

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

MICHEL ROCHA BAQUETA

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS
DO RESÍDUO CASCA DE CAFÉ**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2016

MICHEL ROCHA BAQUETA

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS DO RESÍDUO CASCA DE CAFÉ

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, do Departamento Acadêmico de Alimentos – DALIM – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Campo Mourão, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Vitória Leimann

Co-orientador: Prof. Dr. Bogdan Demczuk Junior

CAMPO MOURÃO

2016



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Campo Mourão



TERMO DE APROVAÇÃO

EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS DO RESÍDUO CASCA DE CAFÉ

por

MICHEL ROCHA BAQUETA

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado dia 30 de Novembro de 2016, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Fernanda Vitória Leimann
(Orientador)

Prof. Dr. Bogdan Demczuk Junior
(Co-orientador)

Profa. Dra. Patrícia Valderrama

Prof. Dr. Rafael Porto Ineu

Nota: O documento original e assinado pela banca examinadora encontra-se na Coordenação do Curso de Tecnologia em Alimentos da UTFPR câmpus Campo Mourão.

*Aos meus pais e à minha avó,
Antonieta Gomes Rocha (in memoriam),
por estarem sempre comigo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Santíssima Trindade por tantas graças recebidas, pela força, coragem e amparo nos momentos mais difíceis ao longo da graduação e realização deste trabalho. Agradeço também a Maria Santíssima por sempre me guiar.

Aos meus pais, Pedro Baqueta e Marlene Rocha Baqueta e a minha irmã, Lilian R. Baqueta, que sempre foram meu apoio, acreditando em minha capacidade e estando sempre comigo. Agradeço pelo incentivo, paciência, amor e por tudo que me ensinaram.

À minha professora orientadora Dra. Fernanda Vitória Leimann e ao meu professor co-orientador Dr. Bogdan Demczuk Junior, agradeço pela confiança, paciência, atenção, colaboração e por todos os conhecimentos transmitidos ao longo da realização deste trabalho.

À Dra. Aline Coqueiro por tanto colaborar para a realização deste trabalho. Obrigado por todos os conhecimentos compartilhados, pela paciência e por não medir esforços para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Aos colaboradores deste trabalho, mestrandas Jéssica Thaís e Thaysa, a mestre Adrielle Rodrigues e ao Prof. Dr. Edmilson, agradeço por colaborarem com a realização e auxílio em parte das análises.

Aos servidores do laboratório C004 da UTFPR – Câmpus Campo Mourão, Marcos Vieira e Vanessa Rodrigues, agradeço pelo auxílio.

Aos amigos e amigas que conheci durante essa caminhada, em especial as que estiveram comigo desde o início, Érika, Daniele, Jaqueline e Taislaine, obrigado pela amizade, apoio e pelos momentos que passamos juntos. A Julian, agradeço pela amizade e por toda ajuda prestada quando necessitei.

À Coamo Agroindustrial Cooperativa agradeço por conceder as amostras e equipamentos para a realização deste trabalho.

Agradeço aos membros da banca pela participação e contribuições e a todos os professores do Departamento Acadêmico de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pelos ensinamentos durante o curso.

A todos os meus familiares e amigos, que, embora não tenham sido mencionados individualmente, têm minha gratidão.

*Nunca, jamais desanimeis,
embora venham ventos contrários.*

Santa Paulina

RESUMO

BAQUETA, Michel Rocha. Extração e caracterização de compostos do resíduo casca de café. 2016. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.

O Brasil é o maior produtor e exportador de café o que acarreta em um grande volume de resíduos gerados durante seu beneficiamento. No beneficiamento dos grãos a quantidade de resíduo (principalmente casca) constitui aproximadamente 50% da produção. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi obter extratos das cascas de café utilizando diferentes solventes, avaliar sua composição em termos de cafeína e avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos. Para as extrações, realizadas por Soxhlet, utilizando solventes de diferentes polaridades e seletividades, pode-se observar pelos resultados das análise de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de massas (CG-MS) e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) que os extratos obtidos em diferentes solventes diferem em composição química e que o clorofórmio e o diclorometano foram os únicos que extraíram a cafeína, sendo o extrato clorofórmico o de maior rendimento. A composição hidrofílica dos componentes foi avaliada utilizando-se quatro diferentes proporções entre etanol e água (EtOH: 80, 60, 40 e 20%) para as extrações e duas temperaturas de extração, a frio (20-25 °C) e a quente (40 °C). Observou-se que a variação da proporção entre etanol e água e da temperatura de extração basicamente não alteraram a composição química dos extratos, porém levaram a uma diferença na quantidade de cafeína extraída, composto majoritário, sendo a extração a frio com 40% de etanol a que apresentou melhor rendimento com relação a esta substância (0,118 mg.mL⁻¹). Avaliou-se a atividade antimicrobiana dos extratos oleosos pelo método de disco-difusão e do extrato hidroetanólico com maior concentração de cafeína pelo método de determinação da concentração inibitória mínima. Entre os resultados obtidos, não foi observado efeito inibitório contra nenhum dos microrganismos avaliados. Desta forma, pode-se concluir que as cascas de café apresentam grande potencial para a extração de cafeína, agregando valor a este resíduo vegetal e contribuindo para o aproveitamento dos resíduos produzidos no beneficiamento do café o que diminuiria o impacto ambiental gerado pelo descarte dos mesmos.

Palavras-chave: Casca de café; extrato oleoso; extrato hidroetanólico; cafeína; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

BAQUETA, Michel Rocha. Extraction and characterization of the compounds of coffee husk, an industry residue. 2016. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2016.

Brazil is the largest coffee producer and exporter in the world, but this great production also generates enormous volumes of waste materials during the process of separating the commercial product. The amount of coffee husk produced during the processing of the coffee beans represents 50% of the production. Looking at this problem, the aim of this study was to obtain extracts of coffee husks using different solvents, evaluate their composition in terms of caffeine, and evaluate the antimicrobial activity of the extracts obtained. For the extractions made by Soxhlet, using solvents of different polarities and selectivities, it can be observed from GC-MS, FTIR results that the extracts obtained in different solvents differ in the chemical composition, and that chloroform and dichloromethane were the only ones that extracted the caffeine, being the most efficient chloroform extract. The hydrophilic extracts were obtained using different ratios between ethanol and water, and extractions at room temperature and at 40 °C. Changes in the solvent proportions did not change the chemical profile of the extracts obtained, however changed the amount of caffeine extracted. Caffeine was the major compound extracted and the best condition for its extraction was at room temperature with 40% of ethanol solution. Antimicrobial activity of the lipophilic extracts was evaluated by disk diffusion method and the extract obtained with 40% ethanol the activity was evaluated using the minimum inhibitory concentration method. None of the extracts showed antimicrobial activity against the bacteria tested. It can be concluded in this work that the coffee husks show considerable amount of caffeine and could be used to the extraction of this compound, contributing to the transformation of this vegetable waste into a value added product and could help to reduce the environmental impact generated by the disposal of this toxic residue.

. Thus, it can be concluded that coffee husks have great potential for caffeine extraction, adding value to this vegetable waste and contributing to the recovery of waste produced in the coffee processing which would decrease the environmental impact generated by the disposal thereof.

Key-words: coffee husks; oily extract; hydroethanolic extract; caffeine; antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - Estrutura do grão de café. | 20 |
| FIGURA 2 - Etapas do processamento de café, por via seca e úmida. | 21 |
| FIGURA 3 - Estruturas químicas da cafeína (a) e do ácido clorogênico (b). | 25 |
| FIGURA 4 - Cromatogramas de CG-MS (EI) dos extratos oleosos das cascas de café extraídos por solventes de diferentes polaridades. | 35 |
| FIGURA 5 - Espectros de FTIR dos extratos da casca de café obtidos com os diferentes solventes orgânicos (indicação em verde bandas características do ácido clorogênico, em azul da cafeína e em preto bandas comuns aos dois compostos). .. | 36 |
| FIGURA 6 - Estruturas químicas da cafeína (a) e do ácido clorogênico (b). | 36 |
| FIGURA 7 - Comparação dos perfis cromatográficos para os extratos obtidos na extração a frio utilizando diferentes proporções de EtOH e H ₂ O em CLAE-DAD (λ 271 nm). | 40 |
| FIGURA 8 - Comparação dos cromatogramas obtidos utilizando diferentes proporções da mistura etanol-água nas extrações obtidas pelo método a frio (A) e a quente (B). | 41 |
| FIGURA 9 - Curva padrão para determinação de cafeína. | 42 |
| FIGURA 10 - Cromatograma de comparação da quantificação da cafeína nas cascas e grãos de café na melhor condição de extração (EtOH 40% a frio) (λ 273 nm). | 44 |
| FIGURA 11 - Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos obtidos com EtOH 40% a frio. Comparação do perfil em 273 nm e 306 nm do extrato das cascas de café (A) e comparação do perfil em 273 nm e 306 nm do extrato dos grãos de café (B). .. | 45 |
| FIGURA 12 - Comparação do perfil cromatográfico do extrato EtOH 40% obtido pela extração a frio das cascas de café e dos grãos de café. Comparação dos perfis dos extratos obtido das cascas e grãos em 271 nm com o espectro de UV e identificação de cafeína (A) e do dos perfis obtidos em 306 nm com espectro de UV e identificação do ácido clorogênico. | 46 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - Rendimento médio das extrações de óleo utilizando diferentes solventes. | 33 |
| TABELA 2 - Bandas de absorção identificadas nos espectros de FTIR dos extratos de casca de café. | 37 |
| TABELA 3 - Concentrações de cafeína utilizadas na construção da curva de calibração. | 42 |
| TABELA 4 - Comparação da extração da cafeína utilizando diferentes proporções de etanol e água nos métodos a frio e a quente pela média das áreas dos picos (n=3) da cafeína em $\lambda = 273$ nm e concentração de cafeína nos diferentes extratos. | 43 |
| TABELA 5 - Comparação da extração da cafeína utilizando EtOH 40% no método a frio pela média das áreas dos picos (n=3) da cafeína em $\lambda = 273$ nm e concentração de cafeína nos diferentes extratos. | 44 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 17 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 17 |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 19 |
| 3.1 O CAFÉ..... | 19 |
| 3.2 PROCESSAMENTO DE CAFÉ..... | 20 |
| 3.3 CASCA DE CAFÉ | 22 |
| 3.4 UTILIZAÇÃO DA CASCA DE CAFÉ | 23 |
| 3.5 ÁCIDO CLOROGÊNICO E CAFEÍNA | 24 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 26 |
| 4.1 MATÉRIA-PRIMA..... | 26 |
| 4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS | 26 |
| 4.3 EXTRAÇÃO DE ÓLEO POR SOXHLET | 26 |
| 4.4 PERFIL DOS EXTRATOS OLEOSOS E IDENTIFICAÇÃO DE CAFEÍNA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-MS)..... | 27 |
| 4.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)..... | 28 |
| 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS OLEOSOS POR DISCO-DIFUSÃO | 28 |
| 4.7 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS POLARES DAS CASCAS DE CAFÉ | 29 |
| 4.8 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS POR CLAE-DAD | 30 |
| 4.9 QUANTIFICAÇÃO DA CAFEÍNA NOS EXTRATOS POR CLAE-DAD | 30 |
| 4.10 COMPARAÇÃO DO TEOR DE CAFEÍNA EXTRAÍDO DAS CASCAS E DOS GRÃOS DE CAFÉ..... | 31 |
| 4.11 DETERMINAÇÃO <i>in vitro</i> DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DA CASCA DE CAFÉ | 31 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 5.1 EXTRAÇÃO DE ÓLEO EM SOXHLET | 33 |
| 5.2 IDENTIFICAÇÃO DE CAFEÍNA NOS EXTRATOS OLEOSOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-MS)..... | 34 |
| 5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)..... | 35 |
| 5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS OLEOSOS POR DISCO-DIFUSÃO | 38 |
| 5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS POR CLAE-DAD | 39 |
| 5.6 QUANTIFICAÇÃO DA CAFEÍNA NOS EXTRATOS POR CLAE-DAD | 41 |
| 5.7 COMPARAÇÃO DO TEOR DE CAFEÍNA NAS CASCAS E GRÃOS DE CAFÉ | 43 |
| 5.8 COMPARAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DAS CASCAS E GRÃOS DE CAFÉ | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 5.9 DETERMINAÇÃO <i>in vitro</i> DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DA CASCA DE CAFÉ..... | 46 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 49 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 50 |

1 INTRODUÇÃO

Atualmente no Brasil, maior produtor e exportador mundial de café, além de segundo maior consumidor do produto, são cultivadas duas espécies de café, a *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. Estas espécies também são conhecidas como café arábica e café robusta ou conilon, respectivamente, e a área plantada no país corresponde a 2.251.968,2 de hectares. Com base na quantidade total de sacas produzidas no Brasil que é de aproximadamente 20 milhões, cerca de 46,25%, o que representa quase a metade da produção, são destinadas ao consumo interno. Avaliando a produção mundial, o Brasil é considerado o responsável por 30% do mercado internacional (USDA, 2015; ABIC, 2016; BRASIL, 2016). Dentre as principais regiões produtoras de café no país, a região Sudeste apresentou a maior produção na safra de 2014, destacando o estado de Minas Gerais como maior produtor, seguido pelos estados do Espírito Santo, Bahia, Rondônia, Goiás e Paraná (CONAB, 2014; ABIC, 2016).

O processamento do café pode ser realizado por dois diferentes processos, através de via seca ou por via úmida, gerando diferentes resíduos. O processo em via úmida consiste na utilização de água para retirada da casca e polpa do fruto, seguida pela secagem e produção do café denominado pergaminho, dando continuidade as demais etapas durante o beneficiamento. No processamento em via seca, que apresenta uma técnica mais simples comparada ao processo em via úmida, tanto no ponto de vista tecnológico quanto na geração de resíduos, a etapa de secagem é realizada diretamente nos grãos recebidos, ao contrário da via úmida, gerando o café em coco para o posterior processo de beneficiamento (YOSHIDA, 2005).

Considerando essas etapas, tanto em via seca, quanto em via úmida, são realizados outros processos que pertencem à fase de beneficiamento dos grãos, como: a limpeza, retirada da casca, que torna-se a principal via de produção de resíduo, a classificação e o armazenamento na forma de grãos verdes. Entretanto, esses processos de beneficiamento originam resíduos diferentes. Na despulpa por via seca, o resíduo obtido é constituído por casca, polpa e pergaminho. Quando a despulpa é realizada por via úmida, o resíduo inicial é composto por polpa e casca, e após a secagem dos grãos, são retirados os pergaminhos, presentes em 12% dos frutos secos colhidos, originando ainda mais resíduos (BRUM, 2007).

De acordo com Fernandes (2007), Brum (2007), Lima et al. (2013) e CONAB (2016), com base nos processos utilizados para o beneficiamento dos grãos de café, o principal método utilizado para beneficiamento de grãos de café no Brasil é por via seca, tendo este processo elevado potencial na geração de resíduos agroindustriais, que ao serem dispostos inadequadamente, podem afetar o meio ambiente, causando a poluição de solos e águas.

A estrutura dos grãos de café é geralmente formada pelo epicarpo (casca), mesocarpo (polpa ou mucilagem), endocarpo (pergaminho) e a película (BRUM, 2007). No beneficiamento dos grãos de café, a quantidade de resíduo (casca) constitui aproximadamente 50% da produção, isto é, a quantidade de café beneficiado é similar à quantidade de resíduos gerados por meio de seu beneficiamento (ZOCA, 2012). Dessa forma, considerando que na safra de 2015 foram beneficiadas 43,24 milhões de sacas de café (CONAB, 2016), estima-se que foram gerados aproximadamente 2,58 milhões de toneladas de casca de café.

A composição química da casca do café, proveniente do método de via seca, caracteriza-se por sua riqueza em nutrientes e metabólitos secundários incluindo substâncias como cafeína, taninos e polifenóis (FERNANDES, 2007). Analisando a composição química da casca de café, Brand et al. (2000) obtiveram os seguintes percentuais mássicos: 11,98% de umidade, 31,86% de fibras, 26,50% de açúcares totais, 1,50% de lipídeos, 6,03% de cinzas, 11,70% de proteína; 9,30% de taninos e 1,20% de cafeína. De acordo com os valores encontrados na literatura, percebe-se que os dados apresentam certas variações na quantificação dos constituintes da casca de café, sendo que estas, segundo Yoshida (2005), podem ser vinculadas as diferenças na composição das espécies analisadas e por se tratar de um resíduo industrial proveniente de processamento e armazenamento diferentes, importante fator de alteração na composição das cascas de café.

Segundo Gonçalves, Filho e Menezes (2005), alguns extratos vegetais apresentam substâncias com propriedades antimicrobianas, encontrando-se entre estas os compostos fenólicos e os alcaloides. Para Almajano et al., (2008) a maioria dos compostos fenólicos possuem atividade antimicrobiana e estudos (CAMPOS; COLTO; HOGG, 2003; TAGURI; TANAKA; KOUNO, 2004) têm investigado os efeitos dos polifenóis sobre agentes patogênicos intestinais. No entanto, são relatadas contradições quanto às espécies que são inibidas por tais compostos. Rodrigues et al. (2015) explica que a tolerância das bactérias aos compostos fenólicos depende

das espécies bacterianas e da estrutura do polifenol. Entre os compostos fenólicos encontrados em grãos de café, estão os ácidos hidroxicinâmicos, sendo estes os componentes majoritários. O ácido hidroxicinâmico mais comum encontrado nos grãos de café é o ácido clorogênico (ANDRADE, 2011).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina), um alcaloide do grupo das xantinas, apresenta atividades biológicas importantes, tais como atividade antioxidante e antimicrobiana (ANDRADE, 2011). Fardiaz (1995) avaliou o efeito de extratos de café em diferentes concentrações sobre o crescimento de alguns microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bolores e leveduras. Entre os microrganismos avaliados, a cafeína contribuiu para a atividade antimicrobiana dos extratos, entretanto, em pequenas concentrações pode-se observar que esta pode estimular o crescimento de certas bactérias tais como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Streptococcus faecalis*.

Assim, os resíduos de uma forma geral, podem conter substâncias reutilizáveis de alto valor, possíveis de serem convertidas em produtos comerciais, por meio de tecnologias adequadas (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003). Neste sentido, torna-se importante avaliar os diferentes compostos presentes nas cascas de café, resíduo agroindustrial tão abundante no Brasil, visando agregar valor comercial aos seus extratos. Assim, o objetivo deste estudo foi realizar a extração dos constituintes das cascas de café, com diferentes solventes e traçar os perfis dos componentes lipofílicos e hidrofílicos utilizando diferentes técnicas. Objetivou-se também a determinação do maior número possível de constituintes desta matriz, bem como a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos. Este estudo teve como intenção o possível reaproveitamento deste resíduo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter extratos das cascas de café utilizando diferentes solventes, avaliar sua composição em termos de cafeína e avaliar a atividade antimicrobiana desses extratos obtidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a extração de frações oleosas das cascas de café utilizando diferentes solventes orgânicos apolares e calcular seus respectivos rendimentos;
- Caracterizar as amostras de óleo de casca de café por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR);
- Identificar cafeína nas amostras de óleo utilizando Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS);
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos contra microrganismos Gram-positivos (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e a Gram-negativos (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*);
- Extrair compostos fenólicos da casca de café com soluções hidroetanólicas de diferentes concentrações, a quente e a frio;
- Identificar e quantificar os compostos dos extratos hidroetanólicos das cascas de café por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD);
- Utilizar a metodologia de extração hidroetanólica que proporcionar o melhor rendimento dos compostos de interesse e, comparar o seu teor com o extrato correspondente obtido dos grãos de café;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico que proporcionar o maior teor de compostos de interesse contra microrganismos Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativos (*Salmonella typhimurium*, e

Escherichia

Coli).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O CAFÉ

O café teve sua origem na Etiópia, fazendo parte da vegetação natural deste local. Os primeiros relatos sobre a existência do café são há cerca de mil anos, onde foram observados seus efeitos quando seus grãos eram consumidos. A Arábia foi responsável pela difusão dessa cultura, tornando o café conhecido como “vinho da Arábia”, ao ser recebido na Europa no século XIV. Anteriormente, os frutos eram consumidos *in natura*, mudando tal característica somente após o século XVI, onde os primeiros grãos foram torrados e posteriormente utilizados na preparação da bebida atualmente consumida (ABIC, 2016).

Como uma importante matéria-prima para o comércio internacional, o café é umas das bebidas mais consumidas e apreciadas em todo mundo, não apenas por suas características sensoriais, mas também por seu efeito estimulante. A composição química da bebida varia de acordo com a espécie de café utilizada, sendo que as espécies mais comuns são a *Coffea arabica*, que corresponde a cerca de 70% da produção mundial, e a *Coffea canephora* (robusta) mais de 25%. O que difere tais espécies são suas características sensoriais, físicas e químicas, sendo que o aroma e o sabor do café arábica são mais apreciados do que os do café robusta, e por isso, mais valorizado comercialmente (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

Dentre as principais regiões produtoras de café no Brasil, a região Sudeste apresentou a maior produção na safra de 2014, destacando o estado de Minas Gerais como maior produtor, seguido pelos demais estados do país, Espírito Santo, Bahia, Rondônia, Goiás e Paraná (ABIC, 2016; CONAB, 2014). De acordo a Organização Internacional do Café (2016), nesta safra, a produção brasileira de café totalizou 45,64 milhões de sacas de 60 kg, apresentando maior quantidade na produção, comparada a safra de 2015, onde a produção foi de 43,24 milhões de sacas. Indicando um aumento na produção cafeeira para safra de 2016 no Brasil, a estimativa da produção para essa safra é de que o país deverá colher entre 49,13 e 51,94 milhões de sacas de 60 kg de café beneficiado, apresentando um acréscimo de 13,6% a 20,1% na produção (CONAB, 2016).

A produção mundial de café na safra de 2014 foi de 149,54 milhões de sacas de 60 kg, tendo a produção aumentada para 150,12 milhões de sacas na safra de 2015. Os principais países produtores são Vietnã, Colômbia, Indonésia e Etiópia, atrás do Brasil, que se mantém como maior produtor mundial (USDA, 2015).

3.2 PROCESSAMENTO DE CAFÉ

O fruto de café divide-se em duas partes: a casca e a semente. A estrutura dos grãos de café, especialmente o cereja, é formada pelas seguintes frações com base na matéria seca: 29% de epicarpo (casca), 5% de mesocarpo (polpa ou mucilagem), 12% de endocarpo (pergaminho) e 54% de semente. Assim, a casca representa 46% da matéria seca do grão, como ilustrado na Figura 1 (FERNANDES, 2007; YOSHIDA, 2005).

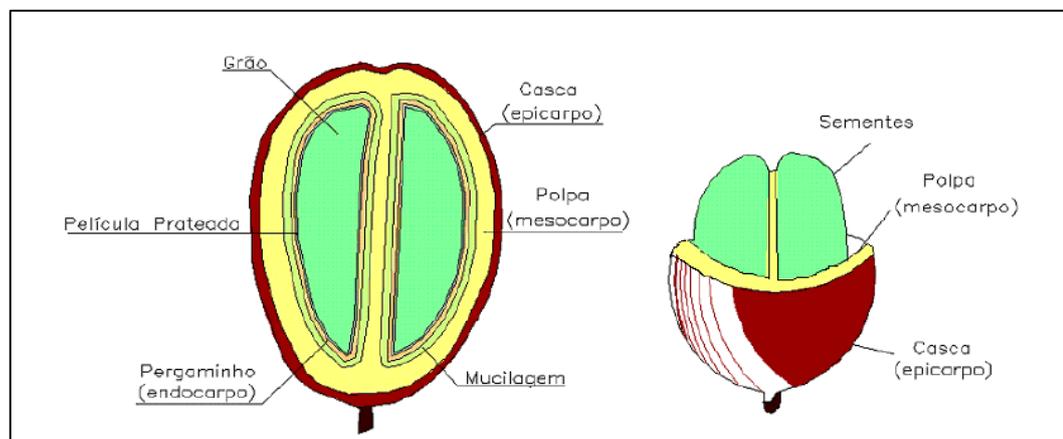


Figura 1 - Estrutura do grão de café.
Fonte: Fernandes (2007).

Atualmente, a utilização de resíduos agroindustriais tem apresentando crescimento considerável por conterem substâncias de valor agregado e pelo fato de minimizarem o impacto ambiental, conseqüente pelo descarte desses resíduos. Para isso, ao longo dos anos, estudos como o de Fernandes (2007), vêm sendo realizados, visando à utilização destes subprodutos através de processos que auxiliem na obtenção de compostos presentes nestes resíduos. Assim, é crescente o interesse de

pesquisas que visem estudar a utilização dos resíduos formados durante todo o processamento de café, pois apenas 6% são destinados a produção de café moído, sendo os outros 94% considerados subprodutos, como casca, polpa e água de lavagem.

O café pode ser processado por duas maneiras. O método de via seca, mais utilizado no Brasil, consiste de uma fase de secagem do fruto seguido por descascamento mecânico e o método por via úmida, onde o café é despulpado e posteriormente seco e então descascado mecanicamente (SANTOS et al., 2007). Na Figura 2 são apresentadas as etapas do processamento de café, pelo método em via seca e via úmida, indicando-se onde há geração de casca.

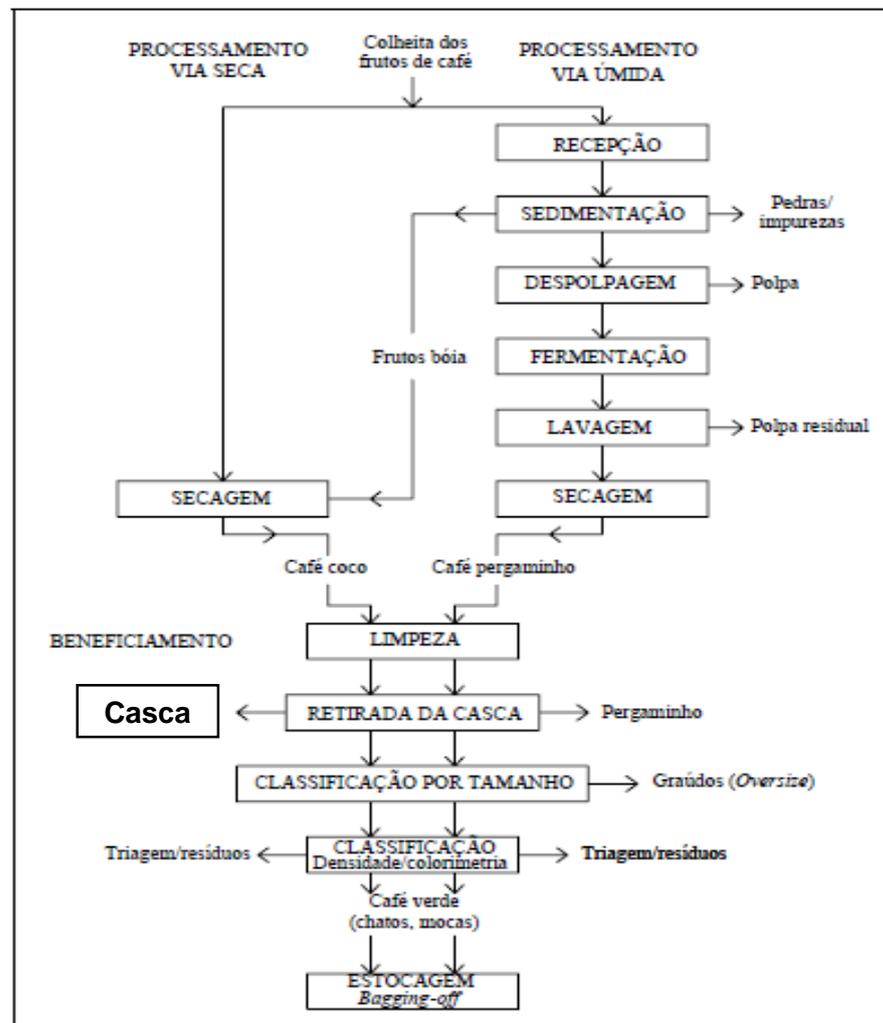


Figura 2 - Etapas do processamento de café, por via seca e úmida.
Fonte: Yoshida (2005).

3.3 CASCA DE CAFÉ

A composição química da polpa de café é diferente da casca. No entanto, a natureza dos constituintes é consideravelmente similar. Os percentuais desses constituintes da casca podem variar de acordo com a variedade de café, as condições de cultivo, como o tipo de solo, o processamento e sua eficiência. Embora a casca de café tenha aplicação como ração na alimentação de animais, a presença em elevada quantidade de componentes tóxicos aos animais, tais como a cafeína, taninos e polifenóis, torna esse resíduo um elemento com fatores antinutricionais (SOCCOL, 2002; PANDEY et al., 2000).

Basicamente, a composição das cascas de café é constituída pelo teor de umidade e quantidade de fibras, açúcares totais, lipídeos, cinzas, proteína, taninos e de cafeína. Como apresentado anteriormente, nota-se que na literatura, os dados da composição química das cascas de café não são consistentes, devido à diferença no teor de alguns constituintes encontrados (FERNANDES, 2007; SOCCOL, 2002).

Segundo Soccol (2002), a composição química da casca de café em base seca, apresenta 57,8% de carboidratos, 9,2% de proteínas, 2% de lipídeos, 1,3% de cafeína, 4,5% de taninos e 12,4% de pectina. Como os teores destes compostos podem variar de acordo com a variedade do café e alguns outros fatores, como solo e forma de cultivo, notam-se diferenças nos percentuais de taninos encontrados por Brand et al. (2000) numa determinada variedade de casca de café comparado ao teor de taninos encontrado por Filho et al. (2000) para outra variedade de café que, por sua vez, diferem dos dados encontrados por Soccol (2002) em seu trabalho. Embora nestas variedades de café possam ser observadas diferenças na quantificação dos taninos, os percentuais se mantêm estáveis para os valores de cafeína e de lipídeos para a maioria das variedades de café, variando entre 1,2 a 1,3% de cafeína e 1,5 a 2% de lipídeos.

3.4 UTILIZAÇÃO DA CASCA DE CAFÉ

Embora a casca de café possa ser considerada um resíduo sem utilidade, no Yemen ocorre o contrário. Neste país, as cascas de café possuem maior valor econômico que os grãos. As cascas são importadas e utilizadas na produção de uma variedade de chás, bebida conhecida como “*earthy herb*” e referida como “*qahwa*”, pela população (FERNANDES, 2007).

Pesquisas relacionadas ao aproveitamento das cascas de café são de grande interesse. Assim, esses estudos demonstram que as cascas de café são um resíduo que apresenta abrangente potencial de utilização. Em 2007, Fernandes realizou a extração e purificação de cafeína das cascas de café, avaliando a influência do diâmetro das partículas das cascas submetidas ao método de extração com relação à quantidade de cafeína extraída. Andrade (2011) avaliando a atividade antioxidante de extratos obtidos das cascas de café identificou que os principais componentes da casca de café, são a cafeína e o ácido clorogênico.

Vegro e Carvalho (1994) verificam diferentes aplicações para as cascas de café. Dentre elas, a utilização como combustível com poder calorífico de $3.500 \text{ kcal.kg}^{-1}$, o qual é economicamente interessante. Outras aplicações, citadas pelos mesmos autores, demonstram algumas utilizações deste resíduo, tais como: utilização como carvão, adubo orgânico e complementação de ração animal. Soccol (2002) buscou realizar a detoxificação do resíduo para aplicação em ração animal. Assim, o material detoxificado proporcionaria um substrato eficiente para a produção de produtos com maior valor agregado como enzimas, ácidos orgânicos, aromas e como substrato para produção de cogumelos comestíveis, etc.

Dessa forma, nota-se a importância de serem desenvolvidos estudos que além de determinarem a composição química da casca de café, possam ser relacionados com atividades funcionais que esses constituintes apresentem (BAGGIO et al., 2007).

3.5 ÁCIDO CLOROGÊNICO E CAFEÍNA

Os ácidos clorogênicos pertencem à família de ésteres formados por alguns ácidos hidroxinâmicos e por ácido quínico. O ácido cafeico juntamente com o ácido quínico formam um éster denominado de ácido clorogênico, que é um polifenol, acompanhado pela catequina, epicatequina, quercitina, rutina e outros. A principal fonte de compostos fenólicos são os alimentos de origem vegetal, sendo o ácido clorogênico o composto fenólico mais presente. Entre os ácidos clorogênicos, o ácido 5-cafeoilquínico é o mais comum encontrado e mais conhecido dos fenóis dietéticos com atividade biológica (CLIFFORD, 2000; JOHNSTON et al., 2003; GARAMBONE; ROSA, 2007).

O café, entre os alimentos que são fontes de ácidos clorogênicos, é uma das bebidas mais consumidas no mundo, tendo seus polifenóis quase que inteiramente como ácido clorogênico (GARAMBONE; ROSA, 2007). Considerando sua atividade biológica, estudos têm demonstrado que a maioria dos compostos fenólicos apresenta alguma atividade antimicrobiana, sendo seus efeitos avaliados sobre microrganismos patogênicos. Quanto à propriedade de inibição, a resistência das bactérias aos compostos fenólicos depende da estrutura do polifenol e das espécies bacterianas testadas (CAMPOS; COLTO; HOGG, 2003; TAGURI; TANAKA; KOUNO, 2004; ALMAJANO et al., 2008, RODRIGUES et al., 2015).

Os alcaloides são compostos orgânicos contendo pelo menos um átomo de nitrogênio de caráter básico no anel heterocíclico, sendo que a maioria possui atividades farmacológicas e fisiológicas observadas no organismo. Dentre os metabólitos secundários, as metilxantinas são derivadas do nucleotídeo purina e conhecidos como alcaloides purínicos. A cafeína (1,3,7 trimetilxantina) é a metilxantina encontrada em maior quantidade na natureza, seguida pela treobomina (3,7 dimetilxantina). Ainda, outros compostos em pequenas quantidades, como a teofilina (1,3 dimetilxantina), podem ser intermediários da biossíntese e/ou catabolismo da cafeína. Além da presença desses compostos no café, outros alimentos como chás, cacau e guaraná também apresentam estes mesmos componentes (ASHIHARA; SUZUKI, 2004, ANDRADE, 2011).

Nos últimos anos alguns estudos têm sido realizados para verificar as propriedades antimicrobianas de compostos presentes no café. Existem na literatura,

pesquisas em que as atividades antimicrobianas de compostos do café foram avaliadas separadamente frente a diferentes microrganismos, tanto Gram-positivos quanto Gram-negativos (DAGLIA et al., 1994). Em seu trabalho, Almeida et al. (2005) verificaram que o ácido clorogênico e protocatecuico, metabólitos secundários presentes no café, apresentaram efeito antibacteriano frente as enterobactérias investigadas, exceto para *Citrobacter freundii*. Ainda, observaram que a cafeína numa concentração de 8 mg.mL⁻¹ apresenta melhor efeito de inibição para *Salmonella choleraesuis*, concluindo que a cafeína e outros compostos do café são potenciais agentes antimicrobianos naturais contra enterobactérias.

Além da presença de certa quantidade de cafeína nos grãos de café, a cafeína é encontrada em outros produtos vegetais, como no chá verde (*Camilla sinensis*), guaraná (*Paullinia cupana*), cacau (*Theobroma cocoa*) e erva-mate (*Ilex paraguayensis*) (MARIA; MOREIRA, 2007). Para exemplificar esses compostos, na Figura 3 são apresentadas as estruturas química do ácido clorogênico e da cafeína.

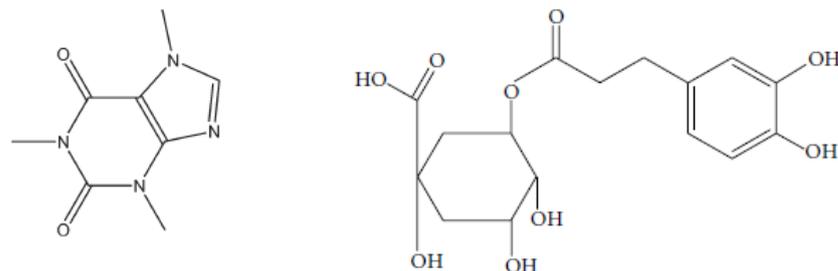


Figura 3 - Estruturas químicas da cafeína (a) e do ácido clorogênico (b) Fonte: (CLAUDIO et al., 2013; MENG et al., 2013).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

As cascas de café utilizadas para a realização deste estudo foram fornecidas pela Coamo Agroindustrial Cooperativa, localizada na cidade de Campo Mourão – Paraná, resultantes do beneficiamento de grãos, provenientes de uma mistura das variedades arábica e conilon plantadas na região, da safra de 2015.

4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

As cascas de café foram homogeneizadas e trituradas em moinho de facas, modelo Solab, com o diâmetro das partículas de 0,85 mm, embaladas e armazenadas em congelador até a realização dos experimentos. As cascas de café foram utilizadas em base úmida.

4.3 EXTRAÇÃO DE ÓLEO POR SOXHLET

A extração de frações oleosas da casca de café foi realizada no sistema de extração Soxhlet com circuito de chapas de aquecimento (Prodicil, Mod. 11.36 L). Para o procedimento, 3 g de amostra foram acondicionados em cartucho de papel filtro e este foi inserido no extrator. Foram utilizados 200 mL de solvente selecionado, que foi adicionado no balão de 250 mL e aquecido até as respectivas temperaturas de ebulição. As extrações foram realizadas por cinco horas, conforme a metodologia proposta por Lim et al. (2010), com algumas modificações. Foram empregados cinco diferentes solventes, de grau analítico para a extração, sendo eles: *n*-hexano (Dinâmica 98,5%), ciclohexano (Dinâmica 99%), diclorometano (Neon 99,5%), clorofórmio (Proquímicos 99,8%) e éter de petróleo (Vetec 99,9%). Os extratos obtidos

foram recuperados por evaporação do solvente, acondicionados em frascos e armazenados a -18 °C, em *freezer* doméstico. O rendimento de cada extração foi calculado através da Equação (1). Os resultados de rendimento foram avaliados por análise de variância ANOVA a 95% de confiança através do *software Excel*.

$$R(\%) = \frac{m_{\text{óleo}}}{m_{\text{casca}}} \cdot 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

$m_{\text{óleo}}$ (g) = representa a massa de fração oleosa obtida na extração;

m_{casca} (g) = massa de casca de café utilizada na extração em base seca.

4.4 PERFIL DOS EXTRATOS OLEOSOS E IDENTIFICAÇÃO DE CAFEÍNA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-MS)

Os extratos oleosos extraídos com diferentes solventes foram analisados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS). As análises foram realizadas em cromatógrafo gasoso acoplado à espectrômetro de massas (Shimadzu GC-2010 Plus), com coluna capilar de sílica fundida modelo RTx-5MS (Restek, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e injetor split (1:50) a 245 °C. O volume injetado foi de 2,0 µL. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste. A ionização foi realizada por impacto de elétrons (IE), com voltagem de 70 eV e corrente de emissão de 60 uA. A aquisição dos dados ocorreu no modo SCAN, com monitoramento dos íons de 35 a 300 *m/z*. A temperatura utilizada na separação foi de 80 °C durante 6 minutos seguido por um aumento na temperatura de 6 °C.min⁻¹ até 120 °C, em seguida a temperatura foi aumentada em 30 °C.min⁻¹ até 215 °C e finalmente a temperatura foi elevada em 6°C.min⁻¹ até 240 °C onde foi mantida por 5 minutos, com um total de tempo de corrida

de 25 min.

4.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para a análise de FTIR foi utilizada a metodologia descrita por Leimann (2011), com modificações. Foi avaliada a presença de grupos funcionais característicos na composição das frações oleosas obtidas em função dos diferentes solventes utilizados na extração, por FTIR. Foram preparadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) contendo o óleo disperso no mesmo. As pastilhas foram então analisadas em espectrofotômetro Shimadzu (IR AFFINITY-1). Os espectros foram obtidos na faixa de 4000–400 cm^{-1} utilizando 32 acumulações e resolução de 4 cm^{-1} . Para comparação, foram analisados os espectros de cada óleo obtido.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS OLEOSOS POR DISCO-DIFUSÃO

Para avaliar a possibilidade de atividade antimicrobiana dos óleos, o método de antibiograma de Kirby & Bauer, de acordo com o protocolo estabelecido pelo documento M100-S19/2009, “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2009) foi utilizado. Para o estudo, foram preparadas placas contendo Ágar Mueller Hinton em placas estéreis com o cultivo recente de bactérias a serem analisadas, sendo elas: *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia Coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Bacillus cereus* (ATCC 14579). Os discos foram elaborados com papel filtro quantitativo e estéril de 125 milímetros (Unifil). Para a embebição dos discos, os extratos oleosos obtidos de diferentes solventes foram dissolvidos em seus respectivos solventes e mantidos em fluxo laminar estéril até ser verificada a secagem dos extratos nos discos.

Logo, o método de antibiograma foi realizado onde, uma alça bacteriológica, previamente flambada e resfriada foi utilizada para tocar em torno de 4 a 5 colônias de cada bactéria e posteriormente suspender estas colônias em solução salina estéril (0,85%), até a obtenção de uma turvação de grau 0,5 da escala *Mac Farland*. Para obter esse grau de turvação, utilizou-se um tubo aferido com uma turvação grau 0,5 da escala *Mac Farland* como comparativo e um vórtex para agitação da suspensão. Um *swab* estéril foi embebido na suspensão bacteriana preparada antecipadamente e o excesso foi retirado na parede do próprio tubo. Em seguida, a suspensão foi cuidadosamente semeada por toda superfície da placa. Após aguardar a secagem da superfície da placa, com o auxílio de uma pinça estéril, os discos de cada extrato obtido foram colocados sobre a superfície do meio. Por fim, as placas foram encubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 37 °C durante 24 horas. Cada teste foi realizado em duplicata. Após o período de incubação, foram avaliados os diâmetros dos halos de inibição formados (CLSI, 2011).

4.7 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS POLARES DAS CASCAS DE CAFÉ

Para a extração dos compostos com maior polaridade das cascas de café foram testadas quatro condições de solvente em dois métodos de extração. Foram utilizadas soluções hidroetanólicas nas concentrações de 20, 40, 60 e 80% e a proporção soluto/solvente de 1:20 (m/v). A extração a frio foi realizada à temperatura ambiente (20–25 °C) em Tubos tipo *Falcon* com agitação em um homogeneizador rotativo de tubos (Phoenix, AP 22). A extração a quente foi realizada à temperatura de 40 °C em Tubos tipo *Falcon* utilizando um banho térmico (Dist) com agitação. As extrações ocorreram pelo período de 24 horas e os extratos foram filtrados em papéis filtro quantitativos (125 mm, Unifil). Imediatamente após a filtração, os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD).

4.8 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS POR CLAE-DAD

Os extratos foram filtrados através de um filtro de seringa de nylon de 0,22 µm (Millipore, São Paulo, Brasil). A análise por CLAE foi realizada usando um cromatógrafo Dionex Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Alemanha) equipado com uma bomba Ultimate 3000, coluna do compartimento de amostra Ultimate 3000 e detector de fotodiodo Ultimate 3000. As fases móveis utilizadas foram uma solução de ácido acético 1% (A) e metanol (B) para um total de tempo de execução de 65 min, com gradiente programado como segue: 5–10% B (0–2 min), 10–12% B (2–3 min), 12–16% B (3–5 min), 16–23% B (5–10 min), 23–33% B (10–20 min), 33–45% B (20–30 min), 45–65% B (30–40 min), 65–80% B (40–45 min), 80–100% B (45–50 min), 100% B (50–55 min), 100–5% B (55–60 min) e 5% B (60–65 min). O software Chromeleon foi utilizado para controlar o amostrador automático, configurar os gradientes e realizar a aquisição de dados. As separações foram realizadas em uma coluna Acclaim® 120, C₁₈, 5 µm, 120 Å (4,6 mm x 250 mm), operando a 40 °C com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. No nosso laboratório existe um banco de padrões, constituído por: ácido gálico, catequina, ácido siríngico, capsaicina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, dihidrocapsaicina, rutina, quercetina, teobromina e cafeína, separados como descrito no gradiente citado acima otimizado por Rodrigues et al. (2015) para a separação destes padrões e que foram utilizados na tentativa de identificação de alguns compostos nas cascas de café. As análises foram realizadas em triplicata.

4.9 QUANTIFICAÇÃO DA CAFEÍNA NOS EXTRATOS POR CLAE-DAD

Para quantificação da cafeína nos extratos hidroetanólicos, um novo gradiente foi otimizado sendo as fases móveis utilizadas: solução de ácido acético 1% (Solvente A) e metanol (Solvente B) para um total de tempo de execução de 32 min. A quantificação da cafeína foi realizada por CLAE-DAD, utilizando o mesmo cromatógrafo descrito no item 4.8. O gradiente foi programado como segue: 30% B

(0–10 min), 30–100% B (10–12 min), 100% B (12–20 min), 100–30% B (20–22 min), 30% B (22–32 min). As separações foram realizadas numa coluna Acclaim® 120, C₁₈, 5 µm, 120 Å (4,6 mm x 250 mm), operando a 40 °C com vazão de 1,0 mL.min⁻¹ e detecção no UV ($\lambda = 273$ nm). A metodologia descrita acima foi utilizada para determinar a melhor proporção de solvente extrator e tipo de extração para a cafeína. As amostras foram analisadas em triplicata e a média das áreas dos picos foi utilizada para a quantificação da cafeína. Para a construção da curva de calibração, utilizou-se cafeína padrão comercial 98% nas concentrações de 0,980; 0,490; 0,294; 0,196; 0,098; 0,049; 0,025 e 0,010 mg.mL⁻¹.

4.10 COMPARAÇÃO DO TEOR DE CAFEÍNA EXTRAÍDO DAS CASCAS E DOS GRÃOS DE CAFÉ

A metodologia de extração (item 4.7) que proporcionou o melhor rendimento de extração de cafeína das cascas de café determinado por CLAE-DAD foi utilizada para a obtenção de um extrato a partir dos grãos de café, torrados e moídos, para comparação do teor de cafeína nas cascas e nos grãos de café. A amostra foi analisada conforme metodologia descrita no item 4.8 e 4.9 e os dados foram comparados. A amostra de café torrada e moída, utilizada para a realização desse estudo, foi adquirida no comércio local da cidade de Campo Mourão, da marca de café Coamo Tradicional da empresa que concedeu as amostras de casca de café.

4.11 DETERMINAÇÃO *in vitro* DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DA CASCA DE CAFÉ

O extrato hidroetanólico de casca de café obtido pela melhor condição de extração (EtOH 40%) foi seco em estufa com circulação de ar a 50 °C em placas de petri pelo período de 24 horas. Após o período, o extrato foi resolubilizado em 20 mL

de água destilada e congelado em ultra *freezer* a $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, o extrato foi submetido à secagem por liofilização (L101-LIOTOP), a uma pressão de vácuo de aproximadamente $61\text{ }\mu\text{Hg}$ com temperatura a $-53\text{ }^{\circ}\text{C}$. O produto liofilizado foi embalado e armazenado em frasco plástico em *freezer* doméstico.

Para avaliar a possibilidade de atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico com melhor teor de cafeína, foi utilizado o método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo estabelecido pelo documento M100-S22/2012, “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2012). Para o estudo, foram preparadas placas estéreis com o cultivo recente de bactérias a serem analisadas, sendo elas: *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia Coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), foram feitas diluições seriadas (1:2) do extrato em $100\text{ }\mu\text{L}$ de caldo Mueller Hinton Broth (MHB), com uma concentração inicial de 8 mg.mL^{-1} e final de $0,015\text{ mg.mL}^{-1}$. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica (Fanem, Mod. 002 CB) à temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Ainda, para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), uma alíquota de $10\text{ }\mu\text{L}$ de cada poço, onde não foi observado crescimento no ensaio de CIM, foi transferida para os mesmos meios de cultura usados para o cultivo dos isolados bacterianos e incubados em estufa bacteriológica pelo tempo e temperatura específicos de cada microrganismo. Cada teste foi realizado em triplicata com três repetições (CLSI, 2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DE ÓLEO EM SOXHLET

Os rendimentos dos extratos de óleo obtidos pelo método de extração por Soxhlet em triplicata, utilizando solventes de diferentes polaridades, bem como seus respectivos índices de polaridade, de acordo com Collins et al. (2006) e Neto e Nunes (2003), estão apresentados na Tabela 1.

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que o melhor rendimento médio encontrado na extração foi obtido utilizando o solvente clorofórmio. Logo, pode-se verificar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os rendimentos obtidos utilizando os diferentes solventes. Por meio desse método de extração, a temperatura, a reciclagem do solvente e a interação entre o solvente e a matriz vegetal, favorecem a solubilização de compostos, que de acordo com as características dos solventes, podem apresentar variações no rendimento dos extratos obtidos e composição química (MEZZOMO, et al., 2010).

Tabela 1 - Rendimento médio das extrações de óleo utilizando diferentes solventes.

| Solvente | Polaridade* | Rendimento (%) |
|------------------|-------------|----------------|
| Éter de Petróleo | 0,00 | 0,78 ± 0,05 |
| Ciclo-hexano | 0,04 | 1,19 ± 0,03 |
| Hexano | 0,10 | 0,95 ± 0,09 |
| Diclorometano | 3,10 | 1,26 ± 0,08 |
| Clorofórmio | 4,10 | 1,55 ± 0,23 |

* Índice de polaridade dos solventes em ordem crescente.

Os solventes quimicamente semelhantes que possuem parâmetros de seletividade similares fazem parte do mesmo grupo, no entanto, podem apresentar diferentes valores de polaridade (POOLE; DIAS, 2000). A partir dos resultados, é possível verificar que os solventes com maiores índices de polaridade apresentaram melhores rendimentos nas extrações. De acordo com os resultados obtidos em um estudo por Andrade (2011), as cascas de café possuem grande quantidade de

compostos com polaridades de intermediária a alta, sendo que solventes com essas características, como o diclorometano e clorofórmio (polaridade intermediária), podem obter bons rendimentos na extração por Soxhlet. Entretanto, ainda nesse estudo, foram obtidos rendimentos semelhantes utilizando solventes de caráter apolar, como *n*-hexano, sugerindo também a presença de compostos de caráter lipofílico na matriz vegetal que se solubilizam mais facilmente na característica apolar desse solvente.

Comparando o percentual médio de rendimento obtido utilizando o solvente clorofórmio com os rendimentos encontrados na literatura, observou-se que o valor encontrado está entre os resultados obtidos em alguns estudos, como de Brand et al. (2000), por exemplo. No entanto, notou-se que os rendimentos obtidos no presente estudo não foram semelhantes ao encontrados por Andrade (2011) para o extrato oleoso, sugerindo que as características de polaridade dos solventes utilizados por esse autor (etanol e acetato de etila), apresentaram melhores rendimentos (3,4 e 4,8%, respectivamente). Em outros estudos que apresentam a composição da casca de café, verificou-se diferenças nos percentuais lipídicos, que chegam a variar de 0,3 até 7% de lipídeos na casca de café (PANDEY et al., 2000; BRAND et al., 2000; SOCCOL, 2002; ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; MURTHY; NAIDU, 2012).

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE CAFEÍNA NOS EXTRATOS OLEOSOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-MS)

A caracterização dos extratos oleosos obtidos por Soxhlet, utilizando diferentes solventes extratores foi realizada por CG-MS. Pela análise dos cromatogramas e espectros de massas obtidos por CG-MS e comparação dos dados de fragmentação com a biblioteca virtual NIST 21, foi possível identificar a cafeína nos extratos diclorometano e clorofórmio com tempo de retenção (tR) igual a 19,95 min (Figura 4). Apenas os solventes com características dipolares foram capazes de extrair a cafeína devido à seletividade dos mesmos.

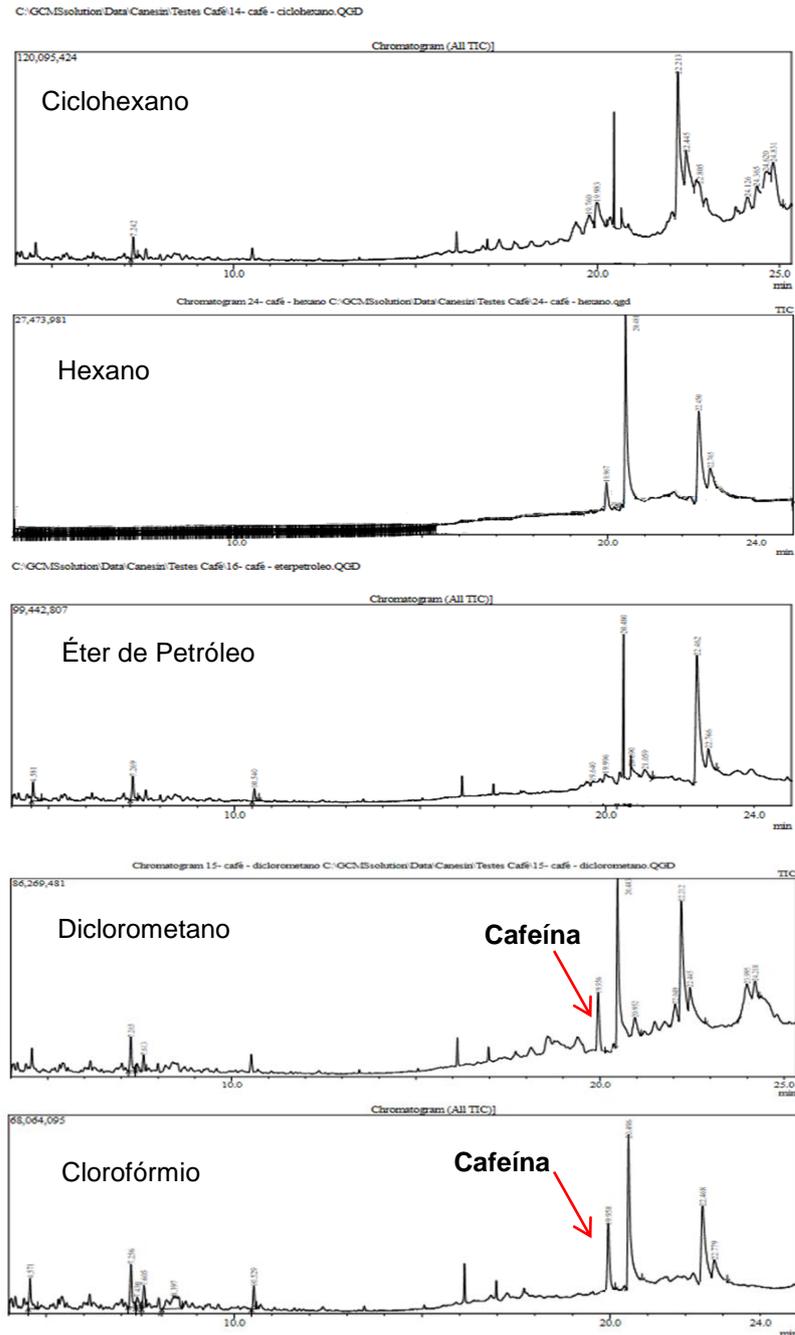


Figura 4 - Cromatogramas de CG-MS (EI) dos extratos oleosos das cascas de café extraídos por solventes de diferentes polaridades.
Fonte: Próprio autor.

5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Na Figura 5 são apresentados os espectros de FTIR obtidos para as amostras de extratos oleosos das cascas de café em função dos diferentes solventes de

extração e na Figura 6 as estruturas químicas da cafeína e do ácido clorogênico. Na Tabela 2 as bandas identificadas estão relacionadas com as respectivas ligações e os compostos de interesse (cafeína ou ácido clorogênico).

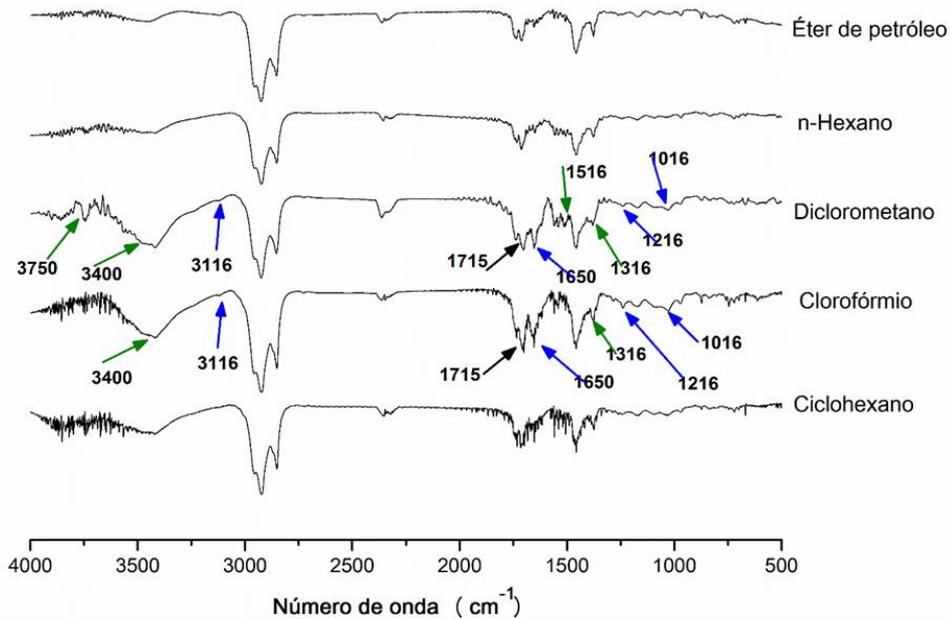


Figura 5 - Espectros de FTIR dos extratos da casca de café obtidos com os diferentes solventes orgânicos (indicação em verde bandas características do ácido clorogênico, em azul da cafeína e em preto bandas comuns aos dois compostos).

Fonte: Próprio autor.

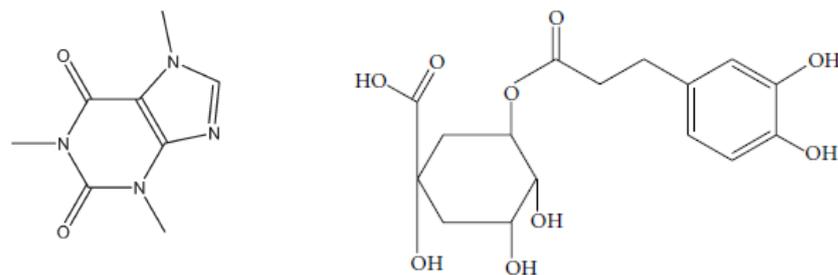


Figura 6 - Estruturas químicas da cafeína (a) e do ácido clorogênico (b) Fonte: (CLAUDIO et al., 2013; MENG et al., 2013).

Percebe-se que as bandas características da cafeína e do ácido clorogênico aparecem nos espectros dos extratos obtidos utilizando clorofórmio e diclorometano como solventes de extração (Figura 5). Os demais espectros não apresentam tais

bandas, corroborando com os resultados de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas.

De acordo com Belay et al., (2008) a literatura indica que o diclorometano e o clorofórmio são úteis para descafeinização de grãos de café, no entanto a eficiência do diclorometano para extrair a cafeína a partir de grãos de café é de 98-99%. Os autores ainda comentam que o clorofórmio tende a extrair uma quantidade maior de compostos interferentes que o diclorometano.

Andrade et al. (2012) extraíram grãos de café já utilizados e cascas de café por extração soxhlet com os seguintes solventes: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol. Os autores identificaram a presença de ácido clorogênico somente no extrato obtido utilizando acetato de etila. A cafeína foi identificada nos extratos obtidos com hexano (2,1 µg por mg de extrato), diclorometano (189,9 µg por mg de extrato) e etanol (129,6 µg por mg de extrato). Possivelmente no presente trabalho a cafeína possa ter sido extraída pelos solventes de menor polaridade (*n*-hexano, ciclohexano e éter de petróleo), porém numa proporção muito menor que pelo clorofórmio e pelo diclorometano, não tendo destaque das bandas características nos espectros em função da baixa concentração.

Tabela 2 - Bandas de absorção identificadas nos espectros de FTIR dos extratos de casca de café.

| Composto | Ligação | Banda (cm ⁻¹) | Banda da referência (cm ⁻¹) | Referência |
|-------------------|----------------------|---------------------------|---|------------------------------|
| Ácido clorogênico | C = O | 1715 | 1692 | (BHATTACHARYYA et al., 2014) |
| | C - O | 1316 | 1334 | |
| | OH fenólico | 3750 | 3860 | |
| | OH ácido carboxílico | 3400 | 3736 | |
| | C = C aromático | 1516 | 1513 | |
| Cafeína | C = O | 1715 | 1703 | (AL-BAYATI; MOHAMMED, 2009) |
| | = C - H | 3116 | 3112 | |
| | C - H | 2950 | 2953 | |
| | C - N | 1216 | 1236 | |
| | C - N | 1016 | 1024 | |
| | C = N | 1650 | 1657 | |

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS OLEOSOS POR DISCO-DIFUSÃO

Como o ácido clorogênico e a cafeína são relatados na literatura como substâncias que apresentam atividade antimicrobiana, seus potenciais para inibir estes microrganismos foram avaliados pelo método de disco-difusão em ágar para determinar se os extratos oleosos obtidos apresentavam tal atividade. Apesar dos relatos na literatura indicarem que essas substâncias possuem atividade antimicrobiana (GARAMBONE; ROSA, 2007; CHAO et al., 2012; CLAUDIO et al., 2013), os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que não houve ação antibacteriana e bacteriostática dos extratos oleosos testados. Todos os microrganismos utilizados nesse estudo (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus*) apresentaram resistência aos extratos empregados, não havendo o desenvolvimento do halo de inibição em torno dos discos, tanto para os extratos com a presença de ácido clorogênico e cafeína (obtidos pelo solvente clorofórmio e diclorometano), bem como para os demais extratos obtidos pelos outros solventes (*n*-hexano, ciclohexano e éter de petróleo).

A atividade metabólica secundária dos vegetais é capaz de produzir substâncias antibióticas derivadas de seus mecanismos de defesa em condições adversas. Com isso, é possível se obter extratos vegetais com substâncias que apresentem algum efeito antibiótico. Entre essas substâncias, alguns principais grupos com propriedades antimicrobianas são: os óleos essenciais, os alcaloides, algumas substâncias fenólicas e polifenóis, tais como fenóis simples, ácidos fenólicos e quinonas. Além desses, fazem parte desse grupo as flavonas, os flavonóis, flavonoides e taninos (GONÇALVES; FILHO; MENEZES, 2005).

Dentre os grupos citados, o ácido clorogênico presente nos extratos oleosos obtidos com solventes de características dipolares no presente trabalho, é de acordo com Chao et al., (2012), um polifenol encontrado em alimentos de origem vegetal, como frutas, chás, legumes e café. Segundo Garambone e Rosa (2007), os polifenóis são compostos por ácidos hidroxinâmicos, sendo o ácido cafeico o maior representante destes, presente na forma de ácido clorogênico nos alimentos. O ácido clorogênico é um éster do ácido quínico com o ácido cafeico.

A cafeína, também obtida nos extratos oleosos com solventes de características dipolares, pertence à família dos alcaloides, apresentando características antibacterianas e antifúngicas. Além de suas propriedades particulares como seus efeitos estimulantes, a cafeína possui ação pesticida natural para proteção de plantas, sendo esta sua principal função no café, guaraná, chá e cacau (CLAUDIO et al., 2013).

Para Almajano et al., (2008) a propriedade de inibição depende de fatores como a cepa de microrganismo testada, do tipo de extrato e da concentração dos princípios ativos. Dessa forma, as concentrações das substâncias presentes nos extratos podem ter sido insuficientes para o efeito de inibição e sugere que concentrações maiores dessas substâncias poderiam apresentar melhores resultados.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS POR CLAE-DAD

O perfil cromatográfico dos componentes de maior polaridade presentes nas cascas de café foi avaliado por CLAE-DAD. Para a otimização da extração destes constituintes foram testadas diferentes proporções dos solventes de extração etanol e água (EtOH: 80, 60, 40 e 20%) utilizando um método de extração a frio e a quente.

García e Del Bianchi (2015) avaliando a capacidade antioxidante de diferentes resíduos do beneficiamento de café extraíram compostos fenólicos das cascas de café utilizando acetona e água, identificando e quantificando o ácido clorogênico por CLAE, presente em maior quantidade na casca de café que nos outros resíduos. Mediante os resultados obtidos por CLAE-DAD no presente trabalho, foi possível identificar o ácido clorogênico nos extratos, corroborando com resultados apresentados na literatura. Entretanto, o ácido clorogênico não foi identificado como composto majoritário do extrato das cascas de café no presente trabalho, sendo esse fato explicado pela utilização de outra solução extratora (etanol e água) no atual trabalho. Ainda assim, a obtenção de ácido clorogênico a partir das cascas de café pode ser uma alternativa para a indústria farmacêutica e de alimentos, considerando a atividade biológica desse composto fenólico e agregação de valor ao resíduo agroindustrial (PANDEY et al., 2000; GARCÍA; DEL BIANCHI, 2015).

Avaliando a composição de diferentes extratos de casca de café por CLAE em fase reversa obtidos com acetato de etila e etanol e sob diferentes métodos, Andrade et al. (2012) encontraram para os extratos das cascas de café os seguintes compostos: ácido vanílico, epicatequina, ácido gálico, ácido tânico, ácido protocatecuico e ácido clorogênico, sendo este último o composto fenólico identificado na maioria dos extratos. Os ácidos clorogênicos são os principais componentes fenólicos do café, são solúveis em álcoois de cadeia curta e em misturas álcool-água (AZEVEDO, 2005).

Pode-se observar neste estudo que a mudança na proporção da mistura dos solventes extratores não resultou em mudanças significativas em composição dos extratos, porém houve mudança na quantidade extraída do composto majoritário. O composto majoritário com $t_R = 15,9$ min foi identificado por comparação do tempo de retenção (t_R) e espectro de UV com o do padrão comercial. A substância majoritária foi identificada como sendo a cafeína. A comparação dos perfis cromatográficos para os extratos obtidos na extração a frio utilizando diferentes proporções de etanol e água em CLAE-DAD (λ 271 nm) seguem dispostos na Figura 7.

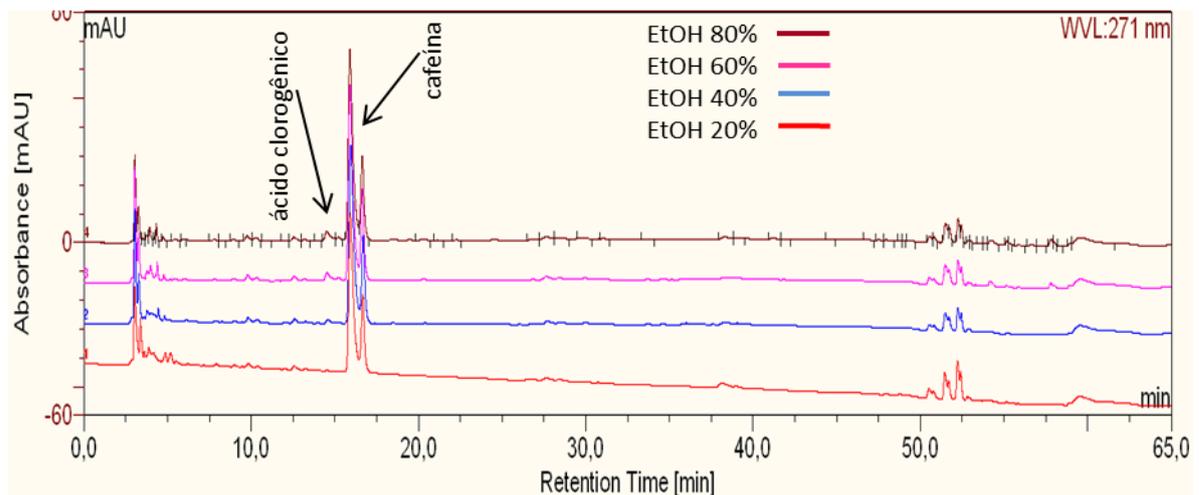


Figura 7 - Comparação dos perfis cromatográficos para os extratos obtidos na extração a frio utilizando diferentes proporções de EtOH e H₂O em CLAE-DAD (λ 271 nm).

Fonte: Próprio autor.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DA CAFEÍNA NOS EXTRATOS POR CLAE-DAD

Após a identificação do composto majoritário nos extratos obtidos para as cascas de café nas extrações a frio e a quente como sendo a cafeína, procedeu-se para a sua quantificação. A Figura 8 apresenta os cromatogramas para a quantificação dos extratos obtidos em diferentes proporções de etanol e água, utilizando o método de extração a frio (Figura 8A) e a quente (Figura 8B), respectivamente.

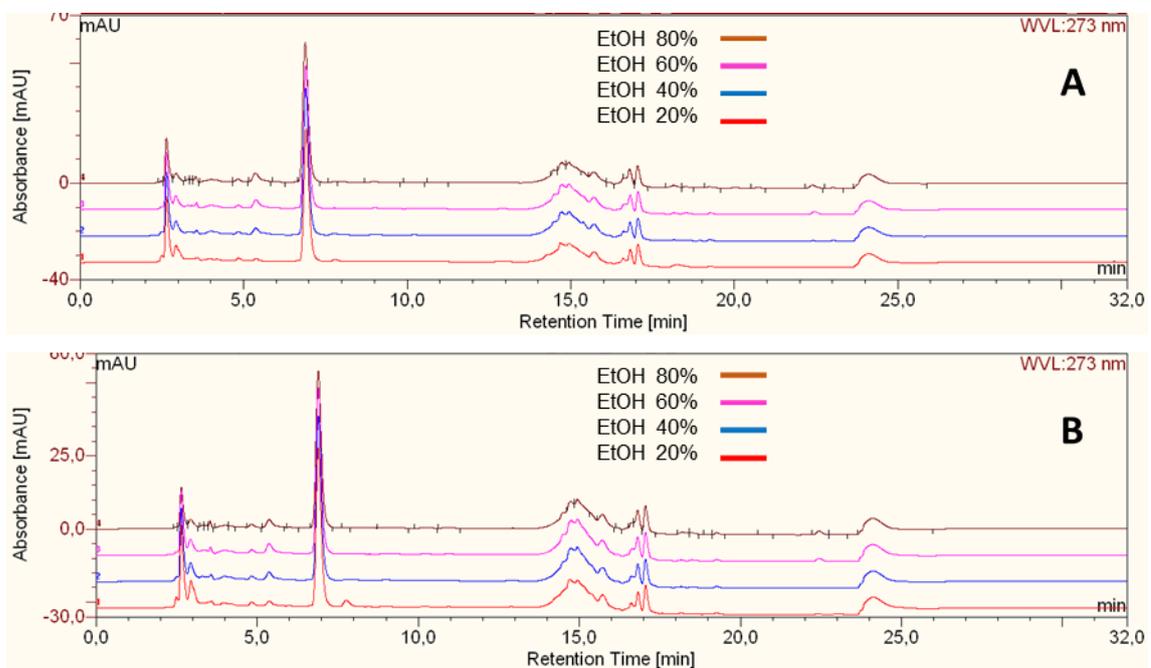


Figura 8 - Comparação dos cromatogramas obtidos utilizando diferentes proporções da mistura etanol-água nas extrações obtidas pelo método a frio (A) e a quente (B).

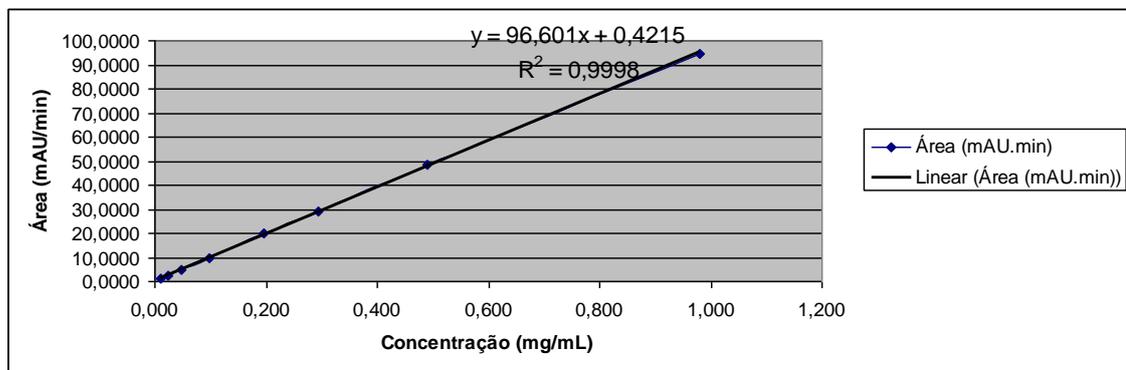
Fonte: Próprio autor.

Para a quantificação da cafeína, realizou-se a construção da curva de calibração da cafeína. Os dados utilizados para a construção da curva de calibração da cafeína comercial padrão (98%) seguem dispostos na Tabela 3. A curva de calibração, a equação da reta e o coeficiente de correlação r^2 obtidos estão apresentados na Figura 9.

Tabela 3 - Concentrações de cafeína utilizadas na construção da curva de calibração.

| Concentração (mg.mL ⁻¹) | Área (mAU.min ⁻¹) |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| 0,98 | 945,121 |
| 0,49 | 485,783 |
| 0,294 | 291,998 |
| 0,196 | 197,757 |
| 0,098 | 98,790 |
| 0,049 | 48,214 |
| 0,025 | 24,625 |
| 0,01 | 10,153 |

Fonte: Próprio autor.

**Figura 9 - Curva padrão para determinação de cafeína.**

Fonte: Próprio autor.

Comparando a quantidade de cafeína obtida nas extrações a frio e a quente pode-se verificar que as quantidades de cafeína obtidas foram superiores para as extrações a frio para todas as proporções utilizadas entre etanol e água, porém utilizando 40% de etanol obteve-se a maior extração de cafeína, com a concentração de 0,118 mg.mL⁻¹ de extrato. A média das áreas dos picos de cafeína em $\lambda = 273$ nm e a concentração de cafeína com $t_R = 6,89$ min obtida nos métodos de extração a quente e a frio se encontram descritos na Tabela 4.

Embora no presente trabalho não tenha se determinado a porcentagem de cafeína extraída pelos diferentes métodos de extração, Fernandes (2007) em seu trabalho avaliou a influência do diâmetro das partículas de casca de café na extração de cafeína utilizando água como solução extratora e pode verificar que quanto menor o diâmetro da casca de café, maior foi a quantidade de cafeína extraída e maior o tempo gasto. Em 5 g de amostra de casca de café com 0,36 mm de diâmetro foi possível extrair 33,92% da cafeína presente na amostra.

Em outro estudo, Andrade et al. (2012) identificou os compostos presentes em extratos de borra e casca de café obtidos por diferentes métodos de extração e com variações no processo e solvente. Em seus resultados, foi verificado que a cafeína estava presente em todos os extratos, exceto ao obtido por acetato de etila, com as concentrações variando entre 0, 734 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ extrato a 3421,1 $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ extrato. Ainda, puderam observar que as concentrações de cafeína para o extrato de casca de café foram superiores para todas as condições testadas que do extrato da borra de café.

Tabela 4 - Comparação da extração da cafeína utilizando diferentes proporções de etanol e água nos métodos a frio e a quente pela média das áreas dos picos (n=3) da cafeína em $\lambda = 273$ nm e concentração de cafeína nos diferentes extratos.

| % EtOH | Média das áreas dos picos da cafeína ($t_R = 6,89$ min) | Cafeína ($\text{mg}.\text{mL}^{-1}$) |
|--------|--|--|
| Q_20% | 10,1183 | 0,100 |
| F_20% | 10,4114 | 0,103 |
| Q_40% | 10,5278 | 0,105 |
| F_40% | 11,7865 | 0,118 |
| Q_60% | 10,8686 | 0,108 |
| F_60% | 11,4665 | 0,114 |
| Q_80% | 10,5371 | 0,105 |
| F_80% | 11,3918 | 0,114 |

Q: Extração a quente; F: Extração a frio.

Fonte: Próprio autor.

5.7 COMPARAÇÃO DO TEOR DE CAFEÍNA NAS CASCAS E GRÃOS DE CAFÉ

A cafeína, identificada como a substância majoritária nos extratos hidrofílicos das cascas de café é uma substância com diversas aplicações comerciais, como por exemplo, na indústria alimentícia e farmacêutica (ANDRADE, 2011). Sendo o objetivo deste trabalho caracterizar os constituintes químicos dos extratos lipofílicos e hidrofílicos das cascas de café visando agregar valor a este resíduo do beneficiamento do café, foi realizada a comparação da quantidade de cafeína presente nas cascas e grãos de café por CLAE-DAD. A comparação foi realizada com a melhor condição de extração para a obtenção da cafeína previamente estabelecida como sendo EtOH 40%, a frio. Na figura 10 é apresentada a comparação dos cromatogramas dos grãos

e cascas de café mostrando a diferença do teor de cafeína extraída dos grãos e cascas de café.

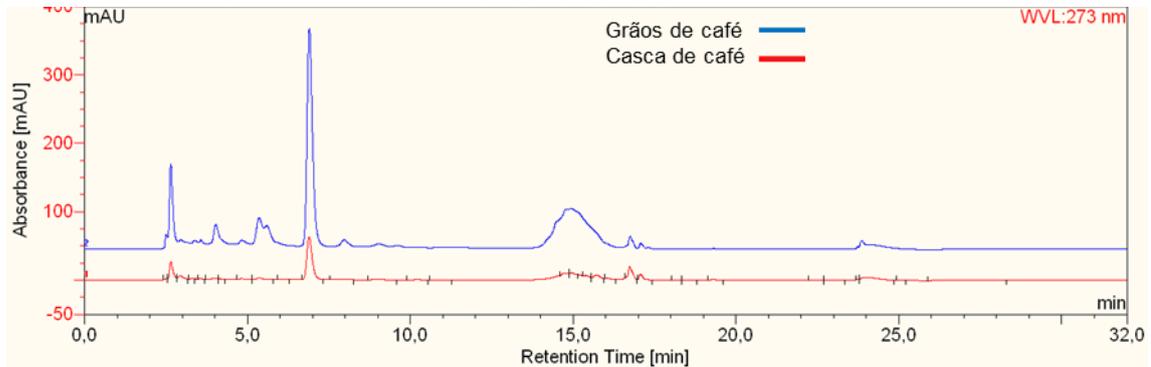


Figura 10 - Cromatograma de comparação da quantificação da cafeína nas cascas e grãos de café na melhor condição de extração (EtOH 40% a frio) (λ 273 nm).

Fonte: Próprio autor.

Pela quantificação da cafeína extraída na melhor solução extratora, determinou-se uma razão de 1 para 6, sendo que os grãos apresentaram aproximadamente seis vezes mais cafeína do que as cascas de café. A concentração de cafeína obtida nas amostras de casca e grãos de café por CLAE-DAD estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação da extração da cafeína utilizando EtOH 40% no método a frio pela média das áreas dos picos (n=3) da cafeína em $\lambda = 273$ nm e concentração de cafeína nos diferentes extratos.

| Produto | Média das áreas dos picos da cafeína ($t_R = 6,89$ min) | Cafeína (mg.mL ⁻¹) |
|---------------|--|--------------------------------|
| Café em grão | 61,5565 | 0,634 |
| Casca de café | 11,7865 | 0,118 |

Fonte: Próprio autor.

Considerando os diferentes métodos de obtenção de cafeína com utilização de solventes orgânicos como diclorometano, capaz de produzir toxicidade aos produtos empregados, o presente trabalho demonstra uma alternativa para a obtenção de cafeína a partir da casca de café, resíduo gerado em quantidade apreciável, utilizando solventes menos tóxicos.

5.8 COMPARAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS DAS CASCAS E GRÃOS DE CAFÉ

Com a intenção de comparar os perfis cromatográficos obtidos pelo método de extração na melhor condição (EtOH 40%) para os grãos e cascas de café por CLAE-DAD, os extratos foram analisados utilizando diferentes comprimentos de onda, sendo que em 273 e 306 nm, foram observados o maior número de compostos.

A comparação dos perfis cromatográficos em 273 e 306 nm para a casca de café, pode ser observada na Figura 11A. Utilizando a mesma forma de comparação de perfil cromatográfico para grãos de café, obteve-se o cromatograma apresentado na Figura 11B.

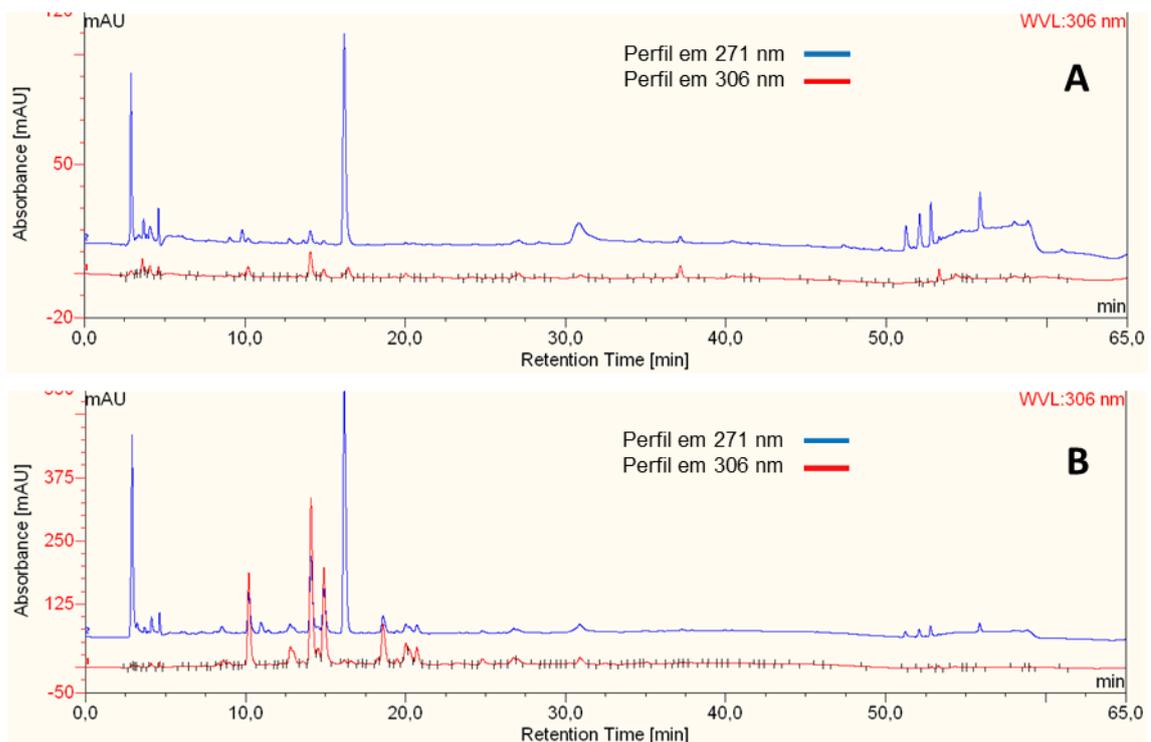


Figura 11 - Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos obtidos com EtOH 40% a frio. Comparação do perfil em 273 nm e 306 nm do extrato das cascas de café (A) e comparação do perfil em 273 nm e 306 nm do extrato dos grãos de café (B).

Fonte: Próprio autor.

Na Figura 12A, pode-se observar a comparação dos perfis cromatográficos das cascas e dos grãos de café em 273 nm e a identificação da cafeína nestes extratos

e na Figura 11B em 306 nm, com a identificação do ácido clorogênico. Através dos perfis obtidos por CLAE-DAD, pode-se verificar que existe uma similaridade entre os compostos presentes nas cascas e grãos de café e que na sua maioria os compostos apresentam maior concentração nos grãos de café em comparação com as cascas.

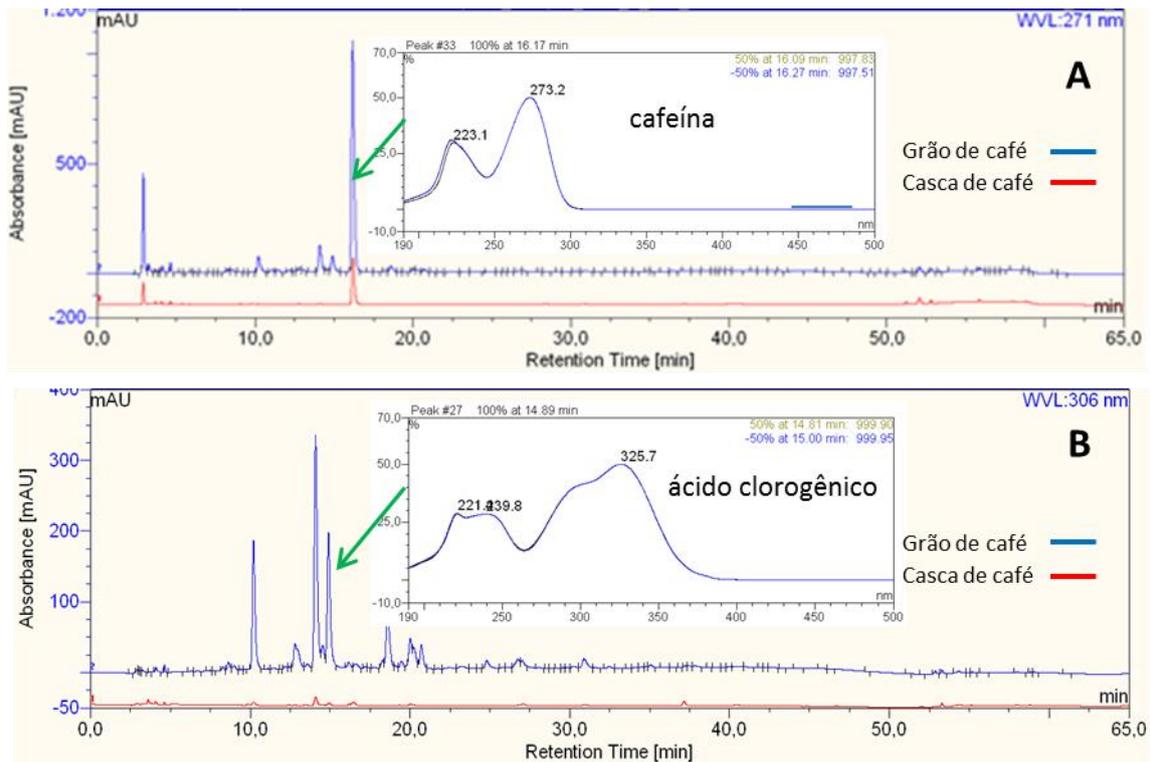


Figura 12 - Comparação do perfil cromatográfico do extrato EtOH 40% obtido pela extração a frio das cascas de café e dos grãos de café. Comparação dos perfis dos extratos obtido das cascas e grãos em 271 nm com o espectro de UV e identificação de cafeína (A) e do dos perfis obtidos em 306 nm com espectro de UV e identificação do ácido clorogênico.
 Fonte: Próprio autor.

5.9 DETERMINAÇÃO *in vitro* DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DA CASCA DE CAFÉ.

Muitos alcaloides são substâncias farmacologicamente ativas apresentando atividades fisiológicas tanto em humanos quanto em animais. Muitos estudos são realizados com o objetivo de extrair diferentes metabólitos secundários e avaliar a

capacidade antimicrobiana destes, além dos estudos com estas substâncias puras também há interesse em avaliar as propriedades antimicrobianas destes quando em combinação com outras substâncias através de estudos de sinergismo. O extrato de café apresenta alta concentração de cafeína bem como a presença de inúmeras outras substâncias, dentre elas compostos fenólicos. A cafeína apresenta atividades antimicrobiana e antioxidante (MOHAMMED; AL-BAYATI, 2009). São relatados em alguns estudos que a cafeína extraída a partir do café comercial possui atividade antimicrobiana e, além disto, que as concentrações de cafeína em combinação com demais substâncias em extratos de café são potenciais agentes antimicrobianos contra *Salmonella entérica* (ALMEIDA et al., 2006).

Mohammed e Al-bayati (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana a partir de cafeína isolada de diferentes plantas contra seis bactérias, sendo: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia* e *Pseudomonas aeruginosa*. Pelo método de difusão em ágar, a concentração de 2 mg.mL⁻¹ dos extratos, apresentou atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas, com exceção de *P. mirabilis*, e o efeito inibitório mais elevado foi observada contra *P. aeruginosa*. Os valores de CIM variaram de 62,5 a 250,0 µg.mL⁻¹ para a cafeína isolada a partir de café e de 62,5 para 500,0 µg.mL⁻¹ para a cafeína do chá verde.

Em outro estudo, Sumitha e Sivakumar (2013) isolaram bactérias do solo, da planta e dos grãos de café, sendo que todas apresentaram alta tolerância à cafeína. Entre estas bactérias, foram caracterizadas as bactérias puras, sendo identificadas como *Pseudomonas* sp. e *Brevibacterium* sp. na polpa de café. A bactéria isolada a partir da polpa de café, *Pseudomonas* sp, foi capaz de tolerar até 10 g.L⁻¹ de cafeína em meio sólido e 5 g.L⁻¹ em meio líquido. Já a bactéria *Brevibacterium* sp, foi capaz de tolerar até 8 g.L⁻¹ de cafeína em meio sólido e 3 g.L⁻¹ no meio líquido.

Como relatado nos estudos citados acima, há certa seletividade nos efeitos da cafeína como agente antimicrobiano. Por efeito, os extratos hidroetanólicos contendo a cafeína associada ao ácido clorogênico e demais compostos fenólicos presentes nos extratos foram avaliados para verificar a atividade antimicrobiana deste extrato, obtido pela melhor condição de extração de cafeína (EtOH 40%).

Na literatura, a cafeína e ácido clorogênico que se encontram entre os alcalóides e compostos fenólicos, são substâncias que possuem atividade antimicrobiana (GARAMBONE; ROSA, 2007; CHAO et al., 2012; CLAUDIO et al.,

2013). Buscando-se determinar a concentração mínima inibitória do extrato hidroetanólico, não foi possível observar inibição para nenhum dos microrganismos avaliados. Todos os poços inoculados apresentaram turvação, indicando a reprodução dos microrganismos desde a concentração inicial de extrato de 8 mg.mL^{-1} até a concentração final de $0,015 \text{ mg.mL}^{-1}$. Dessa forma, não prosseguiu-se com a determinação da CBM.

O resultado obtido no presente trabalho comparado aos resultados obtidos nos demais trabalhos citados, pode indicar que as concentrações de substâncias com reconhecida atividade antimicrobiana foram inferiores para o efeito inibitório. Cabe ressaltar que a propriedade de inibição depende de diferentes fatores, como a cepa testada, o extrato e a concentração utilizada, já citados no presente trabalho (ALMEIDA et al., 2006; MOHAMMED; AL-BAYATI, 2009; SUMITHA; SIVAKUMAR, 2013). Ainda, pelos reconhecidos efeitos que os compostos identificados nos extratos hidroetanólicos possuem, é possível que maiores concentrações de extrato pudessem apresentar resultados com propriedades antimicrobianas para as bactérias testadas, bem como para outras bactérias.

6 CONCLUSÕES

Com base na literatura, pôde-se verificar que a casca de café é um resíduo agroindustrial com diferentes aplicações e possível de ser convertido para obtenção de substâncias de valor agregado, como a cafeína no presente estudo.

Não houve diferença significativa no rendimento dos extratos oleosos obtidos de diferentes solventes, entretanto, pode se observar que apenas os solventes clorofórmio e diclorometano foram capazes de extrair a cafeína, fato observado através da caracterização destes extratos pelas análises de FTIR e CG-MS. Os extratos oleosos testados não apresentaram ação antimicrobiana nas concentrações avaliadas. No entanto, sugere-se que maiores concentrações das substâncias com reconhecida atividade antimicrobiana podem fornecer melhores resultados quanto ao efeito antimicrobiano dos extratos.

Nos resultados obtidos por CLAE-DAD, pôde-se verificar que a casca de café apresenta em sua composição ácido clorogênico, não quantificado, e, como composto majoritário a cafeína, uma substância de interesse comercial. O método a frio extraiu uma maior quantidade de cafeína para todas as concentrações de etanol-água testadas. A melhor condição verificada para extração da cafeína foi utilizando solução hidroetanólica 40%, pelo método a frio. Os extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração a frio e a quente não apresentaram mudanças na composição química observada por CLAE-DAD.

Comparando os resultados obtidos do teor de cafeína da casca de café com o grão de café ainda por CLAE-DAD, os resultados mostraram que apesar da casca de café apresentar menor concentração de cafeína que os grãos, aproximadamente seis vezes menor, o extrato hidroetanólico da casca apresenta baixa complexidade, o que facilitaria o uso destas para na obtenção da cafeína pura, agregando valor a este resíduo vegetal e contribuindo para o aproveitamento dos resíduos produzidos no beneficiamento do café, reduzindo assim o impacto ambiental gerado pelo descarte destes resíduos. Como identificado por CLAE-DAD, o extrato hidroetanólico possui compostos com reconhecidas propriedades antimicrobianas, entretanto, não houve ação bacteriostática para o extrato hidroetanólico com maior concentração de cafeína obtido pelo método a frio, porém, maiores concentrações de extrato poderiam ser testadas para verificação das propriedades antimicrobianas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC. **Associação Brasileira da Indústria de Café**. 2016. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

ALMEIDA, A. A. P.; FARAH A.; SILVA, D. A.; NUNAN, E. A.; GLÓRIA, M. B. A. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against Enterobacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 54, p. 8738-43, 2006.

ALMEIDA, A. A. P.; SILVA, D. Á. M.; NUNAN, E. A.; GLÓRIA, M. B. A. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de compostos químicos do café. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Embrapa Café, Brasília, 2005.

ALMAJANO, M. P.; CARBO, R.; JIMÉNEZ, J. A. L.; GORDON, M. H. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chemistry**, n. 108, p. 55–63, 2008.

ANDRADE, K. S.; GONÇALVES, R. T.; MARASCHIN, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. **Talanta**, n. 88, p. 544-552, 2012.

ANDRADE, K. S. Avaliação das técnicas de extração e do potencial antioxidante dos extratos obtidos a partir de casca e de borra de café (*coffea arabica* L.). 2011. 123 f. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-Graduação Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. 2011.

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

ASHIHARA, H.; SUZUKI, T. Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 1864-1876, 2004.

AZEVEDO, A. B. A. Extração e recuperação dos princípios ativos do café utilizando fluidos supercríticos. 2005. **Tese (Doutorado em Engenharia Química)** - Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. 2005.

BAGGIO, J.; ARAÚJO, F. A.; MANCINI, J.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais em cascas de café (*Coffea arabica*, L.). In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Embrapa Café, Brasília, 2007.

BELAY, A.; TURE, K.; REDI, M.; ASFAW, A. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. **Food Chemistry**, n. 108, p. 310-315, 2008.

BHATTACHARYYA, S.; MAJHI, S.; SAHA, B. P.; MUKHERJEE, P. K. Chlorogenic acid–phospholipid complex improve protection against UVA induced oxidative stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, n. 130, p. 293-298, 2014.

BRASIL. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Café**. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 28 fev. 2016.

BRUM, S. S. Caracterização e modificação química de resíduos sólidos do beneficiamento do café para produção de novos materiais. 2007. 138 f. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras. 2007.

CAMPOS, F. M., COUTO, J. A.; HOGG, T. A. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. **Journal of Applied Microbiology**, n. 94, p. 167–174, 2003.

CHAO, J.; WANG, H.; ZHAO, W.; ZHANG, M.; ZHANG, L. Investigation of the inclusion behavior of chlorogenic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 50, p. 277-282, 2012.

CLÁUDIO, A. F. M.; FERREIRA, A. M.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Enhanced extraction of caffeine from guaraná seeds using aqueous solutions of ionic liquids. **Green Chemistry**, n. 15, 2013.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**., v. 80, n. 7, p. 1033-1043, 2000.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (2012). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement**. CLSI document M100-S22, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (2009). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Ninth tenth Informational Supplement. CLSI document M100-S19, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

COLLINS, C. H. et al. **Fundamentos de cromatografia**. São Paulo: Unicamp, 2006.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: Café. **Conab**, v. 2, n. 1, p. 1-68. Brasília: jan. 2016. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 01 mar. 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira. **Conab**, v. 1, n. 3. Brasília: dez. 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

DAGLIA, M.; CUZZONI, M. T.; DACARRO, C. Antibacterial activity of coffee relationship between biological activity and chemical markers. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, p. 2273-2277, 1994.

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

FARDIAZ, S. Antimicrobial Activity of Coffee (*Coffea robusta*) Extract. **Food Journal**, v. 10, n. 3, 1995.

FERNANDES, G. Extração e purificação de cafeína da casca de café. 2007. 107 f. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia. 2007.

FILHO, R. E.; PAIVA, P. C. A.; BARCELOS, A. F.; REZENDE, C. A. P.; CARDOSO, R. M.; BANYS, V. L. Efeito da casca de café (*coffea arabica*, l.) no desempenho de novilhos mestiços de holandês-zebu na Fase de recria. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n.1, p. 225-232, 2000.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, Araraquara, v.18, n. 2, p. 229-235, 2007.

GARCÍA, L. R. P.; DEL BIANCHI, L. V. Antioxidant capacity in coffee industry residues. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 307-313, 2015.

GONÇALVES, A.L.; FILHO, A. A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n. 3, p. 353-358, 2005.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, n. 4, p. 728-733, 2003.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, n. 87, p. 167-198, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: 26 mar. 2016.

LEIMANN, F. V. Nanopartículas híbridas de polímero natural (phbv)/polímero sintético. 2011. **Tese (Doutorado)** - Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, 2011.

LIMA, G. S.; MANHÃES, J. H. C.; PESSOA, T. N.; MIGUEL, D. L.; SIMÕES, M. L. G. Utilização de casca de café como substrato para produção de celulase por *Trichoderma* spp. **VIII Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil**. Salvador, 2013.

LIM, H. K.; TAN, C. P.; KARIM, R.; ARIFFIN, A. A.; BAKAR, J. Chemical composition and DSC thermal properties of two species of *Hylocereus* cacti seed oil: *Hylocereus undatus* and *Hylocereus polyrhizus*. **Food Chemistry**, n.119, p. 1326-1331, 2010.

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.

MENG, S.; CAO, J.; FENG, Q.; PENG, J.; HU, Y. Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review. **Hindawi Publishing Corporation**, p. 1-11, 2013.

MEZZOMO, N. MARTÍNEZ, J.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Kinetics, mathematical modeling and scale-up. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, n. 1, p. 10-16, 2009.

MOHAMMED, M. J.; AL-BAYATI, F. A. Isolation, identification, and purification of caffeine from *Coffea Arabica* L. and *Camellia Sinensis* L.: A combination antibacterial study. **International Journal of Green Pharmacy**, p. 52-57, 2009.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition – A review. **Resources, Conservation and Recycling**, n. 66, p. 45-58, 2012.

NETO, F. R. A.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afim**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

OIC. International Coffee Organization. Total production by all exporting countries. 2016. Disponível em: <<http://www.ico.org/>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAMC, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses, **Biochemical Engineering Journal**, n. 6, p. 153-162, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/>>. Acesso em: 26 mar. 2016.

POOLE, C. F.; DIAS, N. C. Practitioner's guide to method development in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography**, A, 892: p. 123-142, 2000. Disponível em: <<http://ac.els-cdn.com/>>. Acesso em: 15 jul. 2016.

RODRIGUES, V. C.; SILVA, M. V.; SANTOS, A. R.; ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I. Evaluation of hot and cold extraction of bioactive compounds in teas, **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 2038–2045, 2015.

SANTOS, M. H.; Bruno Lemos BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. S.; ABREU, C. M. P.; GOUVÊA, C. M. C. P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*cofea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

SOCCOL, C. R. Resíduo de café: um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. **I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. Brasília: EMBRAPA, ed. 1, v. 1, p. 83-98, 2002.

TAGURI, T., TANAKA, T.; KOUNO, I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, n. 27, p. 1965–1969, 2004.

USDA. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. **Coffee Summary**. fev. 2015. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

VEGRO, C. L. R.; CARVALHO, F. C. Disponibilidade e utilização de resíduos gerados no processamento agroindustrial do café. Informações econômicas. **Instituto de Economia Agrícola**, São Paulo, v. 24, n.1, p. 9-16. 1994.

YOSHIDA, L. M. Extração de solúveis da casca do café torrado. 2005. 223 f. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia. 2005.

ZOCA, S. M. Avaliação da liberação de potássio por resíduos do benefício do café. 2012. 57 f. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista. 2012. Disponível em: <<http://www.pg.fca.unesp.br/Teses/PDFs/Arq0789.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2016.