

# DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO CLOROGÊNICO NOS GRÃOS DE CAFÉ VERDE RECOBERTOS PARA LIBERAÇÃO ENTÉRICA

Guilherme Pecoraro Parpulov<sup>1</sup>; Kaciane Andreola<sup>2</sup>; Tatiana Guinoza Matuda Masaoka<sup>2</sup>; Marcello Nitz<sup>2</sup>; Luciane Franquelin Gomes de Souza<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aluno de iniciação científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);

<sup>2</sup>Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

**Resumo.** *Os ácidos clorogênicos (ACGs) são um dos principais componentes da fração fenólica dos grãos de café verde e apresentam propriedades benéficas à saúde. São agentes hepatoprotetores, hipoglicemiantes, antivirais e antioxidantes. Entretanto, apenas um terço dos ACGs alcançam o trato gastrointestinal após ingestão. O presente trabalho tem o objetivo de determinar o teor de ACG presente nos grãos moídos de café verde arábica recobertos com polímero de liberação entérica. Os grãos de café verde in natura apresentaram teor de ACG de 9,0 %. O teor de ACG nos grãos recobertos com ganho de camada polimérica de 14 % a 18 %, variou de 6,0 % a 6,7 %. Esse resultado possibilita que esses grãos sejam acondicionados em cápsulas de 2,5 g a 4,0 g, a fim de conferir o mesmo teor de ACG ingerido por uma pessoa que consome cerca de quatro xícaras de café diariamente.*

## Introdução

O Brasil é um dos maiores produtores de café do mundo, o grão de café movimenta um alto fluxo monetário. Desde a sua chegada em 1720, trazida por Francisco de Melo de Palheta, foi plantado pela primeira vez no estado do Pará. Ganhou força na economia do país a partir de 1920. Os Estados Unidos e alguns países Europeus haviam sancionado a lei seca, a partir deste marco, o Brasil começou a exportar muitas safras de café, se tornando o maior produtor de café do mundo, sendo responsável por 30 % da comercialização mundial (ICO, 2016). O Brasil é um dos maiores exportadores de café do mundo. No cenário do agronegócio nacional, o café é o 4º produto mais exportado (Ministerio da agricultura, 2019), o que demonstra a importância e a relevância de estudos que envolvam a cadeia do café. O café é considerado uma das fontes mais ricas de compostos fenólicos, sendo os ácidos clorogênicos (ACGs) os principais compostos antioxidantes encontrados nos grãos de café verde. Durante o processo de torra, devido à sua alta exposição ao calor, suas propriedades antioxidantes advindas principalmente dos ACGs, que compõem aproximadamente 12 % da sua composição *in natura* total, são perdidas (Trugo e Macrae, 1984).

O ACG é um éster do ácido cafeico e ácido quínico, pertencente ao grupo dos ésteres polifenóis e é um dos principais compostos fenólicos não voláteis do café (Moreira *et al.*, 1998). O ACG possui diversos isômeros e os principais são: 1-A-CG, 3-ACG, 5-ACG e 6-ACG. Sua solubilidade é alta em temperaturas entre 50 °C e 90 °C, porém sofre rápida degradação a temperaturas elevadas, a partir dos 100 °C (Redgwell *et al.*, 2002). O café verde, quando passa pelo processo de operação unitária de torrefação pode perder de 60,9 % a 59,7 % de ACG para o tipo de café arábica e robusta, respectivamente (Moreira *et al.*, 1998). Segundo Farah *et al.* (2006), os valores descritos na literatura para o teor de ACG em grãos de café verde pode variar de 4 a 8,4 % para o café arábica e de 7 a 14,4 % para o café canéfora, com base na matéria seca. Moon *et al.* (2009) determinaram o teor de ACG em grãos de café verde orgânicos na faixa de  $61,15 \pm 1,40$  a  $86,42 \pm 2,04$  mg/g, com base na matéria úmida. Dado *et al.* (2019) determinaram o teor médio de 6,23 % de ácido clorogênico, em matéria seca, nos grãos de café verde arábica.

O ACG é uma importante substância para a saúde humana, pois atua como um antioxidante, auxilia no metabolismo e no controle da hipertensão (Garambone e Glorimar,

2008). Ainda, o ACG atua no controle de diabetes e obesidade, além de possuir efeitos anti-inflamatório, cognitivo e neuroprotetor (Heitmn e Ingram, 2014), também combatendo doenças cardiovasculares (Tajik *et al.*, 2017). Vários estudos na literatura demonstram os efeitos do ACG, antitrombótico, anti-inflamatório, redutor de efeitos oxidativos provocados por radicais livres, controle de alguns tipos de câncer, diabetes tipo 2 e controle da obesidade, aumentando o interesse da população na suplementação dietética de ACG como agente nutracêutico (Fuentes *et al.*, 2014). Segundo Bae *et al.* (2014), a ingestão moderada de cafeína em adultos saudáveis é de 300 mg/dia, o equivalente a aproximadamente 4 xícaras de café (Fernandes *et al.*, 1998). Segundo Garambone e Glorimar (2008), um litro de café contém de 500 a 800 mg de ACG. Portanto, um indivíduo com ingestão moderada de cafeína, ingere cerca de 160 a 250 mg de ACG diariamente.

Segundo Laporte *et al.* (1989), no começo do século XIX, a maioria dos medicamentos eram remédios de origem natural, de estrutura química e natureza desconhecidas. No entanto, com as descobertas de novas tecnologias, este cenário mudou. A indústria farmacêutica no Brasil cresce a cada ano, este mercado movimentou cerca de 73,3 bilhões de reais no ano de 2018 (Anvisa, 2018). Com o auxílio da tecnologia consegue-se atender todas as demandas, qualidade e quantidade. Isso se deve ao Brasil evoluir cada vez mais nas áreas de pesquisas, com investimentos e aprimoramento em pesquisas nacionais.

Uma alternativa de consumo, que aumenta a disponibilidade do ácido clorogênico, tem sido as cápsulas produzidas a partir do pó de café verde. Entretanto, seu gosto amargo e a baixa concentração deste que atinge o sistema sanguíneo para ser metabolizado no fígado tem reduzido os efeitos que o consumo pode proporcionar. A fim de superar a suscetibilidade e melhorar a estabilidade destes compostos bioativos durante o processamento e armazenamento, a tecnologia de recobrimento tem sido frequentemente aplicada nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Além de protegê-los das condições adversas ambientais e de armazenamento, o recobrimento de tais compostos também pode mascarar sabores indesejáveis e oferecer condições de liberação controlada, de acordo com o resultado que se pretende alcançar com a utilização do ativo (Villanova *et al.*, 2010).

Após a ingestão, apenas um terço dos ACGs são absorvidos pelo trato gastrointestinal inferior e chegam à circulação sanguínea para posterior metabolização no fígado (Cho *et al.*, 2010; Lou *et al.*, 2011; Ong *et al.*, 2012). Limitações referente a degradação térmica e degradação em condições fisiológicas do trato gastrointestinal superior dificultam a aplicação desse composto nas indústrias farmacêutica e alimentícia, sendo necessário a busca de alternativas tais como a encapsulação e o recobrimento, que sejam capazes de garantir a estabilidade e funcionalidade antioxidante do ácido clorogênico. (Nedovic *et al.*, 2011; Lozano-Vazquez *et al.*, 2015). Dessa maneira, o recobrimento entérico ou gastrorresistente representa uma alternativa para garantir a estabilidade e a funcionalidade antioxidante do ACG, uma vez que esse tipo de recobrimento tem a função de proteger a substância da degradação pelo fluido gástrico, permitindo que a liberação do ACG ocorra apenas no trato gastrointestinal (Veiga, 1998; Allen Jr *et al.* 2007).

Diante deste cenário, o objetivo deste trabalho foi determinar o teor de ACG presente nos grãos de café verde que foram recobertos com polímero de liberação entérica, em uma pesquisa concomitante a esta. Este estudo possibilitará determinar futuramente os perfis de liberação do ACG, nos grãos de café verde recobertos em meio ácido e meio básico, simulando o fluido gástrico e o trato intestinal, respectivamente.

## **Material e Métodos**

### Materials

As partículas utilizadas como matéria-prima do processo de recobrimento foram grãos moídos de café arábica na sua forma crua (verde), doados pela Cooperativa Regional dos Cafeicultores em Guaxupé LTDA-COOXUPE. A quantidade e o tamanho das partículas utilizados no processo de recobrimento são apresentados na Tabela 1. O processo de recobrimento seguiu um planejamento fatorial completo de dois níveis, com três repetições no ponto central. A temperatura do ar de entrada (35°C a 45°C) e a vazão da suspensão polimérica de Eudragit L100 com 15 % de sólidos (1,5 g/min a 3,5 g/min), foram os fatores analisados. O ganho de camada real no processo de recobrimento e a umidade dos grãos recobertos foram algumas das respostas estudadas. As diferenças entre as médias dos resultados foram avaliadas estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA), aplicando-se o Teste de Tukey, nível de confiança de 95 %, com o auxílio do software Minitab®16.0 (Minitab Inc, USA).

Tabela 1 – Granulometria dos grãos de café verde *in natura* e recobertos utilizados no recobrimento

Material	Faixa Granulométrica (mm)	Quantidade (g)
Grãos <i>in natura</i> e recobertos	+2,38 –2,00	80,00
	+2,00 –1,40	130,00

#### Preparo da Solução Padrão

Para a obtenção da curva de calibração e quantificação do teor de ACG nos grãos de café verde, foi adquirido o padrão de ACG da *The United States Pharmacopeial Convention* (USP). Foi preparada uma solução de estoque de 100 mg·L<sup>-1</sup> em água destilada e, a partir desta, foram obtidas soluções diluídas de concentrações (5, 10, 15, 20 e 25) mg·L<sup>-1</sup>, de acordo com Dado *et al.* (2019). As vidrarias foram envolvidas em papel alumínio e protegidas da luz. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro UV/Vis em um comprimento de onda de 324 nm. Este comprimento de onda foi determinado pela varredura feita nas faixas de comprimento de onda entre 200-500 nm, em que se obteve o valor máximo de absorvância, como descrito pela lei de Beer Lambert. O ajuste da reta aos pontos experimentais foi realizado com o auxílio do Excel.

#### Remoção da cafeína – Extração líquido-líquido

O método de extração da cafeína foi realizado segundo Belay *et al.*, 2008, com adaptações. As amostras compostas por 40 g de grãos de café verde, com faixa granulométrica de acordo com a Tabela 1, foram trituradas em um Moedor (Hamilton Beach) no modo grãos finos, e então, peneirados em uma peneira de 425  $\mu$ m. Uma alíquota de 12 mg de café verde foi retirada, pesada em uma balança analítica e adicionada com 60 mL de água destilada. A solução foi colocada em um béquer e agitada em um agitador magnético por 60 minutos, a uma temperatura aproximada de 65 °C. Em seguida, a solução foi filtrada em um funil de vidro com um filtro de papel, para remoção das partículas de café.

A extração da cafeína foi feita com o uso do solvente orgânico diclorometano (Sigma-Aldrich), a fim de evitar a sobreposição espectral da cafeína no ACG. Fez-se uma solução na proporção (25:25). A solução composta pela água, compostos fenólicos e diclorometano foi colocada em um béquer e agitada em um agitador magnético por 10 minutos à temperatura ambiente. A separação foi feita por fases em um funil de separação. Assim, a cafeína pôde ser removida da solução e o ACG determinado. Este processo foi repetido 4 vezes, a fim de garantir maior remoção da cafeína. No espectrofotômetro, a solução foi lida no comprimento de onda de 324 nm, que corresponde à máxima absorção do ACG.

### Teor do ácido clorogênico

A concentração de ACG nos grãos de café verde foi calculada a partir da equação obtida na curva de calibração do ACG padrão. Com a absorbância medida no comprimento de onda de 324 nm, foi possível determinar a quantidade de ACG presente na amostra, por meio das equações (1), (2) e (3). As análises foram feitas com grãos moídos *in natura* e recobertos, de acordo com a Tabela 1, em triplicata.

$$Massa_{ACG}(mg) = \frac{C_{ACG}(mg/L) \cdot V_{amostra}(mL)}{1000} \quad (1)$$

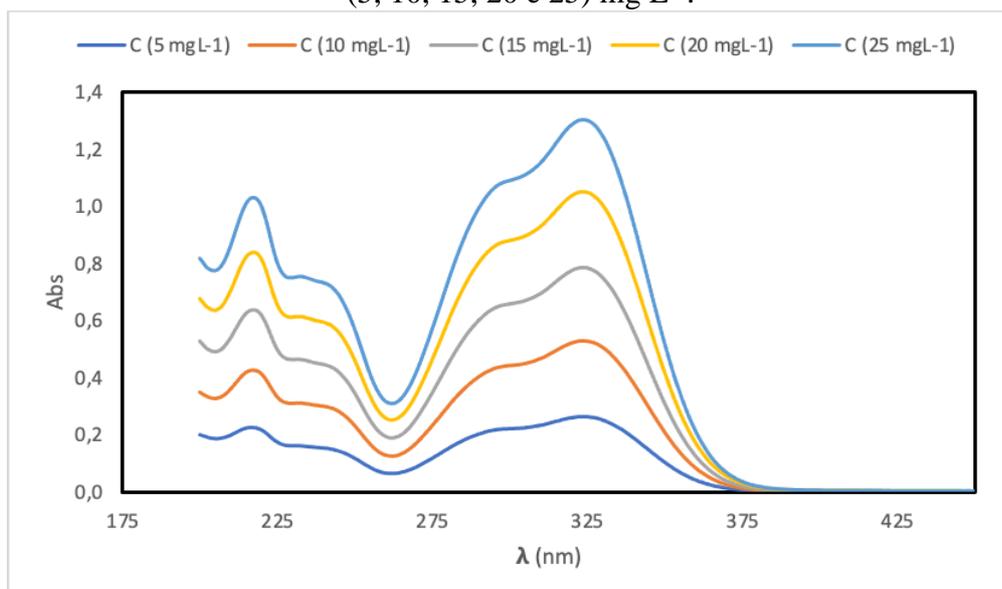
$$Teor\ de\ ACG\ (b.u)\ \% = \frac{Massa_{ACG}(mg)}{massa\ de\ café\ da\ amostra\ (mg)} \cdot 100 \quad (2)$$

$$Teor\ de\ ACG\ (b.s)\ \% = \frac{Massa_{ACG}(mg)}{massa\ seca\ de\ café\ da\ amostra\ (mg)} \cdot 100 \quad (3)$$

### Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta os espectros de absorção do ACG nas concentrações de (5, 10, 15, 20 e 25) mg·L<sup>-1</sup>, nos comprimentos de onda entre 200 e 500 nm, à temperatura ambiente. Observa-se dois pontos de máximo, o primeiro em 217 nm e o segundo em 324 nm. O ponto de máximo em 324 nm foi o mais alto, correspondendo a transição Homo → Lumo, corroborando com Belay *et al.* (2009).

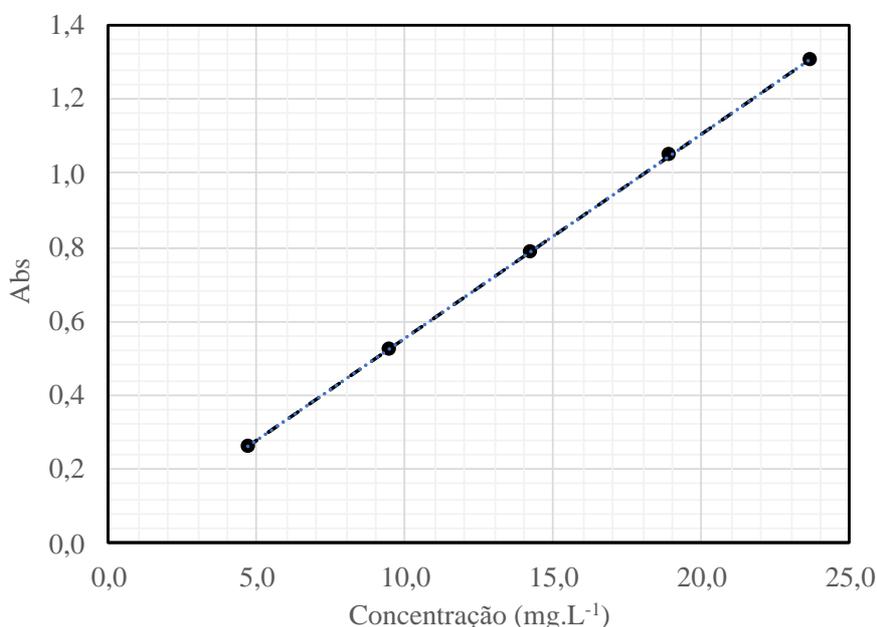
Figura 1 – Espectro de absorção no UV-Vis do ACG em água destilada nas concentrações de (5, 10, 15, 20 e 25) mg·L<sup>-1</sup>.



A Figura 2 apresenta a curva de calibração para quantificação do ACG em água destilada. A concentração de ACG presente nas amostras de café verde foi determinada por

meio da Equação 4. O ajuste linear apresentou boa qualidade, com valor de  $R^2$  muito próximo da unidade (0,9999).

Figura 2 - Curva de calibração do ACG em água destilada



$$C_{ACG}(mg/L) = \frac{ABS - 2,6 \cdot 10^{-3}}{5,5 \cdot 10^{-2}} \quad (4)$$

A Tabela 2 apresenta o teor de ACG nos grãos moídos de café verde *in natura*. Este teor está próximo ao maior valor (8,4 %) relatado por Farah *et al.* (2006), e superior em dois pontos percentuais ao valor médio de 6,2 % encontrado por Dado *et al.* (2019), para grãos de café arábica. O teor de ACG determinado no presente estudo também corrobora com a faixa de  $61,15 \pm 1,40$  mg/g a  $86,42 \pm 2,04$  mg/g encontrada por Moon *et al.* (2009), em grãos de café verde orgânicos.

Tabela 2 – Resultados obtidos a partir dos grãos de café *in natura*.

<b>Grãos de café verde <i>in natura</i></b>		
ACG (% b.s)	ACG (b.u) (mg/g)	U <sub>b,u</sub> (%)
9,0 ± 0,4	80 ± 5	10,5 ± 0,1

A Tabela 3 apresenta os valores médios do teor de ACG obtidos nos grãos de café recobertos nos 7 ensaios realizados em uma pesquisa concomitante a esta. Os teores de ACG nos grãos recobertos apresentaram valores entre 6,0 e 6,7 %, indicando que são valores estatisticamente iguais considerando um nível de confiança de 95 %. Esses teores são inferiores ao teor de ACG dos grãos de café *in natura* (Tabela 2), o que era esperado, devido ao ganho polimérico conferido no processo de recobrimento (Tabela 3).

Os valores de teor de ACG teórico foram calculados com base no ganho polimérico de camada real adquirido no processo de recobrimento (Tabela 3). Observa-se que os teores de ACG nos grãos recobertos experimentais são inferiores aos valores teóricos calculados, para um mesmo ensaio. Alguns fatores podem explicar essa diferença. Durante o processo de recobrimento, os grãos de café verde são expostos à luz por aproximadamente 2 horas

favorecendo a degradação do ACG (Trugo e Macrae, 1984). Além disso, o polímero de recobrimento pode criar uma barreira e dificultar a extração do ACG dos grãos recobertos, resultando em teores teóricos menores que os teores experimentais. Os grãos utilizados para a determinação do teor de ACG pertencem a duas faixas granulométricas distintas e, segundo Dado *et al.* (2019), partículas menores contêm uma quantidade menor de ACG.

Tabela 3 – Resultados obtidos nos grãos de café recobertos.

	<b>Grãos de café recobertos</b>					
	ACG (% b.u) Experimental	ACG (% b.u) Teórico	ACG (b.s) (mg/g) Experimen tal	ACG (b.u) (mg/g) Teórico	U <sub>b.u</sub> (%)	Ganho de camada real (%)
Ensaio 1	6,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	7,8 ± 0,1	60,8 ± 1,3	72,1 ± 0,6	7,8 ± 0,3	15,0
Ensaio 2	6,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	7,8 ± 0,0	55,7 ± 2,6	72,1 ± 0,0	7,6 ± 0,3	15,2
Ensaio 3	6,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	7,7 ± 0,2	60,4 ± 2,9	73,1 ± 1,4	5,5 ± 0,2	13,9
Ensaio 4	6,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	7,9 ± 0,1	58,2 ± 2,2	73,5 ± 0,9	7,4 ± 0,1	18,0
Ensaio 5	6,7 ± 0,6 <sup>b</sup>	7,8 ± 0,1	62,8 ± 5,4	73,3 ± 1,1	6,6 ± 0,1	13,9
Ensaio 6	6,7 ± 0,3 <sup>b</sup>	7,7 ± 0,1	62,5 ± 2,3	72,5 ± 1,3	6,6 ± 0,1	15,1
Ensaio 7	6,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	7,7 ± 0,1	59,7 ± 0,9	71,9 ± 1,2	7,2 ± 0,1	15,1

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

De acordo com Bae *et al.* (2014) e Garambone e Glorimar (2008), o consumo moderado de café proporciona a ingestão diária de 160 a 250 mg de ACG. Os grãos recobertos nesse trabalho podem ser acondicionados em cápsulas de 2,5 g a 4,0 g, a fim de conferir esse teor de ACG. Dessa maneira, uma pessoa que não consome café poderá ingerir a mesma quantidade de ACG que um consumidor moderado da bebida.

## Conclusão

Os teores de ACG nos grãos recobertos apresentaram valores entre 6,0 e 6,7 %, possibilitando que esses grãos sejam acondicionados em cápsulas de 2,5 g a 4,0 g, a fim de conferir o teor de ACG equivalente ao ingerido por um consumidor moderado de café. Dessa maneira, uma pessoa que não consome café poderá ingerir a mesma quantidade de ACG que um consumidor que ingere cerca de quatro xícaras da bebida.

Os resultados e metodologias para extração e determinação do teor de ACG nos grãos recobertos obtidos no presente trabalho possibilitarão um estudo dos perfis de liberação do ACG, nos grãos de café verde recobertos em meio ácido e meio básico, simulando o fluido gástrico e o trato intestinal, respectivamente.

## Referências bibliográficas

- Allen JR., L. V.; Popovich, N. G.; Ansel, H. C. (2007) *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8. ed. Porto Alegre: Artmed.
- Anvisa. (2018) *Farmacopeia Brasileira*. Brasília.
- Bae, J.H.; Park, J.H.; Im, S.S.; Song, D.K. (2014) Coffee and health. *Integrative Medicine Research*, **3**, 189-191.
- Belay, A.; Gholap, A. (2009) Characterization and determination of chlorogenic acid (CGA) in coffee beans by UV-vis spectroscopy. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, **3**, 234-240.
- Belay, A.; Ture, K.; Redi, M.; Asfaw, A. (2008) Measurement of Caffeine in Coffee Beans with UV/Vis Spectrometer. *Food Chemistry*, **108**, 310-315.
- Cho A.S.; Jeon, S.M.; Kim, M.J.; Yeo, J.; Seo, K.; Choi, M.S.; Lee, M.K. (2010) Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 937–943.
- Dado, A.T.; Asresahegn, Y.A.; Gorova, G. (2019) Determination of chlorogenic acid content in beans and leaves of coffee arabica using UV/Vis spectrometer. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, **13**, 58-63.
- Farah, A.; Moreira, D.P.; Trugo, L.C.; Martin, P.R. (2006). Chlorogenic acid and lactones in regular and water de-caffeinated Arabica coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 374- 381.
- Fernandes, O.; Sabharwal, M.; Smiley, T.; Pastuszek, A.; Koren, G.; Einarson, T. (1998) Moderate to heavy caffeine consumption during pregnancy and relationship to spontaneous abortion and abnormal fetal growth: a meta-analysis. *Reproductive Toxicology*, **12**, 435–444.
- Fuentes, E.; Caballero, J.; Alarcón, M.; Rojas, A.; Palomo, I. (2014). Chlorogenic acid inhibits human platelet activation and thrombus formation. *PLOS One*, **9**, e90699.
- Garambone, E.; Glorimar, R. (2008) Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. *Alimentos e Nutrição*, **18**, 229-235.
- Heitman, E.; Ingram, D.K. (2014) Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid. *Nutritional Neuroscience*.
- ICO - International coffee organization (2016). Analysis of statistical data of coffee.
- Trugo, L.C.; Macrae, R. (1984) A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chemistry*, **15**, 219-227.
- Laporte, J.R.; Tognoni, G.; Rosenfeld, S. (1989) *Epidemiologia do medicamento: princípios gerais*. Hucitec – Abrasco.
- Lou, Z.; Wang, H.; Zhu, S.; Ma, C.; Wang, Z. (2011) Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *Journal of Food Science*, **76**, M398–403.
- Lozano-Vazquez, G.; Lobato-Calleros, C.; Escalona-Buendia, H.; Chavez, G.; Alvarez-Ramirez, J.; Vernon-Carter, E.J. (2015) Effect of the weight ratio of alginate-modified tapioca starch on the physicochemical properties and release kinetics of chlorogenic acid containing beads. *Food Hydrocolloids*, **48**, 301–311.
- Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (2019). Café no Brasil.
- Moon, J.K.; Yoo H.S.; Shibamoto, T. (2009) Role of roasting conditions in the level of chlorogenic acid content in coffee beans: correlation with coffee acidity. *Journal of Agricultural and food chemistry*, **57**, 5365–5369.
- Moreira, R.F.A.; Trugo.; L.C.; Maria.; C.A.B. (2000) Componentes voláteis do café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. *Química Nova*, **23**, 195–203.
- Nedovic, V.; Kalusevic, A.; Manojlovic, V.; Levic, S.; Bugarski, B. (2011) An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, **1**, 1806–1815.

- Ong, K.W.; Hsu, A.; Tan, B.K.H. (2012) Chlorogenic Acid Stimulates Glucose Transport in Skeletal Muscle via AMPK Activation: A Contributor to the Beneficial Effects of Coffee on Diabetes. *PLOS One*, **7**, e32718.
- Redgwell, R.J.; Trovato, V.; Curti, D.; Fischer, M. (2002) Effect of roasting on degradation and structural features of polysaccharides in Arabica coffee beans. *Carbohydrate Research*, **337**, 421–431.
- Tajik, N.; Tajik, M.; Mack, I.; Enck, P. (2017) The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *European journal of nutrition*. Published online.
- Veiga, F. J. B. (1988) *Medicamentos orais de liberação controlada: comprimidos matriciais hidrófilos*. Coimbra, Boletim Faculdade de Farmácia de Coimbra.
- Villanova, J.C.O.; Oréfice, R.L.; Cunha, A.S. (2010) Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros*, **20**, 51-64.