípios da Química Verde. Considerando que a borra de café contém substâncias funcionais, tanto do ponto de vista organoléptico quanto do ponto de vista bioativo, a iniciativa de estudos mais específicos que confirmem e quantifiquem a presença desses compostos podem agregar valor ao resíduo, justificando aplicações mais nobres na formulação de alimentos, cosméticos e fármacos.

3.4. Processo de extração com solvente

O processo de extração industrial utilizando solventes (geralmente hexano) é realizado em fluxo contra-corrente cruzado em múltiplos estágios de extração, promovendo uma remoção máxima do soluto (lixiviação). Nesta forma de operação,

o potencial médio de transferência de massa é maximizado. Quando a extração é conduzida em batelada simples, o transporte de massa é limitado pela solubilidade do soluto no solvente extrator, nas condições termodinâmicas selecionadas (T, P).

3.5. Óleo de café

O óleo de café já é usualmente utilizado como aromatizante na formulação de alimentos e cosméticos. O óleo de café verde é rico em matéria insaponificável e os componentes presentes nessa fração, principalmente os esteróis, possuem propriedades cosméticas de interesse industrial tais como: retenção de umidade, absorção pela pele, aderência, entre outras. O óleo de café torrado, que pode ser obtido por prensagem dos grãos torrados ou por meio da extração com solvente a partir da borra de café solúvel previamente seca, tem sua utilização direcionada a produtos alimentícios, como recheios de balas ou como realçador do sabor. Pode ser utilizado também para melhorar as características sensoriais do café solúvel, na fabricação de café gelado, café enlatado, cappuccinos, pudins, produtos lácteos, produtos de confeitaria, sobremesas e sorvetes (FERRARI *et al.,* 2010).

Os lipídios são componentes importantes da bebida e do aroma do café Estes, durante a torra, formam uma camada protetora na superfície do grão que reduz a perda de compostos de aroma por volatilização (CLIFFORD e WILSON, 1985). Todo óleo graxo é composto majoritariamente por triglicerídeos, substância composta de uma molécula de glicerina e três moléculas de ácidos graxos cujo comprimento da cadeia carbônica e o grau de insaturação determinam suas propriedades físicas e químicas (OLIVEIRA, 2003).

Os ácidos graxos mais abundantes nas sementes oleaginosas são: ácido láurico (12:0), ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1), ácido linoleico (18:2), ácido linolênico (18:3) e ácido erúcico (22:1). Os principais componentes dos ácidos graxos descritos por Folstar (1985) para óleo de *C. arabica* foram: ácido mirístico (0,2 %) ácido palmítico (35,2 a 36,7 %), ácido esteárico (7,2 a 9,7 %), ácido oleico (9,5 a 11,9 %), ácido linoleico (41,2 a 42,6 %), ácido linolênico (1,3 a 2,7%) e ácido araquidônico (0,3 a 1,5 %). Estes números estão em concordância com os resultados de Kaufmann e Hamsagar

(1962), que também encontraram o ácido palmítico e o ácido linoléico como principais ácidos graxos de *C. arabica*.

Arruda *et al*, (2009) avaliaram a composição em ácidos graxos, o teor de fenólicos totais, a atividade antioxidante, o fator de proteção solar e o perfil de voláteis (*HS*-MEFS-CG-EM) em extratos etanólicos de cafés torrados. Os grãos foram colhidos em diferentes estádios de maturação (verde, cereja e bóia). Não foram observadas diferenças significativas na composição em ácidos graxos entre os óleos obtidos a partir dos diferentes estádios de maturação dos frutos. Entretanto, o café verde apresentou o menor teor de compostos fenólicos, quando comparado aos cafés cereja e bóia, tendo sido observada forte correlação com a atividade antioxidante. Os diterpenos caveol e cafestol também foram maiores para os cafés cereja e bóia, indicando uma correlação com o fator de proteção solar.

As principais classes de substâncias presentes no aroma do óleo do café, e já reportadas na literatura, são aldeídos, cetonas, furanos, piridinas, pirazinas, fenólicos, pirróis, indóis, lactonas e ésteres. A maioria desses compostos é conhecida como produtos da reação entre aminoácidos e açúcares (Reação de Maillard), da degradação de açúcares e lipídeos (Degradação de Strecker), bem como das interações entre intermediários de degradação. Outros compostos que não são formados pelas reações supracitadas, surgem a partir de substâncias menos voláteis presentes no grão do café como ácido caféico, ácido quínico e os ácidos clorogênicos (MASON, *et al.,* 1955; ILLY *&* VIANI, 1995; MAYER, 2000; MOON e SHIBAMOTO, 2010). Pela complexidade e riqueza da fração volátil do óleo, torna-se viável estudar sua aplicação para finalidades nobres na indústria alimentícia, como fator emulsificante ou aromatizante em formulações específicas.

3.6. Micro extração em fase sólida (MEFS)

As técnicas de isolamento de compostos voláteis devem ser econômicas, rápidas, apresentar baixa discriminação quanto à volatilidade e função química das substâncias presentes, não promover alteração das estruturas químicas, reduzir o uso de solventes, em consonância com o avanço do enquadramento das metodologias analíticas nos princípios da química verde, minimizar manipulação da matriz, etc. A partir destes pré-requisitos, a técnica de micro-extração em fase sólida

com amostragem no *Headspace* (SPME, sigla em inglês) vem sendo utilizada intensivamente e se mostrou vantajosa se comparada à técnicas mais clássicas como a extração por destilações simultâneas (SDE, sigla em inglês), *Headspace* e *Headspace* com injeção a frio na entrada da coluna (cold on-column injection, em inglês) (ELMORE, ERBAHADIR, & MOTTRAM, 1997; JELEN, WLAZLY, WASOWICZ, e KAMINSKI, 1998; PENTON, 1997; STEVENSON e CHEN, 1996; XIAOGEN e PEPPARD, 1994, CAPRIOLI et al., 2012).

A MEFS é uma técnica de extração e pré-concentração de analitos que prescinde o uso de solventes, pois nela utiliza-se uma seringa com um bastão fino (geralmente de sílica fundida) cuja extremidade é recoberta por um filme polimérico que funciona como adsorvente (há partição e adsorção) para as substâncias volatilizadas da matriz, para o *Headspace.* Este sistema de captura dos voláteis deve ser realizado em vaso hermeticamente fechado para evitar perda de massa. A MEFS é um processo baseado em equilíbrios simultâneos entre matriz-*Headspace*, *Headspace*-adsorvente, *Headspace*-parede do frasco, interação dos analitos entre si e, eventualmente, *Headspace*-bastão usado como suporte para a fibra adsorvente. Neste caso, define-se como *Headspace* as substâncias em fase gasosa em equilíbrio com a matriz nas fases líquida ou sólida.

Existem diferentes tipos de materiais disponíveis comercialmente para a captura dos voláteis por MEFS, como o polidimetilsiloxano (PDMS), um recobrimento líquido e a poliacrilamida, um sólido cristalino que se torna líquido a temperaturas mais altas. Ambos extraem os analitos por partição. Outros recobrimentos, PDMS/Carboxen (CAR), PDMS/divinil–benzeno (DVB), Carbowax–DVB são chamados de fibras mistas, onde a captura dos voláteis ocorre predominantemente por adsorção. Independentemente da natureza do recobrimento, os analitos inicialmente aderem à superfície; migram para o interior da fase estacionária ou permanecem na superfície, dependendo do coeficiente de difusão das moléculas na fase utilizada. Os coeficientes de difusão das moléculas orgânicas em PDMS são semelhantes aos estabelecidos nos solventes líquidos, o que torna a extração mais rápida. Entretanto, a extração feita por polímeros porosos é baseada em forças moleculares mais fracas.

A quantidade de sítios superficiais de sorção é limitada e quando a ocupação se completa não há possibilidade de reter mais analitos. Este comportamento normalmente provoca a redução da faixa linear de concentração. Além disso, enquanto a absorção é um processo não competitivo, a adsorção é, por definição, competitiva, e a molécula com maior afinidade pode substituir outra de menor afinidade. A quantidade de analitos extraída é mais afetada pela composição da matriz quando predominam os fenômenos de adsorção se comparado aos fenômenos de absorção (PAWLISZYN *et al.,* 1999).

A MEFS quando aplicada diretamente do *headspace* (*HS*–MEFS), o equilíbrio ocorre entre a fase gasosa acima da amostra, que pode ser líquida ou sólida, e o material utilizado na seringa para captura dos compostos. O processo é bem rápido, pois a difusão dos analitos na fase vapor é muito maior que a difusão em solução (ZHANG e PAWLINZING, 1993).

De fato, *HS*–MEFS reduz bastante o tempo de extração até poucos minutos, sem perda de sensibilidade, mesmo para compostos com altos pontos de ebulição. Quando se trabalha com matriz sólida, a etapa limitante do processo é a difusão dos analitos no sólido, que é cerca de três ordens de grandeza menor que na fase líquida, tornando o tempo de formação do *Headspace* maior. Neste caso, a redução da massa de amostra e o aumento da temperatura melhoram a eficiência do sistema (KOLB e ETTRE, 1997).

Com a separação dos analitos capturados por MEFS realizada por cromatografia em fase gasosa (CG) acoplada ao detector espectrômetro de massas (EM), tem-se a técnica hifenada *HS*-MEFS-CG-EM. Os compostos presentes na fibra da MEFS são dessorvidos termicamente no porte de injeção do cromatógrafo gasoso com injeção sem divisão de fluxo (*Splitless*, em inglês). Nesta injeção MEFS-CG é utilizado um *liner* com diâmetro interno menor que os comumente utilizados em CG, com o objetivo de aumentar a velocidade de introdução dos compostos na coluna, evitando o alargamento dos picos cromatográficos gaussianos.

Os primeiros relatos de aplicação da MEFS foram publicados na área de análise de poluentes (compostos orgânicos voláteis). Pouco tempo depois, a técnica se difundiu para as pesquisas de *flavor* em alimentos e bebidas substituindo técnicas convencionais (SHIREY, 2000).

Nos últimos anos, a aplicação da técnica de HS- MEFS-CG, motivou alguns estudos com café. Entre eles destaca-se o trabalho de Kim e Nam (2001), que identificaram, por HS–MEFS–CG–EM, 50 componentes importantes do flavor do café solúvel. Por sua vez, Bicchi *et al*. (2002) realizaram um amplo estudo comparativo de performance de fibras na extração de compostos na bebida de café torrado. Foi observado maior enriquecimento com a fibra mista CAR/DVB/PDMS. Nebesny *et al*. (2007) conseguiram separar e identificar 193 compostos característicos do café por *HS*-MEFS-GC-MS em uma avaliação do efeito da torra sobre grãos de café da variedade robusta, empregando fibra mista DVD/CAR/PDMS.

Já Akiyama et al. (2008) aplicaram MEFS na amostragem de substâncias liberadas durante a moagem de grãos de cafés torrados usando três tipos diferentes de materiais poliméricos: PDMS, PDMS/DVB e CAR/PDMS. As melhores performances foram obtidas com as fibras mistas.

Arruda et al., (2009) identificaram 200 substâncias da fração volátil do extrato etanólico de café arábica por *HS*-MEFS-CG-EM, distribuídos em diversas classes características do flavor do café como piridinas, pirazinas, ésteres, ácidos carboxílicos, alcoóis, cetonas, pirróis, furanos, dentre outros. Além de permitir uma extração que preserva a maioria dos compostos característicos do flavor do café torrado, o etanol mostrou-se um solvente capaz de produzir um extrato com substâncias que apresentam características funcionais, como é o caso da cafeína, trigonelina e compostos fenólicos.

Caprioli et al., (2012), investigaram a influência dos parâmetros de preparo do café *espresso* no aroma final da bebida por *HS*-MEFS-CG-EM. O aroma mais rico em voláteis e com avaliação mais positiva na análise sensorial realizada no mesmo estudo foi obtido com o preparo do *espresso* com 25 mL de água a 92 ºC e pressão de 9 bar. Este trabalho possui uma importância acadêmica e também comercial, pois

apesar de ser mundialmente consumido, não há uma padronização das condições ótimas no preparo do café *espresso*.

É importante salientar uma desvantagem em relação à MEFS que é a baixa capacidade quantitativa da técnica. Devido aos diferentes equilíbrios possíveis e já citados, torna-se muito difícil conhecer as proporções envolvidas no sistema em 3 meios (matriz-*Headspace*-fibra). Sem uma proporção definida de massa entre matriz e fibra, pode-se apenas inferir que o pico cromatográfico de um analito é proporcional à massa que foi introduzida na coluna, porém não é possível obter a quantidade real presente na amostra original (HOLT, 2001). À medida que aumenta a complexidade da matriz–amostra, como é o caso do café torrado, os fatores discriminativos de volatilidade e polaridade entre os compostos de interesse tornam impraticável a quantificação dos mesmos (ARRUDA, 2009).

Apesar desta limitação, a MEFS mostra-se como importante ferramenta qualitativa na identificação de compostos voláteis de inúmeras matrizes na área de alimentos e de aproveitamento de resíduos. Além disso, é possível aplicar métodos estatísticos de comparação entre amostras. Os métodos multivariados têm sido recomendados na diferenciação de amostras analisadas por HS-MEFS-CG-EM.

3.7. Análise quimiométrica multivariada aplicada a dados cromatográficos

A “quimiometria” é uma área da química que utiliza métodos estatísticos no planejamento de experimentos e/ou na análise de resultados de experimentos de forma otimizada, levando a uma melhor interpretação dos dados obtidos experimentalmente por análises químicas.

A análise por componentes principais (ACP), que vem sendo utilizada na área de alimentos nos últimos anos, é uma técnica multivariada, pertencente ao ramo da análise fatorial, usada para reduzir a dimensionalidade de dados para um pequeno número de fatores ortogonais, de mais fácil interpretação (VANDEGINSTE et al, 1998). Esta técnica não requer informações prévias para que as amostras sejam classificadas, já que o agrupamento tem como base a similaridade dos dados extraídos pelo método físico–químico de análise empregado experimentalmente.

Os resultados obtidos por cromatografia gasosa (CG) são associados a um valor numérico (geralmente a área de um pico cromatográfico), proporcional à massa de analito injetada no sistema cromatográfico. Em estudos em que se aplica *HS*- MEFS -CG-EM em amostras complexas como café ou óleo de café, é previsível a obtenção de centenas de picos cromatográficos, identificados ou não. A impossibilidade de calibração quantitativa formal da técnica, devido à multiplicidade de fenômenos e equilíbrios envolvidos na MEFS, leva à necessidade de aplicação de métodos multivariados como forma comparativa entre amostras, respeitando-se o foco de investigação e delimitando ao máximo a variabilidade de parâmetros. (ARRUDA, 2009).

Mondello et al. (2005) caracterizaram o perfil de voláteis de diferentes variedades de café (arábica e robusta) provenientes de regiões geográficas distintas e em diversos graus de torra. A discriminação entre variedades, pela composição em voláteis, foi avaliada por ACP. Constatou-se que a classe dos furanos (furfuril-formato, 2-acetil-furano, furfural, furfuril-acetato, furfuril-álcool) era a mais abundantes no café arábica. O café da variedade robusta apresentou quantidades superiores de alquil- pirazinas (2,5-dimetil-pirazina; 2,6-dimetil-pirazina; 2-etil-6-metil-pirazina) e de 2-metoxi-fenol, que é um dos responsáveis pelo aroma associado a fumaça e especiarias desta espécie.

Gonzalez Rios *et al*. (2007) avaliaram por *HS*- MEFS (CAR/PDMS)-CG-EM o efeito de quatro diferentes técnicas de pré-processamento de cafés (verdes e torrados). Foram identificados 62 compostos para o café verde e 102 para o café torrado. As amostras foram discriminadas utilizando ACP, por grupos de notas aromáticas. Por sua vez, Arruda, et al. (2011) discriminaram grãos de café em 3 estádios de maturação diferentes (verde, cereja e boia) por ACP aplicada ao conjunto de dados das áreas cromatográficas dos compostos voláteis determinados por *HS*-MEFS-CG-EM.

3.8. Atividade Antioxidante

Os compostos antioxidantes protegem os sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (CONTINI et al., 2012). A atividade antioxidante do café está

diretamente associada à presença de compostos fenólicos, sendo representados principalmente pelos ácidos clorogênicos e pelos ácidos hidroxicinâmicos.

Os compostos fenólicos, que possuem atividade antioxidante, representam um dos grupos de maior ocorrência natural com papel morfológico e fisiológico fundamentais como proteção contra patogenias, parasitas e radiação ultravioleta (BRAVO, 1998). No organismo humano, estas moléculas apresentam propriedades antialergênicas, anti-inflamatórias, antiaterogênicas, antimicrobianas, antioxidantes, anti-trombóticas, cardioprotetoras e vasodilatadoras (SAMMAN et al., 1998; MIDDLETON et al., 2000; PUUPPONEN et al., 2001; MANACH et al., 2005).

Os ácidos clorogênicos (CGA, sigla em inglês) formam um grupo de ésteres derivados de ácidos trans-cinâmicos, como o ácido caféico, ferrúlico e do ácido quínico, sendo os polifenóis mais abundantes no grão do café (7-10 % e 5-7,5 % em base seca para robusta e arábica, respectivamente) (CLIFFORD, 1985; MONTAVON e BORTLIK, 2004). Existem 30 ácidos clorogênicos relatados para o grão de café verde, a maioria pertencente a três classes – os ácidos cafeoilquínicos (CQA: 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA), os ácidos di-cafeoil-quínicos (di-CQA: 3,4-di-CQA; 3,5-di-CQA, 4,5-di-CQA) e os ácidos ferroilquínicos (FQA) (CLIFFORD, 2006; LEPELLEY et al., 2007).

Como o café é uma importante fonte de ácidos clorogênicos, passou a ser considerado, recentemente, como um meio de obtenção de antioxidantes para os consumidores da bebida (VINSON et al., 2006). Como as características terapêuticas dos CGA estão sendo elucidadas cada vez mais, alguns pesquisadores recomendam a produção de extratos concentrados de grãos crus de café – principal fonte desta classe de compostos na alimentação humana, que podem conferir propriedades nutracêuticas (MADHAVA et al. 2007).

Stalmach *et al*. (2006) investigaram a atividade oxidante de extratos de café e observaram que os ácidos clorogênicos correspondem a 68 % e 41 % da atividade antioxidante dos grãos verdes e torrados, respectivamente.

Por outro lado, alguns relatos associam a atividade antioxidante (AAO) aos compostos heterocíclicos de baixa massa molecular provenientes da reação de Maillard, como furanos, piranos e pirróis (NICOLI et al., 1997; FUSTER et al., 2000;

YANAGIMOTO et al., 2002, 2004) aos taninos condensados è as melanoidinas (DE COLMENARES et al., 2006). Às melanoidinas têm sido atribuídos efeitos fisiológicos positivos, devido aos seus resíduos estruturais como redutonas, enaminas e pirrolequinas, que podem conferir à molécula forte poder sequestrante de espécies reativas de oxigênio, como os radicais hidroxila, peroxila e superóxidos (HAYASE, 1996).

O estudo realizado por Folstar (1985) mostra que o óleo de café apresenta cerca de 400 a 600 $mg.Kg^{-1}$ (partes por milhão) de tocoferol. O óleo possui também grande quantidade de ácido linoleico que é empregado como fotoprotetor oral (RHODES, 1998).

O teste de 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH•) determina o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados ou presentes em alimentos e outras amostras biológicas. O teste do DPPH• é baseado na capacidade do radical livre estável, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, reagir com compostos doadores de H^+, o que pode interromper as reações oxidativas em cadeia (BRAND-WILIAMS et al., 1995).

Ramalakshmi *et al.* (2009) avaliaram a atividade antioxidante e a atividade anticarcinogênica de extrato metanólico de café verde e de borra de café. Os extratos de borra de café dos tipos arábica e robusta apresentaram atividades antioxidantes similares e uma atividade anticancerígena maior que o extrato de café verde, o que pode ser atribuído as melanoidinas, formadas durante a torra e que protegem as células do stress oxidativo em sistemas biológicos.

A partir da caracterização de extratos aquosos e alcoólicos da borra de café, Panusa *et al* (2013) concluiram que este resíduo, gerado em grandes quantidades em todo o mundo, é uma fonte de antioxidantes naturais. As determinações analíticas mostraram a presença de compostos fenólicos, ácidos clorogênicos e flavonóides. Já a presença de grande quantidade de cafeína permite a avaliação da possibilidade de aplicação da borra de café na produção de bebidas energéticas. Para a borra de café advinda da produção de café descafeinado, os autores destacam o potencial antioxidante para a aplicação em alimentos funcionais e nutracêuticos.

Em seus estudos sobre aproveitamento de borra de café, Zuorro & Lavecchia, (2012) propuseram a extração de compostos fenólicos utilizando solução de etanol/água com posterior medição do poder calorífico em borra de café *espresso* de cafeterias convencionais e em borra de café *espresso* em cápsulas. A temperatura, a razão solvente/substrato e a porcentagem de álcool etílico no solvente influenciaram a eficiência da extração de compostos fenólicos obtidos no extrato final, demonstrando assim a possibilidade de otimização da extração de compostos bioativos neste coproduto agroindustrial. O poder calorífico, que ficou em torno de 24 $MJ.kg^{-1}$ foi medido na torta, ou seja, na borra de café após a extração dos compostos fenólicos. Esta pesquisa mostra que um extrato rico em compostos fenólicos pode ser obtido a partir da borra de café com um solvente de simples manuseio, ambientalmente seguro e de fonte renovável.

O alto poder calorífico encontrado na borra após extração com $ETOH/H_2O$ reforça a possibilidade de exploração da borra para aplicações de maior valor agregado (compostos bioativos e compostos de flavor) como também torna este resíduo um sustentável e renovável recurso energético (MIZSEY e RACZ, 2010; GOLD e SEURING, 2011).

3.9. Fator de Proteção Solar (FPS)

Dentre os comprimentos de onda emitidos pela luz solar, alguns podem causar danos à saúde humana, sobretudo à pele, devido à capacidade ionizante de alguns comprimentos de onda de frequência mais altas e, consequentemente maiores energias como os comprimentos de onda na região do ultravioleta do espectro eletromagnético (Raios UV). (RIBEIRO et al., 2004).

A região do ultravioleta pode ser dividida em raios UVA (320 a 400 nm), UVB (290 a 320 nm) e UVC (190 a 290 nm). Os raios UVA são pouco atenuados pela camada de ozônio, ou seja, a maior parte chega à superfície da terra, sendo os de menor energia e que causam menos danos à pele humana. No entanto, os raios UVA possuem alta capacidade de penetração na pele e estão associados a reações fotoalérgicas, carcinogenicidade, fotoenvelhecimento, etc. A radiação UVB, já um pouco mais energética que a UVA, provoca eritemas, morte de células da epiderme, queimaduras e podem causas alterações gênicas (RIBEIRO, et al., 2004;

WAGEMAKER, et al., 2009). Apesar de seu alto poder deletério, a maior parte desses raios é filtrada pela chamada camada de ozônio, por meio da fotodissociação do ozônio (reação: O_3 + fóton UV = O_2 + $O^{\cdot}$), de modo que, quanto menor o número de moléculas de ozônio na estratosfera (15 a 30 km de altitude), maior será a porcentagem de radiação que atinge a superfície. Por essa razão é tão preocupante o buraco na camada de ozônio causado principalmente pelos clorofluorcarbonetos ou CFC's, utilizados antigamente em aerossóis e gases de refrigeração e que têm seu uso proibido em vários países (SANTOS 1989). Por sua vez, os raios UVC são os de mais alta energia dentre os três citados e possuem alta carcinogenicidade, pois podem causar alterações importantes no DNA. Neste caso, apenas uma pequena quantidade do que é emitido pelo sol chega à superfície terrestre.

Data dos anos de 1930 os primeiros relatos sobre os efeitos negativos da radiação emitida pelo sol na saúde humana. A partir de então, surgiram os primeiros protetores solares no mercado. Os protetores solares têm por função evitar a ação da radiação UV através dos mecanismos de reflexão, refração e/ou absorção (MARTÍNEZ e LECHA, 2002). Em seus estudos, Schaefer et al., (2000) mediram a capacidade dos protetores solares na prevenção de câncer de pele, danos ao DNA, mutações, imunossupressão, dermatites, fotoenvelhecimento, eritemas e fotodermatites.

Os filtros solares são formulados a partir de diferentes componentes a fim de aumentar a faixa de absorção do espectro. A composição do veículo do filtro solar é um importante fator na eficácia do produto, pois as interações químicas entre os ingredientes com fator de proteção solar e a composição do veículo afetam a qualidade final do produto (CAMACHO, 2001). Fuchs (1998) concluiu que as substâncias antioxidantes contribuem para a proteção solar, já que a pele naturalmente já os utiliza na proteção contra radiação Ultravioleta.

Os protetores são formados por moléculas capazes de absorver a radiação UV (alta energia) e transformá-la em radiações com energias menores e inofensivas ao ser humano. Estas moléculas são, essencialmente, compostos aromáticos com grupos carboxílicos. No geral, apresentam um grupo doador de elétrons, como uma amina ou um grupo metoxila na posição orto ou para do anel aromático. Ao absorver a radiação UV, os elétrons situados no orbital π HOMO (orbital molecular preenchido

de mais alta energia) são excitados para orbital π* LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia) e, ao retornarem para o estado inicial, o excesso de energia é liberado em forma de calor. As transições eletrônicas que estão envolvidas durante a absorção da luz UV ocorrem entre a diferença de energia HOMO – LUMO (FLOR e DAVOLOS, 2007).

Já está bem estabelecido o uso do óleo de café em formulações cosméticas devido às propriedades emolientes dos ácidos graxos presentes e pela sua capacidade de proteção à pele contra os riscos da radiação solar (ARAÚJO & SANDI, 2007). A primeira referência conhecida sobre o uso do óleo de café como protetor solar é a patente US 4793990 de Grollier e Plessis (1988). Segundo esta patente, o óleo de café pode absorver radiação na faixa de 280 a 320 nm.

O óleo de café apresenta em sua composição substâncias antioxidantes e matéria insaponificável. Os principais constituintes do material insaponificável do café são dois alcoóis diterpênicos cafestol ($C_{20}H_{28}O_3$) e caveol ($C_{20}H_{26}O_3$) que ocorrem na forma livre ou como monoésteres de ácidos graxos, variando quantitativamente de 4 a 8% para o cafestol e de 1 a 6 % para caveol no óleo do café arábica torrado (SZPIZ *et al.,* 1989; LERCKER *et al.,* 2000). As propriedades UV-protetoras do óleo do café são atribuídas, principalmente, a estes dois compostos (GROLLIER e PLESSIS, 1988; ALVAREZ e RODRIGUEZ, 2000).

O Fator de Proteção Solar (FPS) indica quanto o tempo de exposição ao sol pode ser aumentado com o uso do protetor sem causar efeitos danosos à pele. Segundo, Mansur et al. (1986), uma pessoa de pele clara que pode ficar 20 minutos exposta ao sol sem filtro solar, poderá ficar até 400 minutos exposta ao sol com um protetor de FPS igual a 20. Quanto maior o FPS, maior será o tempo que a pele ficará protegida da radiação UVB, pois o FPS é definido em função da radiação UVB do espectro eletromagnético (290 a 320 nm).

Wagemaker, et al (2010) caracterizaram a fração lipídica de grãos de 10 diferentes espécies de café e mediram seu FPS. A fração lipídica apresentou importante quantidade de ácido linoleico e absorção no ultravioleta observada no espectro de varredura nesta faixa do espectro. As quantidades de óleo e de material insaponificável variaram de 6,9 a 32,4 % e 0,3 a 13,5 %, respectivamente. O maior

fator de proteção solar encontrado nesse estudo foi de 4,1, sendo os valores de 1,72 e 0,62 encontrados para as espécies arábica e robusta, respectivamente.

4. METODOLOGIA

Para caracterização do extrato etanólico da borra de café *espresso* em cápsulas, foram utilizados os métodos de *HS*-MEFS-CG-EM para avaliação do perfil de voláteis, estabilização do radical livre DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) para avaliação da capacidade antioxidante e método espectrofotométrico (UV) para avaliação do fator de proteção solar (FPS).

4.1. Amostras

Foram utilizadas 06 amostras de cápsulas formuladas com frutos de diferentes origens, porém de um mesmo fabricante. A Tabela 3 apresenta algumas informações sobre as amostras.

Tabela 3: Informações fornecidas pelo fabricante sobre as diferentes amostras

Amostra	Descrição
A	Café cultivado nas regiões mais altas da Colômbia com notas de frutas vermelhas e um toque de vinho.
B	Mistura de arábicas da Costa Rica e Colômbia com notas de cereais, malte e caramelo.
C	Mistura de arábica da América Central e arábica e Robusta Brasileiros com notas amadeiradas e de torrado.
D	Mistura dos cafés bourbon vermelho e amarelo de plantações em altitudes elevadas no sudeste do Brasil com notas de cereais, mel e xarope de bordo.
E	Combinação de arábicas do Brasil e da Colômbia com notas de frutas vermelhas, frutas secas e cereais.
F	Mistura de arábicas do Quênia, América Central e do Sul com notas de limão.

Fonte: manual do fabricante

4.2. Preparo da Bebida em Máquina de Café *Espresso* em Cápsulas

As cápsulas foram inseridas em máquina específica para preparo do café *espresso* e percoladas por água a 92 ºC com pressão de 19 bar (CAPRIOLI, 2012). Todas as cápsulas foram preparadas pelo mesmo operador, nas mesmas condições e mantidas em freezer a -20 ºC até a etapa de liofilização.

4.3. Determinação do Teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado de acordo com a metodologia padrão da Association of Official Analytical Chemist (AOAC, 2004) mantendo-se 5,0 g da amostra em estufa a 105 ºC até peso constante.

4.4. Liofilização da Borra

A remoção do excesso de umidade da borra foi realizada por liofilização de modo a preservar os compostos voláteis presentes. Portanto, as amostras foram submetidas a congelamento em nitrogênio líquido e, então liofilizadas por 12 horas.

4.5. Extração

4.5.1. Extração da Borra de Café *Espresso* em Múltiplos Estágios (*Soxhlet*)

A fim de determinar a quantidade de óleo (ácidos graxos) no extrato etanólico, 8,0 g da borra foram extraídos com éter de petróleo e com etanol em *soxhlet* por dez ciclos de refluxo. Todas as extrações foram feitas em triplicata.

4.5.2. Extração Etanólica (*Shaker*) da Borra de Café *Espresso* em Cápsulas

As amostras liofilizadas e homogeneizadas foram incubadas a 60 ºC com etanol anidro na proporção 4:1 (ETOH: borra seca, m/m) em mesa agitadora termostatizada, sob agitação orbital constante de 2000 rpm por 30 minutos. O extrato foi filtrado a vácuo para separação do extrato da torta (borra após extração) e, por fim, o etanol foi destilado, também sob vácuo, em evaporador rotativo para obtenção do extrato etanólico bruto (FREITAS, 2000).

Foram realizadas três replicatas de extração para cada uma das seis amostras estudadas, totalizando dezoito extratos etanólicos de borra.

4.5.3. Saponificação do extrato etanólico da borra

O teor de matéria insaponificável (MI) foi determinado por meio da saponificação dos lipídios presentes no extrato etanólico com solução de KOH 5 % (m/v). A reação foi conduzida em agitador orbital sob agitação de 200 rpm a 70 °C, por 1 h. Após o término da reação, a MI for recuperada em quatro extrações sucessivas com hexano. A amostra, após evaporação do solvente, foi pesada determinando-se a massa de M.I no extrato etanólico da borra de café *espresso* (AOCS Ca 6a-40, 1997).

4.6. Perfil de Voláteis – *HS*-MEFS-CG-EM

Para avaliar o perfil de compostos voláteis, 0,20 g do extrato etanólico foram aquecidos a 60 ºC em frasco de 5,0 mL selado, por 20 min. Em seguida, a fibra *Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno/Carboxen* (50/30 µm) foi exposta ao *headspace* do frasco para adsorção das substâncias por mais 10 min. A dessorção dos compostos foi feita pela introdução da fibra, por 5 min, no porte de injeção a 240 ^{o}C, no modo sem divisão de fluxo (*Splitless*) do cromatógrafo gasoso (Agillent 6890) (CAPRIOLI, 2012). Foi empregada coluna cromatográfica DBWax, J&W Corp., 25 m x 0,2 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme; programação de temperatura: 45 ^{o}C (5 min)//4 ºC.min^{-1}/230 ºC, mantendo-se a temperatura final por 10 min. Os espectros de massas foram obtidos com um detector seletivo de massas Agilent modelo 5973, operando no modo ionização eletrônica (70 eV), temperatura de linha de transferência a 280 ºC e fonte íons a 220 °C.

Os índices de retenção lineares (IRL) foram calculados por injeção de uma série padrão de *n*-alcanos (C_7-C_{28}) nas mesmas condições de análise (VIEGAS, 2007). A identificação dos compostos foi realizada a partir dos espectros de massas em comparação com a biblioteca eletrônica NIST 2.0, cálculo dos índices de retenção linear (IRL) e comparação com a literatura, bem como pela co-injeção dos padrões externos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA), grau CG (piridina, pirazina, 2,5-dimetil-pirazina, 2,6-dimetil-pirazina, 2,3-dimetil-pirazina, 2-etil-6-metil-

pirazina, 2-etil-5-metil-pirazina, furfural, 5-metil-2-furil-carboxaldeído, maltol, 2-metoxi-4-etil-fenol, 2-metoxi-4-vinil-fenol) (ARRUDA et al., 2011).

4.6.1. Análise Estatística do Perfil de Voláteis

Para a determinação da repetitividade e confiabilidade da técnica de MEFS na determinação do perfil de voláteis do extrato etanólico da borra, foram realizadas seis injeções de uma mesma amostra e calculados média, desvio padrão e coeficiente de variação entre as áreas de todas as substâncias identificadas nas seis injeções. Foram consideradas as substâncias que apresentaram coeficiente de variação menor ou igual a 10 por cento.

4.6.2. Análise Quimiométrica Multivariada do Perfil de Voláteis

A fim de diferenciar as amostras quanto a sua composição voláteis, foi empregada a análise multivariada por componentes principais (PCA, em inglês) das áreas cromatográficas obtidas por *HS*-MEFS-CG-EM. Para tal, aplicou-se o *Software The Unscramble* versão 10.1 (CAMO CORP).

4.7. Atividade Antioxidante – (Método DPPH• .)

A determinação da atividade antioxidante foi feita pelo método DPPH•, onde é medida a capacidade da amostra em estabilizar os radicais livres DPPH• (BRAND-WILLIANS, 1995; SÁNCHEZ-MORENO, 1998). Esta metodologia baseia-se na redução da absorbância do radical DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) a DPPH• (1,1-difenil-1-picril-hidrazina), a 515 nm (Comprimento de onda de máxima absorção, pela ação de compostos redutores de radicais livres. Os radicais livres DPPH•, que inicialmente apresentam coloração roxa, perdem esta cor quando um radical hidrogênio doado por uma molécula antioxidante entra em ressonância com a molécula de DPPH• . , diminuindo, assim, a absorbância a 515 nm. O DPPH• é um radical estável e com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. Assim sendo, apenas agentes redutores fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis de modo estequiométrico. O perfil de absorção da forma radicalar e da forma estabilizada do DPPH• está demonstrado no anexo 1.

4.7.1. Curva Padrão de DPPH• .

Conforme a metodologia utilizada por Rufino et al. (2007) 2,4 mg do reagente DPPH• (99,999% de pureza) foram pesados e avolumados a 100,00 mL, em balão volumétrico, com metanol para preparo da solução-mãe de DPPH• . (24 $mg.L^{-1}$ ou 60 $\mu mol.L^{-1}$). Esta solução foi mantida em vidro âmbar e utilizada no mesmo dia do preparo. A partir da solução-mãe, foram preparadas, em balões volumétricos de 10,00 mL, soluções com concentração variando de 10 a 50 $\mu mol.L^{-1}$ (RUFINO et al., 2007). A curva de calibração de DPPH• foi então construída com 6 soluções, cujas concentrações estavam compreendidas no intervalo de 10 a 60 $\mu mol.L^{-1}$. O álcool metílico grau HPLC foi usado como branco.

Em ambiente com ausência de luz, foram transferidas alíquotas de 4,0 mL de cada solução de DPPH• para cubetas de quartzo e, então foram realizadas as medidas das absorbâncias a 515 nm, para elaboração da curva padrão. Todos os pontos foram lidos em triplicata. Em seguida, foram plotadas as concentrações (abscissas) e as respectivas absorbâncias (ordenadas) para o ajuste da equação da reta por regressão linear. A curva analítica de DPPH• apresentou alta correlação linear (R^2=0,999) e é apresentada no anexo 2.

4.7.2. Curva da Amostra com Solução Padrão de DPPH• . para o Cálculo do EC_{50}

Para o cálculo do EC_{50}, que é a concentração de amostra necessária para reduzir em 50 % os radicais livres de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, foi feita uma determinação espectrofotométrica indireta, onde diferentes concentrações da amostra reagiram com a mesma solução padrão de DPPH• (60 $\mu mol.L^{-1}$) a fim de se observar o consumo do reagente com o aumento da quantidade de amostra. 120,0 mg de amostra foram pesados e avolumados a 10,00 mL com isopropanol, obtendo-se uma solução-mãe de (12,0 $mg.mL^{-1}$). A partir desta solução-mãe, foram preparadas as soluções da curva analítica de cada extrato, na faixa de concentração de 1,00 a 12,0 $mg.mL^{-1}$.

As absorbâncias (515 nm) foram monitoradas durante 60 min, em intervalos de 3 min onde foi observada a redução da absorbância até sua estabilização. A leitura da absorbância final para o cálculo do EC_{50} só deve ser feita após a

estabilização da absorbância (tempo EC_{50}). Para experimentos posteriores, com a mesma matriz, a determinação pode ser realizada apenas no tempo estabelecido anteriormente (tempo EC_{50}), acompanhado, também, da medida inicial da solução controle. Cada ponto das curvas foi preparado reagindo-se 100,0 µL de solução isopropílica da amostra com 4,00 mL de solução padrão de DPPH• (60,0 $\mu mol.L^{-1}$). Uma solução contendo 4,00 mL de metanol + 100,0 µL de álcool isopropílico foi utilizada como branco e a solução padrão de DPPH• (60 $\mu mol.L^{-1}$) foi utilizada como controle. Todas as determinações foram feitas em triplicata.

Para obtenção da equação da curva de calibração foram plotadas as absorbâncias em função das concentrações das amostras. Todas as curvas apresentaram alta correlação linear ($R^2 \geq 0,99$). A partir da equação de ajuste, calculou-se o EC_{50}, que posteriormente foi expresso em $mg_{EXTRATO}/mg_{DPPH\bullet}$ . .

Foi medida também a atividade antioxidante do padrão de Ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), que é o ácido clorogênico mais abundante do café, principal substância responsável pela atividade antioxidante (RAMALAKSHMI et al., 2009).

4.8. Fator de Proteção Solar – FPS (Método Espectrofotométrico)

Para avaliar o FPS, foi empregada a metodologia proposta por Bendová *et al*. (2007), onde preparou-se uma solução do extrato etanólico em etanol absoluto, na concentração 0,20 $mg.mL^{-1}$, para qual foi feita a varredura espectrofotométrica na região entre os comprimentos de onda (λ) de 290 e 320 nm com medições em intervalos de 2 nm. O FPS foi calculado pela expressão abaixo (MANSUR et al., 1986).

$$FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} [EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot abs(\lambda)]$$

onde:

FC *= fator de correção*

EE(λ) *= efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (λ);*

I(λ) *= intensidade do sol no comprimento de onda (λ);*

abs(λ) *= Absorbância do extrato.*

Foram utilizados os valores ponderados de Sayre *et al*. (1979) para avaliar o FPS = EE (λ).I(λ) , conforme apresentado na tabela 4:

Tabela 4: Comprimento de onda e fatores de multiplicação para o cálculo do FPS

Comprimento de onda (nm)	Fator de multiplicação - EE(λ).I(λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3274
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

Fonte: SAYRE *et al*. (1979)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração da Borra de Café *Espresso* em (*Soxhlet*)

A partir da mesma quantidade inicial de borra seca, cerca de 8,00 g, obteve-se 1,66 g (± 0,11) de extrato etanólico e 1,41 g (± 0,11) de extrato etéreo, o que corresponde a um rendimento de 20,8 (±0,64) e de 17,6 (±0,53) g.100 g^{-1}, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Rendimento de extração em *soxhlet*

Amostra	Rendimento (g.100g^{-1})
Extrato etéreo (óleo)	17,6 ±0,523[a]
Extrato etanólico	20,8 ±0,646[b]

*Resultados expressos como média ± desvio padrão de 3 replicatas
* Valores acompanhados por letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com teste de Fisher LSD, (p<0,05).

O valor encontrado para o extrato etéreo da borra está de acordo com dados publicados na literatura. Ravidranath (1972) obteve rendimentos de 8 a 17 % (m/m) na extração do óleo de café a partir da borra de café robusta com éter de petróleo e Turattil (2001), obteve de 12 a 18 % de óleo para o tipo arábica. Mazzafera et al (1998) obtiveram um rendimento de 9,83 % do extrato etéreo do café robusta, enquanto Wagemaker (2009) obteve 13,1 % para extrato etéreo do café arábica.

O rendimento em massa foi maior no extrato etanólico, se comparado ao extrato etéreo. Devido às suas características físico-químicas, o éter de petróleo carreia, preferencialmente, as substâncias mais apolares. Já o etanol, extrai tanto as espécies químicas apolares, quanto outros compostos com características mais polares, resultando assim em um maior rendimento em massa.

5.2. Extração Etanólica da Borra de Café *Espresso* em Cápsulas e Saponificação do extrato.

Os resultados obtidos para quantificação do teor de lipídeos pelo método analítico em aparelho *shaker* estão apresentados na Tabela 6. Este é um método padrão de quantificação de lipídeos em matrizes diversas, pois os ciclos de refluxo realizados extraem a maior quantidade possível de soluto da amostra.

Tabela 6: Teor de umidade e rendimento da extração etanólica em *agitador orbital*.

Amostra	Teor de umidade ($g.100g^{-1}$)	Extrato etanólico ($g.100g^{-1}$)
A	72,4 ± 1,23	16,7 ± 0,633[a]
B	72,0 ± 2,17	17,4 ± 0,418[b]
C	70,1 ± 1,85	15,1 ± 0,778[c]
D	73,3 ± 1,14	15,7 ± 0,324[d]
E	70,4 ± 1,16	16,1 ± 0,543[a]
F	70,5 ± 1,42	16,6 ± 0,569[a]

*Extração etanólica na proporção 4:1 (ETOH:borra seca, m/m) a 60ºC com agitação orbital
*Resultados expressos como média ± desvio padrão de 3 replicatas.
*Valores acompanhados por letras diferentes, na mesma coluna, são significativamente diferentes de acordo com o teste de Fisher LSD, ($p<0,05$).

No método de agitação orbital (shaker), que representa um estágio de extração, o rendimento foi menor que no aparelho soxhlet. Isto ocorre pois no primeiro caso, em geral, não ocorre o esgotamento da matriz. Os valores de rendimento da extração etanólica em *shaker* se situaram entre 15,1 e 17,4 %, em massa, e foram superiores aos valores reportados por Freitas e Lago (2007), que obtiveram rendimento de 11,4% de extrato etanólico da borra de café da indústria de solúvel. É possível observar que o rendimento da extração etanólica não variou significativamente entre as amostras avaliadas. Borras de *blends* de cafés de regiões diferentes apresentaram quantidades de extrato etanólico muito próximas.

Por meio da saponificação do extrato etanólico da borra, obteve-se 1,40% (m/m) de matéria insaponificável (M.I.), o que significa que o extrato possui cerca de 98,6 % de lipídios neutros. Esta quantidade de matéria insaponificável é menor que a reportada na literatura para o óleo de café torrado (KHAN & BROWN 1953 E WAGEMAKER 2009). Estes autores

reportaram cerca de até 11 % de matéria insaponificável para óleo de café do tipo arábica torrado. Isto ocorre, provavelmente, pois a matéria insaponificável é composta por substâncias mais polares que àquelas presentes na fração lipídica (saponificável) e são majoritariamente extraídas no preparo da bebida do café *espresso*, onde se utilizou água quente (70 °C) e pressão de 9 bar. O preparo da bebida nestas condições, remove os sólidos hidrossolúveis do grão torrado e moído, com consequente concentração da fração lipídica na borra. Na extração realizada neste trabalho, o etanol utilizado em excesso e em temperaturas acima da ambiente (60 ºC), favorece a remoção de compostos polares ainda retidos no resíduo como os compostos fenólicos que estão associados à atividade antioxidante, a cafeína e os diterpenos, substâncias associadas ao fator de proteção solar.

5.3. Perfil de Voláteis – HS-MEFS-CG-EM

5.3.1. Compostos Identificados por HS-MEFS-CG-EM

Foram detectados cerca de 180 picos cromatográficos em todas as amostras de extrato etanólico estudadas. Em uma primeira análise, foram observadas as similaridades entre os espectros de massa obtidos pelo detector e os espectros da biblioteca do *software* do cromatógrafo. Foram consideradas como substâncias identificadas as que apresentaram similaridade dos espectros de massa maior ou igual a 90 %. A partir da análise estatística realizada com seis injeções de uma mesma amostra, foi avaliado o coeficiente de variação das áreas dos picos de cada substância (menor ou igual a 10 %). A técnica *HS*-MEFS-CG-EM mostrou-se reprodutível para 70 compostos, que estão separados por classes químicas na Tabela 7.

Tabela 7: Substâncias identificadas por CG-EM e IRL

Pirazinas	
Substância	**IRL**
Metil pirazina	1239
2,5 dimetl pirazina	1296
2,6 dimatil pirazina	1302
Etil pirazina	1307
2,3 dimetil pirazina	1308
2 etil 5 metil pirazina	1367
2 etil 3,5 dimetil pirazina	1423
2 metil 6 vinil pirazina	1465
2-(2-furil)-5-metil pirazina	2028
5 metil 2 pirazinil-metanol	2050

Furanos	
Substância	**IRL**
2 pentil furano	1206
Furfural	1438
5 metil furfural	1547
2 furfuril furano	1585
2 furano metanol	1641
5 metil 2 furfuril furano	1542
3 fenil furano	1835
Éter difurfurílico	1962
2,3 di-hidro benzofurano	2372

Benzoxazolas	
Substância	**IRL**
Benzoxazola	1737
2 metil benzoxazola	1750

Pirróis	
Substância	**IRL**
2 acetil 1 metil pirrol	1630
2 furfuril pirrol	1814
2 acetil pirrol	1950
1H pirrol 2 carboxaldeído	2002
2 formil 1 metil pirrol	2079
1 furfuril 2 formil pirrol	2223
1 furfuril 2 acetil pirrol	2247

Álcoois	
Substância	**IRL**
1 pentanol	1232
2,3 butanodiol	1523
1,2 propanodiol	1575
Benzenoetanol	1891
1,4 butanodiol	1907
1,2,3, propanotriol	2294
1,2 benzenodiol	2676

Ácidos	
Substância	**IRL**
Ácido Acético	1431
Ácido 3 metil 2 butenóico	1782
Ácido 4 hidroxi 5 oxohexanóico	2035
Ácido 1,2 benzenodicarboxílico	2349

Tiazolas	
Substância	**IRL**
1,3 tiazola	2459

Cetonas	
Substância	**IRL**
3 hidroxi 2 butanona	1257
2 ciclopenten-1-ona	1325
3 metil 2 hidroxi 2 ciclopenten-1-ona	1807
3 metil ciclohexanona	1818
3 etil 2 hidroxi 2 ciclopenten-1-ona	1807

Fenólicos	
Substância	**IRL**
2 metoxi fenol (guaiacol)	1826
Fenol	1984
4 etil 2 metoxi fenol (etil guaiacol)	2008
3 metil fenol	2067
3 etil fenol	2052
4 vinil 2 metoxi fenol (vinil guaiacol)	2135

Aldeídos	
Substância	**IRL**
Hexanal	1063
Nonanal	1368
2 octenal	1402

Tiofenos	
Substância	**IRL**
2 tiofeno metanol	1923
1 metoxi 4(1-metil-etil)ciclohexa-1,4-dieno)	2206
Tetrahidro Piran-2-ona	1776

Piridinas	
Substância	**IRL**
Piridina	1160
3 etil piridina	1356
3 piridinol	1799
7 metil 6,7 dihidro piridina	1684
6 metil 3 piridinol	2383
3 hidrixi piridina	2481

Terpenos	
Substância	**IRL**
Limoneno	1171
1 metil 4 propan-2-ciclohexa-1,4-dieno	1217
Trans linalol	1450
L-linalol	1530

Lactonas	
Substância	**IRL**
metil 2 furanona	1398
Hidroxi dimetil furanona	2016
Butirolactona	1597

Foram detectadas e identificadas classes de substâncias características do flavor do café como pirazinas, furanos, pirróis, alcoóis, ácidos, fenólicos, cetonas, piridinas, terpenos, lactonas, aldeídos, tiofenos, tiazolas, éteres, piranos e benzoxazolas. Além da comparação dos espectros de massa, os índices de retenção linear (IRL's) estão de acordo com os IRL's apresentados na literatura para o tipo de coluna cromatográfica utilizada (MONDELLO et al., 2005; ARRUDA et al, 2012). Desta forma, a determinação qualitativa das substâncias é dada por duas ferramentas, a comparação entre os espectros de massa e o IRL.

A figura 2 apresenta um cromatograma obtido pela técnica HS-MEFS-CG-EM de um extrato etanólico de borra de café *espresso* obtido no presente estudo (Amostra B). É possível observar a complexidade do perfil de voláteis pela quantidade de picos cromatográficos e a indicação dos sinais de algumas das principais substâncias com suas respectivas estruturas moleculares.

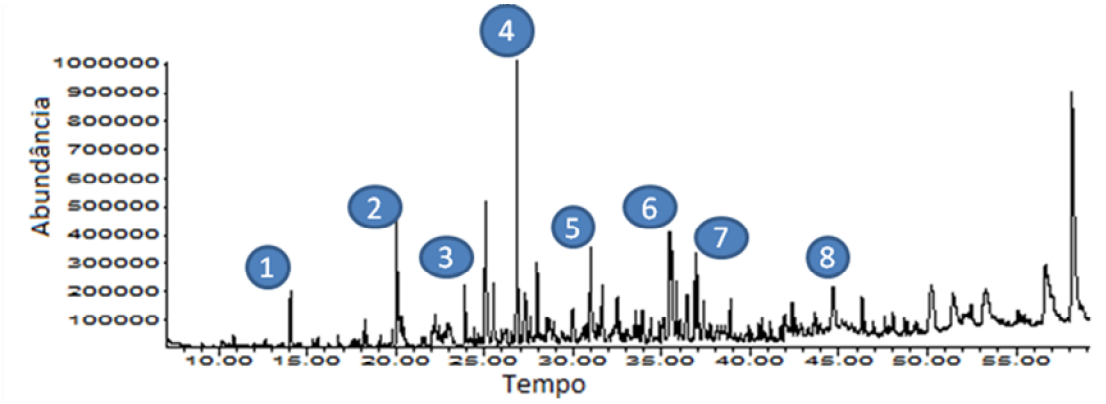

Figura 2: Cromatograma de extrato etanólico de borra de café *espresso*

*Substâncias características do flavor do café, identificadas por CG-EM e IRL: **1)** 2,5 dimetil pirazina, **2)** Furfural**,** **3)** 2 acetil 1 metil pirrol, **4)** 2 furano metanol, **5)** 2 metoxi fenol, **6)** 2 acetil pirrol, **7)** Fenol, **8)** 3 etil fenol.

Além da análise qualitativa do perfil de voláteis dos extratos, foi realizada a normalização interna, que é a porcentagem de cada substância no cromatograma, tomando-se como 100% a área cromatográfica total. Neste tipo de método, assume-se que a constante que representa o fator de resposta do detector é a mesma para todos os componentes detectados (SKOOG, 2012).

Um fator limitante na quantificação das substâncias são os múltiplos estágios de equilíbrio que ocorrem na extração por MEFS. A área do pico cromatográfico é proporcional à massa da substância introduzida no cromatógrafo, no entanto, devido

à dificuldade de se determinar com precisão a proporção de analito que é liberada da matriz e a proporção adsorvida na fibra da microextração, torna-se inviável a quantificação das substâncias mesmo com a utilização de padrões (padronização externa e interna). Os efeitos limitantes estão associados à complexidade da matriz, que acarreta múltiplas interações (~180 compostos detectados no processo cromatográfico), sua alta viscosidade e seu caráter lipídico. Além disso, deve-se considerar a inexistência de padrões para a maioria das substâncias detectadas. No entanto, a normalização interna permitiu estimar as classes de substâncias que mais contribuem para o *flavor* do extrato etanólico da borra de café.

A Figura 3 apresenta a contribuição (em porcentagem) das principais classes de substâncias identificadas para o perfil de voláteis de todas as amostras analisadas.

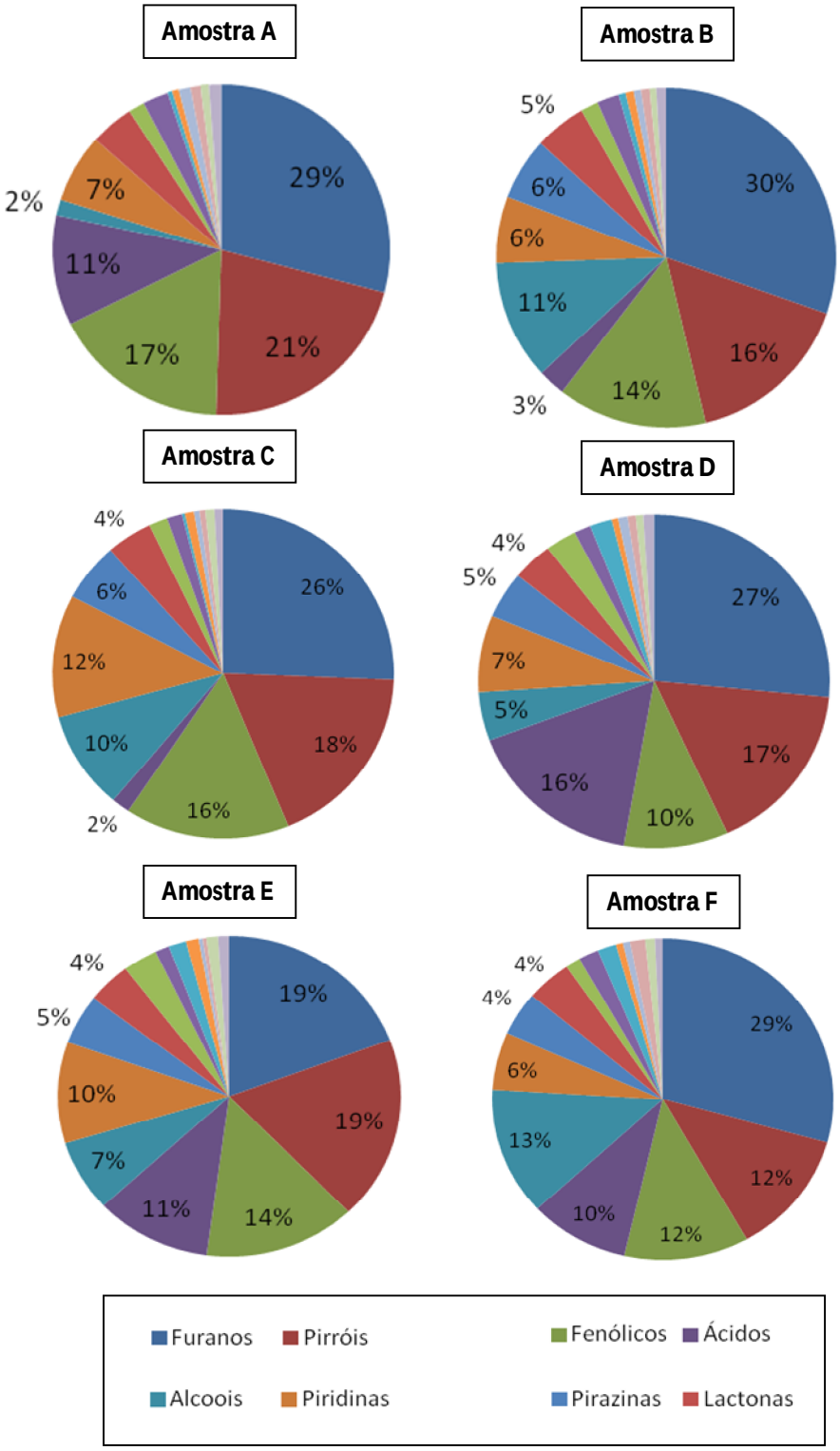

Figura 3: Área pencentual das classes de substâncias identificadas em cada amostra.

As substâncias identificadas neste trabalho já foram amplamente citadas na literatura como características do *flavor* do café, o que demonstra que o extrato possui um perfil de voláteis característico de café. A presença de grande parte destas substâncias pode ser atribuída, principalmente, à polaridade do solvente utilizado. O etanol carreia compostos responsáveis pelo flavor, que possuem altos índices de polaridade. Esta propriedade é fator importante para definir a substituição de solventes, como hexano e éter de petróleo, nos processos de extração de óleos de matrizes alimentares e seus coprodutos.

Zambonim et al. (2005) reportou furanos, pirazinas, pirróis e fenólicos como as classes mais abundantes da bebida do café por *HS*-MEFS-CG-EM. Aos compostos fenólicos é atribuído o odor de fumaça, amargor, aspereza e adstringência. Pirróis são associados ao odor característico de pipoca e, em pequenas quantidades conferem odor doce e tostado. Pirazinas conferem *flavor* torrado, de nozes e de chocolate, enquanto os furanos conferem atributos frutais, de nozes e caramelo. O 2-furanometanol, substância mais abundante no aroma do extrato etanólico da borá de café *espresso* em cápsulas, confere amargor e odor tostado. 2,5 dimetil pirazina e 2,6 dimetil pirazina conferem odor de nozes-chocolate e nozes-torrado, respectivamente. 5 metil furfural apresenta odor doce-apimentado, 2 furfuril furano, odor de caramelo, 4 etil 2 metoxi fenol de torrado e fumaça e o 3 etil e hidroxi ciclopenten-1-ona um forte odor de caramelo doce que colabora intensamente para o odor característico do café (SHIGEMATSU, et al, 1972; FORS, 1983; SEMMELROROCH et al., 1995; PROCIDA et al., 1997; FLAMENT e BESSIERE-THOMAS, 2001).

Como o perfil de voláteis do extrato etanólico da borra de café *espresso* em cápsulas é semelhante ao perfil de voláteis do óleo de café torrado, reportado na literatura, este produto mostra-se potencialmente aplicável na indústria alimentícia (balas, bombons, sorvetes, café solúvel) como realçador de sabor dado o seu *flavor* pronunciado.

5.3.2. Análise por Componentes Principais (ACP) das Áreas Cromatográficas dos Compostos Identificados por *HS*-SPME-CG-EM no Extrato Etanólico da Borra de Café.

A análise multivariada, por componentes principais das áreas dos picos cromatográficos das substâncias identificadas por *HS*-MEFS-CG-EM, agrupou as replicatas de cada amostra e discriminou amostras diferentes. A ACP discriminou as 6 amostras estudadas com 59% da variância total nos dois primeiros componentes principais, como pode ser observado no gráfico da figura 4.

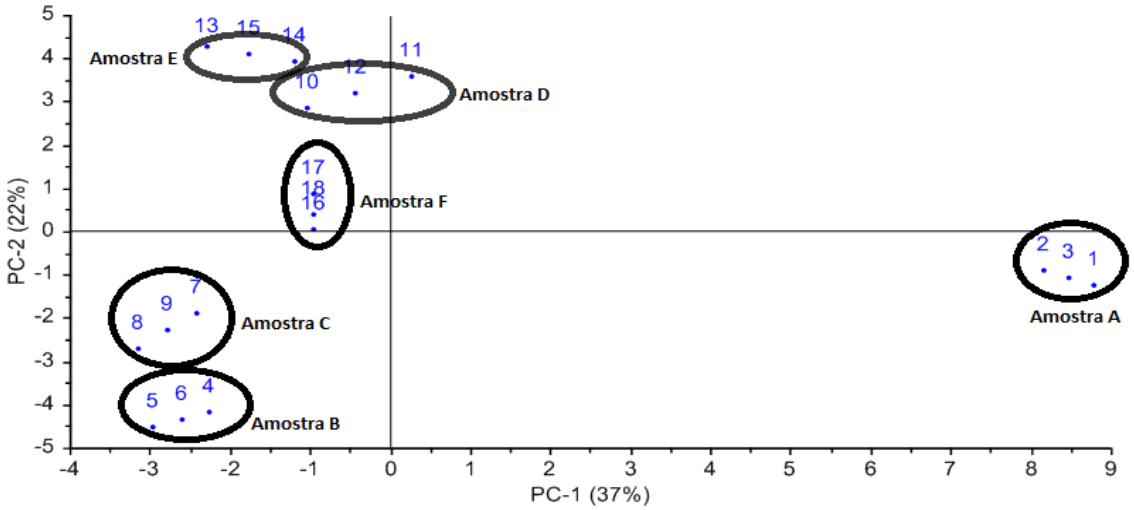

Figura 4: Análise Multivariada por Componentes Principais (ACP) do perfil de voláteis do extrato etanólico da borra

As amostras de borra de café *espresso* em cápsulas analisadas são diferentes, pois se tratam de *blends* de composições em arábica e robusta de regiões distintas. Portanto, já era esperada uma diferenciação entre as amostras (MONDELLO et al., 2005; ARRUDA, 2009). No entanto, este resultado indica que as propriedades termodinâmicas do solvente define os principais compostos removidos para o extrato. Por esta razão, a técnica empregada permitiu discriminar também o solvente usado no processo com o agrupamento das replicatas de mesma amostra.

Adicionalmente, a diferenciação de amostras de procedências ou *blends* diferentes, por meio da análise multivariada de dados cromatográficos mostrados no gráfico de figura 4, confirma a aplicabilidade desta técnica estatística em matrizes com número abundante de compostos e classes químicas, e está de acordo com os

estudos de Gonzalez-Rios *et al*. (2007), Mondello et al. (2005) e Arruda (2009), que diferenciaram diferentes amostras de café através de ACP nos dados do perfil de voláteis.

5.4. Atividade Antioxidante - Método DPPH• .

As soluções contendo extrato e solução padrão de DPPH• reagiram por 60 minutos (tempo EC_{50}) antes da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro. A figura 5 mostra a cinética da reação expressa pela variação da absorbância em função do tempo. É possível observar que a partir de 60 minutos de reação não ocorre uma variação significativa da absorbância, o que indica que todas as substâncias capazes de estabilizar os radicais livres DPPH• já reagiram.

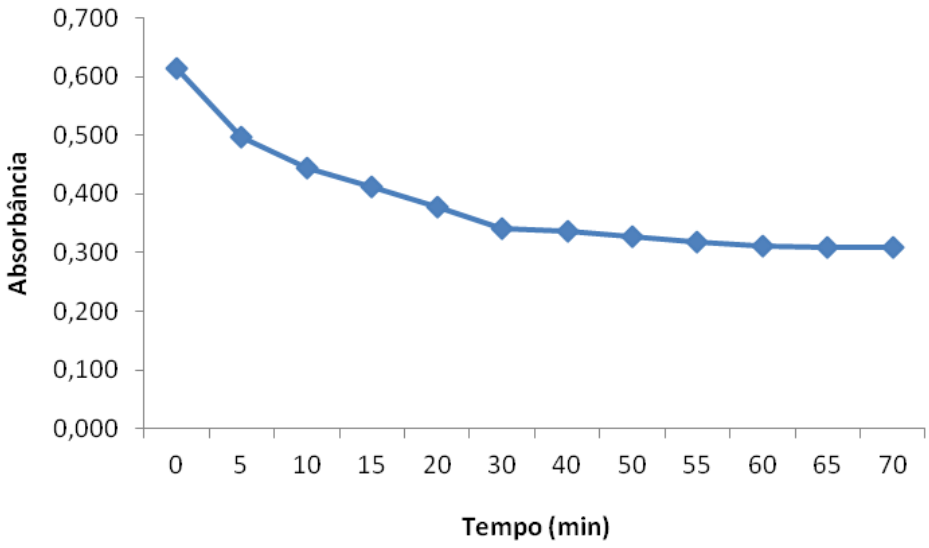

Figura 5: Determinação do tempo de equilíbrio da reação do extrato etanólico com DPPH•.

Com todos os extratos etanólicos obtidos (18) realizou-se uma curva analítica para o cálculo da concentração EC_{50}. Os pontos das curvas foram feitos em triplicata. Um exemplo de uma curva mostrando o consumo dos radicais DPPH• . pelo extrato etanólico é mostrado no anexo 3.

A atividade antioxidante de cada amostra e do padrão 5-CQA foi expressa em $mg_{extrato}/mg_{DPPH•}$, como mostra a tabela 8.

Tabela 8: Atividade antioxidante do extrato etanólico de borra de café *espresso* em cápsulas

Amostra	AAO ($mg_{extrato}/mg_{DPPH\bullet}$.)
A	23,6 ±1,44[b]
B	19,4 ±1,07[a]
C	19,1 ±1,15[a]
D	19,0 ±2,52[a]
E	18,4 ±2,11[a]
F	19,2 ±1,98[a]
Padrão 5-CQA	0,38 ±0,023

*Resultados expressos como média ± desvio padrão de 3 replicatas.

*Valores acompanhados por letras diferentes são significativamente diferentes (pelo teste de Fisher LSD, $p<0,05$).

A atividade antioxidante média dos extratos etanólicos de borras de café *espresso* em cápsulas, fornece a massa necessária para reduzir 50 % dos radicais DPPH•. Os resultados estão na faixa de 18,4 a 23,6 $mg_{extrato}/mg_{DPPH\bullet}$. , valores 18 a 62 vezes maiores que o valor apresentado pelo padrão do ácido clorogênico 5-CQA. Este último é utilizado como referencial, pois os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante no café e o 5-CQA é o composto fenólico mais abundante nesta matriz (CLIFFORD, 2006). Dias et al., (2005) descreveram um teor de 5-CQA de 0,515 $g.100g^{-1}$ de café (0,5%) em grau de torra média.

Os resultados deste estudo estão abaixo dos encontrados por Casazza et al., (2010), que reportou uma atividade antioxidante em torno de 50 $mg_{extrato}/mg_{DPPH\bullet}$. para resíduo da indústria de vinho e suco de uva. Arruda et al (2012) encontrou em torno de 3 $mg_{extrato}/mg_{DPPH\bullet}$ para óleo de café (extraído com etanol, pela mesma técnica empregada neste estudo), enquanto Dangelo (2013) reportou 5,5 $mg_{extrato}/mg_{DPPH\bullet}$. para extrato etanólico de borra de café *espresso* comercial, também extraído por etanol com agitação orbital.

A presença de antioxidantes é um fator que agrega valor ao extrato etanólico da borra de café *espresso* em cápsulas, favorecendo o uso deste produto em destinações mais nobres na indústria alimentícia e de cosméticos, já citados.

5.5. Fator de Proteção Solar (FPS)

Para medir o Fator de Proteção Solar (FPS) por meio do método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur et al., (1986) é necessário obter as absorbâncias da solução amostra na faixa de 290 a 320 nm. A figura 6 mostra o perfil absorciométrico ou varredura de uma das amostras estudadas na faixa de 280 a 330 nm. É possível notar no espectro abaixo que a amostra absorve nesta região, apresentando um decaimento significativo de absorbância por volta de 305 nm em diante.

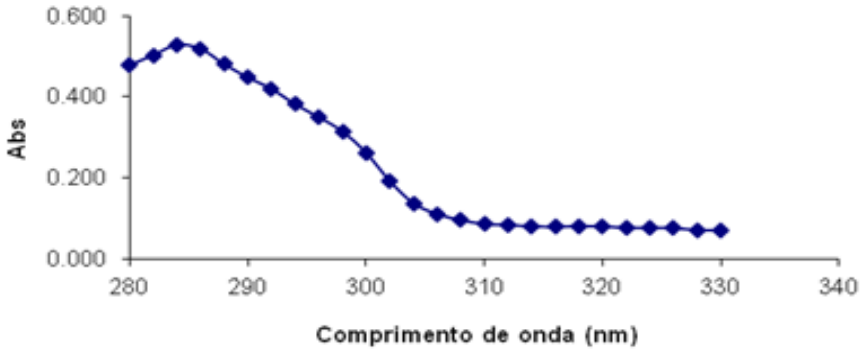

Figura 6: Varredura espectrofotométrica do extrato etanólico da borra de café *espresso* (280 – 320 nm)

O fator de proteção solar encontrado para cada amostra e seus respectivos desvios padrão estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9: Fator de Proteção Solar (FPS) do extrato etanólico da borra de café

Amostra	Fator de Proteção Solar (FPS)
A	2,44 ± 0,0386[a]
B	2,76 ± 0,0651[b]
C	2,51 ± 0,0664[c]
D	2,69 ± 0,0553[d]
E	2,27 ± 0,0579[e]
F	2,29 ± 0,0212[e]

*Resultados expressos como média ± desvio padrão de 3 replicatas.
*Valores acompanhados por letras diferentes são significativamente diferentes (pelo teste de Fisher LSD, $p<0,05$).

O fator de proteção solar (FPS) variou de 2,27 a 2,76. As amostras com composições diferentes de arábica e robusta e, além disso, advindos de regiões distintas não apresentaram diferenças significativas no poder de minimizar os efeitos dos raios UV.

Esses valores encontrados para o extrato etanólico da borra de café *espresso* em cápsulas estão próximos dos resultados obtidos por Wagemaker *et al.* (2010) para o óleo de café. Neste caso, os autores reportaram valores de fator de proteção solar de 1,72 e 0,62 para as variedades arábica e robusta, respectivamente. Arruda *et al.* (2010) reportaram fator de proteção solar 5,72 para óleo de café verde torrado, 6,20 para óleo de café cereja torrado e 9,60 para óleo de café boia torrado.

O extrato etanólico da borra de café *espresso* em cápsulas é um produto obtido a partir de um resíduo da agroindústria e por apresentar FPS, pode ser aplicado na indústria de cosméticos na formulação de produtos como substituto do óleo de café torrado, com o objetivo de bloquear radiações UV, hidratar e regenerar a camada hidrolipídica da pele.

6. CONCLUSÃO

A extração com etanol gerou um produto com alto teor de óleo e, devido ao seu caráter polar, removeu também, substâncias hidrossolúveis que não seriam extraídas com hexano, solvente comumente utilizado na indústria de óleos. Estes compostos estão associados a características que agregam valor ao produto como aroma, atividade antioxidante e fator de proteção solar.

O perfil de voláteis do extrato etanólico, obtido pela técnica *HS*-MEFS-CG-EM, mostrou-se compatível ao perfil reportado na literatura para óleo de café, o que possibilita sua utilização em produtos com a finalidade de realçar o *flavor.* A análise quimiométrica discriminou as amostras através das áreas dos picos cromatográficos relativos aos compostos voláteis. Os extratos etanólicos de uma mesma amostra foram agrupados, confirmando que a extração etanólica é repetitiva, e de amostras distintas foram separados.

Os extratos apresentaram atividade antioxidante e fator de proteção solar, o que permite a sua utilização na formulação de produtos alimentícios e cosméticos.

A partir da caracterização realizada neste estudo, pode-se inferir que os extratos etanólicos de borra de café *espresso* em cápsulas apresentaram propriedades químicas de interesse industrial. A viabilidade de sua aplicação pode ser objeto de avaliação futura em indústrias alimentícias e cosméticas

7. REFERÊNCIAS:

- ADANS, M.R. & DOUGAN, Waste products In: CLARKE, R.J. & MACRAE, R. **Coffee: Technology**. London: Elsevier Applied Science, v.2, p. 282-291, 1985.

- AKIYAMA, M.; MURAKAMI, K.; HIRANO, Y.; IKEDA, M.; IWATSUKI, K.; WADA, A.; TOKUNO, K.; ONISHI, M.; IWABUCHI, H. Characterization of headspace aroma compounds of freshly brewed arabica coffees and studies on a characteristic aroma compound of Ethiopian coffee. **Journal of Food Science**. v.73, p. 335-346, 2008.

- ALVAREZ, A.M.R. & RODRIGUEZ, M.L.G. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. **Grasas y Aceites**, v. 51, n.1-2, p. 74-96, 2000.

- ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? **Química Nova**: São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2169-2180, 2009.

- Association of Official Analytical Chemist. **Official methods of analysis**, EUA, 2004.

- American Oil Chemists Society. **Method AOCS Ca 6a-40**, EUA, 1997.

- ARAÚJO, J.M.A. & SANDI, D. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**. v. 101, n.3, p. 1087-1094, 2007.

- ARRUDA; N. P. **Avaliação do efeito do estádio de maturação do fruto do cafeeiro (Coffea arabica, L) e do tipo de pré-processamento sobre precursores de voláteis produzidos na torra e suas correlações**. 2009. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- ARRUDA, N.P.; REZENDE, C.M.; COURI, S.; FREITAS, S.P.; SILVA, C.G. Perfil de voláteis, compostos fenólicos, atividade antioxidante e fator de proteção solar em óleo de café extraído por etanol. **Anais da 32º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.** Fortaleza, 2009.

- ARRUDA, N.P.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M.; FREITAS, S. P.; COURI, S.; BIZZO, H. R. Discriminação entre estádios de maturação e tipos de processamento de pós-colheita de cafés arábica por microextração em fase sólida e análise de componentes principais. **Química Nova**, São Paulo, v.34, p.819-824, 2011.

- ARRUDA, N. P.; HOVELL, A. M. C.; FREITAS, S. P.; COURI, S.; BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. Correlação entre precursores e voláteis em café arábica brasileiro processado pelas vias seca, semi-umida e úmida e discriminação através da análise por componentes principais. **Química Nova**. In Press, 2012.

- ASSOCIAÇÃO Brasileira da indústria do café. ABIC. Disponível em: <www.abic.com.br>. Acesso em: 5 maio de 2013.

- AZEVEDO, A. S. B. **Caracterização e aplicação de fibra de borra de café modificada por tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Londrina, Universidade Estadual de Londrina.

- BENDOVÁ, H.; AKRMAN, J.; KREJČÍ, A.; KUBÁČ, L.; JÍROVÁ, D.; KEJLOVÁ, K.; KOLÁŘOVÁ, H.; BRABEC, M.; MALÝ M. In vitro approaches to evaluation of sun protection factor. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n.7, p.1268-1275, 2007.

- BERTRAND, B.; GUYOT, B.; ANTHONY, P.; LASHERMES, P. Impact of the Coffea canephora gene introgression on beverage quality of C. arabica. **Theoretical and Applied Genetics Journal**. v.107, p.387-395, 2003.

- BEVERIDGE, T.; LI, T.S.C.; OOMAH, B.D.; SMITH, A. Sea Buckthorm products: manufacture and composition. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v.47, p. 3480–3488,1999.

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

- BREZOVÁ, V.; SLEBODOVÁ, A.; STAN SKO, A. Coffee as a source of antioxidants: an EPR study. **Food Chemistry**, v. 114, p.859-868, 2009.

- CAMACHO, F. Antiguos y nuevos aspectos de la fotoprotección. **Revista Internacional de Dermatologia e Dermocosmética**, v. 4, n. 7, p. 441-448, 2001.

- CAPRIOLI, G.; CORTESE, M.; CRISTALLI, G.; MAGGI, F.; ODELLO, L.; TOMASSONI, G.; RICCIUTELLI, M.; SAGRATINI, G.; SIROCCHI, V.; VITTORI, S. Optimization of *espresso* machine parameters through the analysis of coffee odorants by HS-SPME-GC/MS. **Food Chemistry,** v.135, p.1127-1133, 2012.

- CASAZZA, A. A.; ALIAKBARIAN, B.; MANTEGNA, S.; CRAVOTTO, G.; PEREGO, P. Extraction of phenolics from Vitis vinifera wastes using non-conventional techniques. **Journal of Food Engineering.** Italy: v.100, p. 50-55, 2010.

- CLARKE, R.; VITZHUM, O.G., Coffee: recent developments. **Blackwell Science Ltd**. Oxford: 2001.

- CLIFFORD, M. N. & WILLSON, K. C. Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage. **Westport Connecticut, Avi Publishing.** cap.13, p.305-374, 1985.

- CLIFFORD, M. N.; S. KNIGHT; B. SURUCU; N. KUHNERT. Characterization by LC–MS of four new classes of chlorogenic acids in coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyl-dimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl dimethoxycinnamoylquinic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 1957–1969, 2006.

- CONTINI, M.; BACCELLONI, S.; FRANGIPANE, M. T.; MERENDINO, N.; MASSANTINI, R. **Journal of Functional Foods**, v. 4 (1), p. 137-146, 2012.

- CORTEZ, J.G. **Efeito de espécies e cultivares e do processamento agrícola e industrial nas características da bebida do café**. 2001. Tese (Doutorado em Agronomia). São Paulo, Universidade de São Paulo.

- DAI, J., MUMPER, R.J., Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules.** v.15, p.7313-7352, 2010.

- DANGELO, Leonardo. **Comparação de métodos de extração e caracterização química da borra de café expresso comercial**. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

- DANTAS FILHO, P.L. **Análise de custos na geração de energia com bagaço de cana-de-açúcar: um estudo de caso em quatro usinas em São Paulo.** 2009. Dissertação. São Paulo, Universidade de São Paulo.

- DE COLMENARES, N.; RAMÍREZ-MARTÍNEZ, J.R.; ALDANA, J.O.; CLIFFORD, M.N. Analysis of proanthocyanidins in coffee pulp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 65, p. 157–162, 2006.

- DIAS, R.C.E.; SCHOLZ, M.B.S.; BENASSI, M.T. Caracterização de espécies de café Arábica e Conilon pelos teores de ácido nicotínico, 5-ACQ, trigonelina e cafeína: Influência do grau de torra na capacidade de discriminação. **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Brasília, 2005.

- ELMORE, J.S.; ERBAHADIR, M.A.; MOTTRAM, D.S. Comparison of dynamic headspace concentration on Tenax with solid phase microextraction for the analysis of aroma volatiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 45, p. 2638-2641, 1997.

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

- FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Plant Physiology**. v.18, p.23-36, 2006.

- FELIPE, M. G. A. **Em bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade sustentabilidade.** 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2010.

- FERRARI, M.; RAVERA, F.; DE ANGELIS, E.; SUGGI LIVERANI, F.; NAVARINI. L. Interfacial properties of coffee oils. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 365, n. 1–3 e 5, p. 79-82, 2010.

- FLAMENT, I.; BRESSIÈRE-THOMAS, I. **Coffee Flavor Chemistry**. New York: John Wiley & Sons Inc, 2002.

- FLOR, J.; DAVOLOS, M.R. Protetores solares. **Química Nova**. v. 30, n.1, p.6, 2007.

- FOLSTAR, P. Lipids. In: CLARKE, R.J. & MACRAE, R. (Eds.). **Coffee: Chemistry**. Londres: Elsevier Applied Science, 1985. p.203-222.

- FORS, S. Sensory properties of volatile Maillard reaction products related compounds: a literature review. **American Chemical Society Symposium Series**, n. 215, p.185-286, 1983.

- FREITAS, S.P.; MONTEIRO, P.L.; LAGO, R.C.A. Extração do óleo da borra do café solúvel com etanol comercial. **I Simpósio de Pesquisa dos cafés do Brasil, Industrialização.** Poços de Caldas. p.740-743. 2000.

- FREITAS, S.P.; LAGO, R.C.A. Dados de equilíbrio para o processo de extração de óleos de café e girassol usando etanol. **Brazilian Journal of Food Technology**. v.10, n. 3, p.220-224, 2007.

- FUCHS, J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha tocopherol, L-ascorbic acid and β-carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radical Biology Medicine**. v. 25, p.848-873, 1998.

- FUSTER, M.D.; MITCHELL, A.E.; OCHI, H.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n.11, p. 5600-5603, 2000.

- GETTY, A. Nestlé ganha rivais nas cápsulas de café *espresso*. **The New York Times**, Nova Iorque, 24 de agosto de 2010.

- GOLD, S.; SEURING, S. Supply chain and logistics issues of bio-energy production. **Journal of Cleaner Production**. Neuchatêl: v.19, p.32-42, 2011.

- GONZALEZ-RIOS, O.; SUAREZ-QUIROZ, M.L.; BOULANGER, R.; BAREL, M.; GUYOT, B.; GUIRAUD, J.P.; SCHORR-GALINDO, S. Impact of ‘‘ecological’’ post-harvest processing on the volatile fraction of coffee beans. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 20, n. 3, p.289-296, 2007.

- GROLLIER, J.F.; PLESSIS, S. Use os coffee bean oil as a sun filter. L’oreal. **Patent 4793990.** US. 17 jan. 1988.

- HAYASE, F. Scavenging of active oxygen by melanoidins. In: **The Maillard Reaction Consequences for the Chemical and Life Sciences**. Chichester: Raphael Ikan Eds., John Wiley & Sons, 1996. p. 89-104.

- HECIMOVIC, I. et al. Comparative study of poliphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. **Food Chemistry**. v. 29, p. 991-1000, 2011.

- HOLT, R.U., Mechanisms affecting analysis of volatile flavor components by solid-phase microextraction and gas chromatography. **Journal of Chromatography**. v.937, p.107-114, 2001.

- INTERNATIONAL coffee organization. Total Coffee Production of Exporting Countries. London, 2012. Disponível em: <www.ico.org/trade_statistics.asp> Acesso em: 23 de abril 2013.

- ILLY, A.; IILY, E.; MACREE, R.; PETRASCO, M.; VIANI, R. ***Espresso* Coffee: The Chemistry of Quality.** New York: Academic Press, 1995.

- JELEN H.H., WLAZLY K., WASOWICZ E., KAMINSKI E. Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer: Comparison with static headspace method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.46, p.1469-1473,1998.

- KAUFMANN, H. P.; HAMSAGAR, R. S. The lipids of the coffee seeds. **Fette Seifen Anstrichmittel**. Berlim: v.64, n.3, p.206-213,1962.

- KIM, K. J.; NAM, M. W. SPME technology and it's application in the coffee andustry. **16th International Scientific Colloquium on Coffee. In Proceedings ASIC,** 1994.

- KOHL JR., E. et al. Extração de óleo de girassol com etanol comercial. In: **Congresso Iberoamericano de Ingenieria de Alimentos**, Valparaiso (Chile), p.152. 2003.

- KOLB, B.; ETTRE, L. S. **Reduce inlet liner ID for Sharper Peaksby SPME/GC Static Headspace–Gas Chromatography. Theory and Practice**. New York: Wiley–VCH Inc., 1997.

- KONDAMUDI, N.; MOHAPATRA, S.; MISRA, M. Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.56, p.11757-11760, 2008.

- LAGO, R. C. A. Lipídios em grãos de café. **B. CEPPA**. Curitiba: v.19, n. 2, jul./dez. 2001.

- LARANJA, A. T.; BICUDO, H. E. M. de C. O uso da cafeína e da borra do café no controle de Aedes aegypti. In: 47º Congresso Nacional de Genética. **Anais...** Águas de Lindóia, 2001.

- LEITE, Sabrina; TEIXEIRA, Luciano; SARTORI, Marco; GARCIA, Giovanni; FILHO, Tarcisio. A compostagem como alternativa para aproveitamento da borra de café. **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia: v.7, n.13, p.1068-1075, 2011.

- LEPELLEY, M.;CHEMINADE, G.; TREMILLON, N.; SIMKIN, A.; CAILLET, V.; MCCARTHY, J. Chlorogenic acid synthesis in coffee: An analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of HCT, HQT, C3H1, and CCoAOMT1 genes during grain development in C. canephora. **Plant Science**. v.172, n. 5, p.978-996, 2007.

- LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T. Cholesterol oxidation: presence of 7-ketocholesterol in different food products. **Journal of Food Composition Analalysis.** Roma. v.13, p.625-631, 2000.

- MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinions in Lipidology**. n. 16, p. 77–84, 2005.

- MANSUR, J.S. et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.61, n.3, mai/jun, 1986.

- MARKIS, D.P.; BOSKOU, G.; ANDRICOPOULOS, N.K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. Italy. v.20, p.125–132, 2007.

- MARTINEZ, I. & LECHA, M. Actualización en fotoprotección. **Revista Internacional Dermatologia e Dermocosmética**. v.5, p.217-220, 2002.

- MASON, H.S. Reactions between quinones and proteins. **Nature**, v.175, p.771-772, 1955.

- MAYER, F.; CZERNY, M.; GROSCH, W. Sensory study of the character impact aroma compounds of a coffee beverages. **European Food research technology**. v.211, p.272-276, 2000.

- MAZZAFERA, P. Oil content of green beans from some coffee species. **Bragantia**. Campinas. v.57, n.1, 1998.

- MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**. v. 52, p. 673–751, 2000.

- MIZSEY, P.; RACZ, L. Cleaner production alternatives: biomass utilization options. **Journal of Cleaner Production**. Alberta. v.18, p.767-770, 2010.

- MONDELLO, L.; COSTA, R.; TRANCHIDA, P.Q.; DUGO, P.; LO PRESTI, M.; FESTA, S.; FAZIO, A.; DUGO, G. Reliable characterization of coffee bean aroma profiles by automated headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry with the support of a dual-filter mass spectra library. **Journal of Separation Science**. v. 28, p.1101-1109, 2005.

- MONTAVON, P.; BORTLIK, K. Evolution of robusta green coffee redox enzymatic activities with maturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 3590-3594, 2004.

- MOON, J.K., SHIBAMOTO, T. Formation of volatile chemicals from thermal degradation of less volatile coffee components: quinic acid, caffeic acid, and chlorogenic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.58, p. 5465-5470, 2010.

- NEBESNY, E.; BUDRYN, G.; KULA, J.; MAJDA, T. The effect of roasting method on headspace composition of robusta coffee bean aroma. **European Food Research and Technology**. v. 225, p. 9-19, 2007.

- NICOLI, M.C.; ANESE, M.; PARPINEL, M.T.; FRANCESCHI, S.; LERICI, C.R. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. **Cancer Letters**. v.114, p.71–74, 1997.

- OLIVEIRA, J.T.G.S.B. **Melhor dose e dose econômica de TBHQ nos óleos de milho e canola.** 2003. Dissertação, Piracicaba.

- PANUSA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; LAVECCHIA, R.; ZUORRO, A.; Recovery of Natural Antioxidants from Spent Coffee Grounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 61, p.4162-4168, 2013.

- PAWLISZYN, J.; GÓRECKI, T.; YU, X. Theory of analytical extraction by selected porous polymer SPME fibres. **Analyst**. v.124, p.643–649, 1999.

- PENTON, Z. E. Sample preparation for gas chromatography with solid-phase extraction and solid phase microextraction**. Advanced Chromatography**. v.37, p.205-236, 1997.

- PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**. v.39, p.791-800, 2006.

- PROCIDA, G.; De PALO, D.; BOGONI, P. Analysis of the volatile constituents of green coffee by headspace GC-Ms. **Riv. Ital. EPPOS**, p.251-261, 1997.

- PUUPPONEN-PIMIA, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KAHKONEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**. v.90, p.494–507, 2001.

- RAMALAKSHMI, K.; RAO, L.J.M.; TAKANO-ISHIKAWA, Y.; GOTO, M. Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. **Food Chemistry.** India. v.115, p.79-85, 2009.

- RAVINDRANATH, R.; YOUSUF ALI KHAN, R.; OBY REDDY, T. THIRUMALA RAO, S.D.; REDDY, B.R. Composition and characteristics of indian coffee bean, spent ground and oil. **Journal of the Science Food and Agriculture.** v. 23, p.307-310, 1972.

- RHODES, L.E. Topical and systemic approaches for protection against solar radiation-induced skin damage. **Clinical Dermatololy**. v.16, p. 75–82, 1998.

- RIBEIRO, R.P. **Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS in vitro em formulações fotoprotetoras comerciais.** 2004. Dissertação. Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH• . . **Comunicado Técnico Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza. v.127, p.1-4, 2007.

- SAMMAN, S.; LYONS, W.P.M.; COOK, N.C. Flavonoids and coronary heart disease: dietary perspectives. In: Flavonoids in health and disease. C. A. R. Evans & L. Packer (Eds.). **Marcel Dekker.** New York. p.469-482, 1998.

- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** v.76, p.270-276, 1998.

- SANTOS, F. A. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol**. Química Nova***.* v.35, n.5, p.1004-1010, 2012.

- SANTOS, P. M. Monitoramento da camada de ozônio (O_3) através de técnicas radiométricas**. Boletim do IG-USP***.* n.6, p.82-84, 1989.

- SAYRE, R. M.; AGIN, P. P.; LEVEE, G. J.; MARLOWE, E. Comparison of *in vivo* and in vitro testing of sunscreening formulas. **Photochemical and Photobiological Sciences**. Oxford, v. 29, p.559-566, 1979.

- SCHAEFER, H.; MOYAL, D.; FOURTANIER, A. **Journal of Dermatological Science**. v.23, n.1, p. 62-74, 2000.

- SCHWARZBACH, J. Aspectos de segurança relacionados ao hexano na extração de óleos vegetais. **Óleos e Grãos**. São Paulo: Aspen. p.27-34, mar/abr. 1997.

- SEMMELROROCH, P.; LASKAWY, G.; LA, I.; GROSCH, W. Detetrmination of potent odorants in roasted coffee by stable isouope dilution assays. **Journal of Flavour and Fragrance**. v.10, p.1-7, 1995.

- SHIGEMATSU, H.; KURATA, T.; KATO, H.; FUJIMAKI, M. Volatile compounds formed on roasting DL-alanine with D-glucose. **Agricultural Biological Chemistry**. v.36, n.9, p.1631-1637, 1972.

- SHIREY, R.E. Optimization of extraction conditions for low-molecular-weight analytes using solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography**. v.38, p.109–116, 2000.

- SILVA, M.A.; NEBRA, S.A.; MACHADO SILVA, M.J.; SANCHEZ, C.G. The use of biomass residues in the brazilian soluble coffee industry. **Biomass and Bioenergy.** Londres. v.14, p.457-467, 1998.

- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

- SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; De FAVERI, M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering.** Italy. v.81, p.200–208, 2007.

- STALMACH, A.; MULLEN, W., NAGAI, C.; CROZIER, A. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v.18, n. 1, p.253-262, 2006.

- STEVENSON, R. J.; CHEN, X. D. A study of volatile “trapping” in spray dried whey protein concentrate by “crushing” and/or vacumming, and detection by solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry. **Food Research International**. v.29 p.495–504, 1996.

- SZPIZ, R. R.; LAGO, R. C. A.; JABLONKA, F. H.; PEREIRA, D. A. Óleos de macaúba: uma alternativa para a oleoquímica. **Comunicado Técnico, Embrapa CTAA**. v.14, p.1-10, 1989.

- TURATTI, J.M. Extração e caracterização de óleo de café. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Vitória, 2001. Resumos expandidos. Brasília: **EMBRAPA Café**, p.1533-1539, 2001.

- UTOMO, H.D.; HUNTER, K.A. Adsorption of divalent copper, zinc, cadmium and lead ions from aqueous solution by waste tea and coffee adsorbents. **Environment Technology**. v. 27, p.25-32, 2006.

- VANDEGINSTE, B. M. G. D. L.; MASSART, L. M. C.; BUYDENS, S.; DE JONG, P. J.; LEWI, J.; SMEYERS-VERBEKE. J. Data handling in science and technology. In: **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics** – Part 20B. Amsterdam: Elsevier. p.145–198, 1998

- VEGRO, C. L. R.; CARVALHO, F. C. Disponibilidade e utilização de resíduos gerados no processamento agroindustrial do café. **Inf. Econ**. v.24, p.9-16, 2006.

- VIEGAS, M.C.; BASSOLI, D.G. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando CG-MS e coluna HP-INNOWAX**. Química Nova**. São Paulo, v.30, n. 8, p.2031-2034, 2007.

- VINSON, J.A.; PROCH, J.; BOSE, P.; MUCHLER, S.; TAFFERA, P.; SHUTA, D.; SAMMAN, N.; AGBOR, G.A. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the european and american diets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v.54, p.8071–8076, 2006.

- WAGEMAKER, T.A.L. **Variabilidade do teor de óleo, de seu fator de proteção solar e de outros componentes da fração lipídica do gênero Coffea visando usos alternativos aos grãos.** 2009. Dissertação – Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo.

- WILBAUX, R. Les caféiers au Congo Belge: technology du café Arabica et Robusta. **Bruxeles, Direction de l'Agriculture des Forest et de l'Elevage**. p.13, 1956.

- WINTGENS, J.N. **Coffee: growing, processing, sustainable production**. 2 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2009.

- XIAOGEN, Y., PEPPARD, T., Solid-Phase microextraction for flavor analysis. **Journal of Agricultural and food chemistry**. v.42, p.1925-1930, 1994.

- YANAGIMOTO, K.; KWANG-GEUM, L.; OCHI, H.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activity of heterocyclic compounds found in coffee volatiles produced from Maillard reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.50, p.5480-5484, 2002.

- YANAGIMOTO, K.; OCHI, H.; LEE, K.G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, p.592-596, 2004.

- YEN, W.J.; WANG, B.S.; CHANG, L.W.; DUH, P.D. Antioxidant properties of roasted coffee residue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, p.2658-2663, 2005.

- ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Headspace solid-phase microextraction. **Analytical Chemistry**. v. 65, p. 1843-1852, 1993.

- ZUORRO, A.; LAVECCHIA, R. Polyphenols and energy recovery from spent coffee grounds. **Chemistry Engineering.** Roma. In Press, 2011.

- ZUORRO, A.; LAVECCHIA, R. Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. **Journal of Cleaner Production**. Roma. In Press, 2012.

- **8. ANEXOS**

8.1 Anexo 1

A determinação espectrofotométrica da atividade antioxidante é realizada a 515 nm (ponto de maior absorbância na curva marcada em lilás). Como se pode observar na Figura 7, a forma radicalar do DPPH• apresenta sua máxima absorção (comprimento de onda máximo) neste comprimento de onda. Já a forma estabilizada do reagente, possui uma absorção muito baixa no mesmo comprimento de onda. Conforme as substâncias antioxidantes do extrato da borra (ou outra matriz em estudo) estabilizam o radical DPPH• , a absorbância da solução controle diminui. A escolha do comprimento de onda correto para um determinado analito é essencial para a seletividade do método em questão.

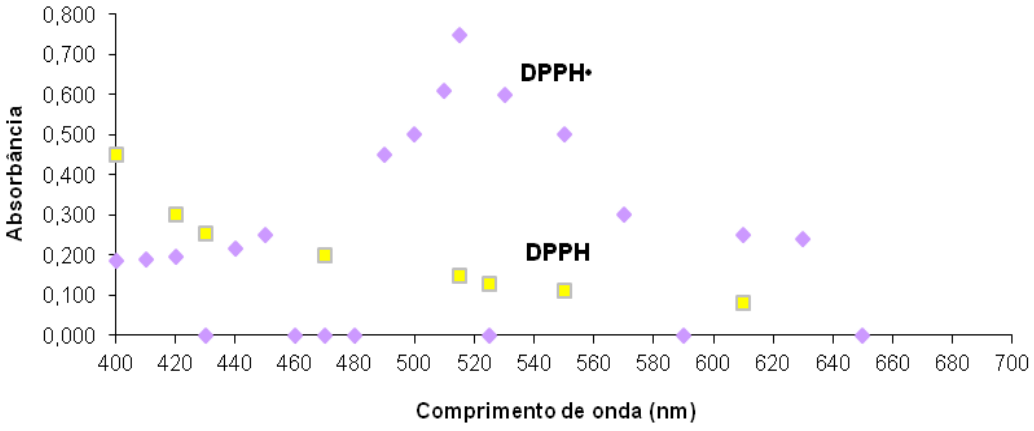

Figura 7: Espectro de absorbância das diferentes formas de DPPH• .

Anexo 2

Para o cálculo final da atividade antioxidante, é imprescindível o conhecimento da quantidade, em massa, do reagente DPPH• . consumido pelo extrato. Para tal, é necessário conhecer esta quantidade na solução controle, que reage com a amostra. A Figura 8 ilustra a curva de calibração do reagente DPPH• . (Abs x Concentração) no comprimento de onda 515 nm.

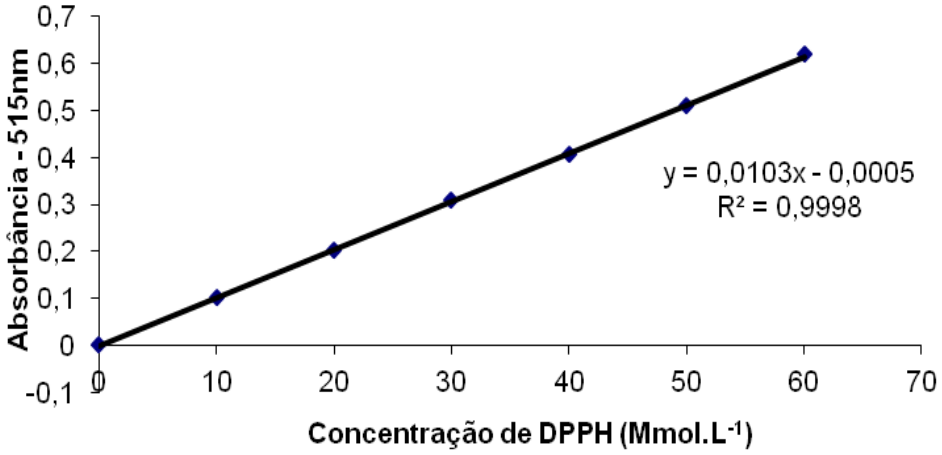

Figura 8: Curva Analítica de DPPH•.

Anexo 3

A curva analítica obtida quando se reage a amostra com a solução de DPPH• . é uma função linear inversa. A relação observada é absorbância de DPPH• . *versus* concentração de extrato. Portanto, quando a concentração do extrato aumenta, maior é a quantidade de substâncias antioxidantes que estabilizam os radicais livres presentes no reagente, causando um decaimento na absorbância da solução do reagente. É importante ressaltar que, mesmo tratando-se de uma relação inversa, os cálculos quantitativos em espectrofotometria seguem a lei de Lambert-Beer e, portanto, há uma faixa delimitada onde este decaimento é linear com o aumento da concentração de antioxidantes.

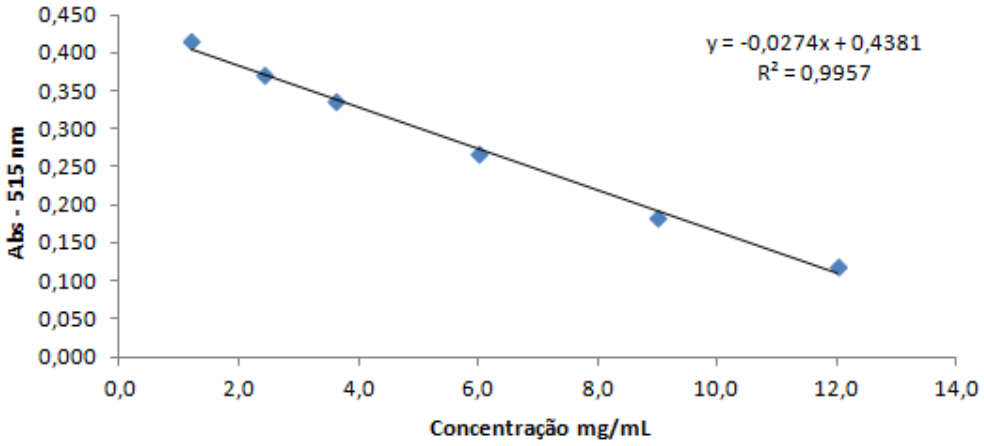

Figura 9: Curva de DPPH• . + extrato etanólico (60 min)