

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

**Lucas Taffarel Cruz**

**Potencial biotecnológico do fungo *Aspergillus awamori* para  
biotransformação do café verde (*Coffea arabica* L.)**

**Juiz de Fora**  
**2017**

**Lucas Taffarel Cruz**

**Potencial biotecnológico do fungo *Aspergillus awamori* para  
biotransformação do café verde (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia  
da Universidade Federal de Juiz de Fora  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Pereira Rodarte.  
Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela

Juiz de Fora

2017

Cruz, Lucas Taffarel.

Potencial biotecnológico do fungo *Aspergillus awamori* para biotransformação do café verde (*Coffea arabica* L.) / Lucas Taffarel Cruz. -- 2017.

61 p. : il.

Orientadora: Mirian Pereira Rodarte

Coorientador: Fernanda Maria Pinto Vilela

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

1. Fenólicos. 2. Antioxidante. 3. Ácido 5-cafeoilquínico. 4. Ácido cafeico. 5. Cafeína. I. Rodarte, Mirian Pereira , orient. II. Vilela, Fernanda Maria Pinto , coorient. III. Título.

**Potencial biotecnológico do fungo *Aspergillus awamori* para  
biotransformação do café verde (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia  
da Universidade Federal de Juiz de Fora  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas

Apresentada em 10 fevereiro de 2017

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Mirian Pereira Rodarte.- Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Profa. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória  
Universidade Federal de Minas Gerais

---

Profa. Dra. Maria Silvana Alves  
Universidade Federal de Juiz de Fora

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Dr.<sup>a</sup> Mirian Pereira Rodarte, meus sinceros agradecimentos pela confiança, amizade e ensinamentos.

À Dr.<sup>a</sup> Fernanda Maria Pinto Vilela, pela coorientação, pelo esforço e vários ensinamentos passados.

Aos Membros da banca pela participação e pelas considerações.

Aos professores, Dr. Orlando Vieira de Sousa, Dr. Humberto Moreira Húngaro e Dr. Ademar Alves da Silva Filho, por disponibilizarem os laboratórios.

À Farmacêutica Carolina Gasparetto por auxiliar no manuseio do HPLC.

Aos meus pais, que não mediram esforços para me ajudar a alcançar meus objetivos.

À Marinna, pelo carinho, apoio e compreensão, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas do laboratório, pela amizade e auxílio nas atividades.

À CAPES, FAPEMIG e CNPQ, pelo suporte financeiro.

## RESUMO

O aumento da utilização de grãos de café verde em diferentes formas farmacêuticas deve-se principalmente à sua significativa atividade antioxidante. Os processos de biotransformação, empregando microrganismos, podem modificar as substâncias presentes em produtos naturais, visando o aumento da atividade biológica ou a síntese de novas substâncias. O objetivo do presente estudo foi avaliar o processo de biotransformação de grãos de café verde empregando *Aspergillus awamori* CCDCA 1041, utilizando a fermentação em estado sólido. A quantificação de substâncias fenólicas, ácido 5 cafeoilquínico (5-ACQ), ácido cafeico e cafeína foram determinadas nos extratos de café verde antes e após a biotransformação nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. A atividade antioxidante dos extratos biotransformados foi determinada pelos métodos 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e poder redutor do ferro. Os maiores teores de substâncias fenólicas, 5-ACQ, ácido cafeico e cafeína foram observados no tempo de 48 horas de fermentação. O extrato de café verde biotransformado apresentou maior atividade antioxidante pelos métodos avaliados, quando comparado ao extrato não biotransformado. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a biotransformação dos grãos de café verde, por *Aspergillus awamori* CCDCA 1041, pode ser empregada para a obtenção de maiores concentrações das substâncias avaliadas, assim como para o aumento da atividade antioxidante.

Palavras chave: Fenólicos, antioxidante, ácido 5-cafeoilquínico, ácido cafeico, cafeína.

## ABSTRACT

The augmentation in the utilization of green coffee beans in different pharmaceutical formulations is due to their significant antioxidant activity. Biotransformation processes employing microorganism may modify substances present in natural products aiming increase in biological activity or synthesis of novel compounds. The objective of the present work was to evaluate the biotransformation process of green coffee beans by *Aspergillus awamori* CCDCA 1041 in solid state fermentation. Quantification of phenolic compounds, 5-ACQ, caffeic acid and caffeine was performed in green coffee beans extracts prior and after biotransformation for 24, 48, 72 and 96 hours. Antioxidant activity of biotransformed extracts was assayed by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power assays. The extracts fermented for 48 hours presented the highest concentrations of phenolic compounds, 5-ACQ, caffeic acid and caffeine. The biotransformed extract of green coffee beans presented augmented antioxidant activity when compared to the non-biotransformed when evaluated by the methods utilized. The results presented in this work demonstrate that biotransformation of green coffee beans by *Aspergillus awamori* CCDCA 1041 may be employed to attain higher concentrations of the evaluated compounds as well as more prominent antioxidant activity.

Keywords: Phenolic, antioxidant, 5-caffeoylquinic acid, caffeic acid, caffeine.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema ilustrativo do corte longitudinal do grão de café .....	13
Figura 2 - Esquema de produção das substâncias fenólicas: Rota do ácido chiquímico e do AcetilCoA.....	177
Figura 3 - Proposta biossintética para derivados do ácido cinâmico .....	188
Figura 4 - Ácidos clorogênicos presentes no café .....	20
Figura 5 - Molécula da cafeína. ....	21
Figura 6 – Teores de substâncias fenólicas durante o processo de biotransformação de café verde ( <i>Coffea arabica</i> L.) por <i>Aspergillus awamori</i> CCDCA 1041 .....	36
Figura 7 - Atividade antioxidante, pelo método DPPH, durante o processo de biotransformação de café verde ( <i>Coffea arabica</i> L.) por <i>Aspergillus awamori</i> CCDCA 1041 .....	37
Figura 8 - Atividade antioxidante, pelo método do poder redutor, durante o processo de biotransformação de café verde ( <i>Coffea arabica</i> L.) por <i>Aspergillus awamori</i> CCDCA 1041.....	39
Figura 9 – Perfil cromatográfico do extrato de café verde não biotransformado . ...	400
Figura 10 – Perfil cromatográfico do extrato de café verde biotransformado (24h).	400
Figura 11 – Perfil cromatográfico do extrato de café verde biotransformado (48h).	411
Figura 12 – Perfil cromatográfico do extrato de café verde biotransformado (72h).	411
Figura 13 – Perfil cromatográfico do extrato de café verde biotransformado (96h).	422



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação das substâncias fenólicas. ....	16
Tabela 2- Classificação dos radicais livres.....	24
Tabela 3 - Equações das retas e coeficientes de correlação linear. ....	39
Tabela 4 – Concentrações de 5-ACQ, ácido cafeico e cafeína ( $\mu\text{g/mL}$ ) durante o processo de biotransformação de café verde ( <i>Coffea arabica</i> L.) por <i>Aspergillus awamori</i> CCDCA 1041.....	42

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 REVISAO DA LITERATURA</b> .....	12
2.1 GRÃOS DE CAFÉ .....	12
2.2 SUBSTÂNCIS FENÓLICAS .....	15
2.3 CAFEÍNA .....	21
2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	23
2.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS .....	25
2.6 FUNGOS FILAMENTOSOS .....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	29
OBJETIVO GERAL .....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 AMOSTRAS DE CAFÉ VERDE .....	30
4.2 MATERIAL BIOLÓGICO .....	30
4.3 PREPARO DO INÓCULO FÚNGICO .....	30
4.4 BIOTRANSFORMAÇÃO DO CAFÉ VERDE .....	30
4.4.1 Extração dos metabólitos .....	31
4.4.2 Determinação do teor de sólidos totais .....	31
4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS FENOLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS DE CAFÉ VERDE .....	31
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE CAFÉ VERDE .....	32
4.6.1 Método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) .....	32
4.6.2 Método do poder redutor do ferro .....	33
4.7 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ÁCIDO CAFEICO E CAFEÍNA .....	33
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
<b>5 RESULTADOS</b> .....	36
5.1 AVALIAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS DURANTE O PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE CAFÉ VERDE ( <i>Coffea arabica</i> L.) .....	36
5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE O PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE CAFÉ VERDE ( <i>Coffea arabica</i> L.) .....	37
5.2.1 Método do sequestro do radical DPPH .....	37
5.2.2 Método do poder de redução do ferro .....	38
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE 5-ACQ, ÁCIDO CAFEICO E CAFEÍNA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA .....	39
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	48

## 1 INTRODUÇÃO

Os grãos de café verde apresentam comprovada atividade antioxidante. Dentre as substâncias relacionadas a essa atividade biológica, destacam-se os fenólicos, em especial os ácidos clorogênicos (ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012). A maior parte dos ácidos clorogênicos e cinâmicos presentes nos grãos de café forma ésteres com açúcares, lipídios e polissacarídeos (BEL-RHLID et al., 2013; FARAH; DONANGELO, 2006; TORRES-MANCERA et al., 2013). A ligação de substâncias bioativas, provenientes de fontes naturais, a moléculas de açúcares ou outros conjugados pode interferir na atividade da substância, alterando a biodisponibilidade e a ligação ao receptor (FAN et al., 2013).

O processo de biotransformação utiliza sistemas biológicos (enzimas ou microrganismos) para produzir alterações em estruturas químicas (HANSON, 1995). Comparado à síntese orgânica, apresenta vantagens, como por exemplo, alta estereosseletividade, redução de reações adversas, condições de reação brandas, facilidade no processo e separação dos produtos, redução de custos e biosustentabilidade (LIU; YU, 2010).

Os fungos filamentosos, que se destacam como produtores de enzimas, têm recebido grande atenção pelos resultados promissores na biotransformação de substâncias bioativas de fontes vegetais (MARTINS et al., 2002). A biotransformação de compostos fenólicos e outras substâncias presentes em fontes vegetais ou em produtos delas advindos, pode proporcionar um aumento da concentração de substâncias livres e da atividade funcional desses antioxidantes (BANERJEE; SINGH; RAHMAN, 2012; ANDRADE et al., 2013).

As substâncias antioxidantes presentes no café estão associadas à prevenção de diversas doenças crônicas não transmissíveis. Além do consumo da bebida obtida a partir dos grãos torrados, o extrato dos grãos de café verde é utilizado em diferentes formas farmacêuticas e em produtos dermocosméticos (ALMEIDA et al., 2006; CHANG et al., 2010; DÓREA; DA COSTA, 2005).

Os grãos de café verde podem ser utilizados como extrato seco adicionado a sucos e outras bebidas; extrato aquoso consumido diretamente como bebida, pós e cápsulas e extratos adicionados a produtos dermocosméticos (OCHIAI et al., 2004; WATANABLE et al, 2006).

Considerando a importância de fontes naturais de antioxidantes e outras substâncias bioativas, a expressiva produção de café no país e o aumento da utilização de extrato de café verde pela população em diferentes formas, o presente trabalho foi realizado visando a melhoria de atividades biológicas dos grãos de café verde, por meio da biotransformação, empregando *Aspergillus awamori*.

## 2 REVISAO DA LITERATURA

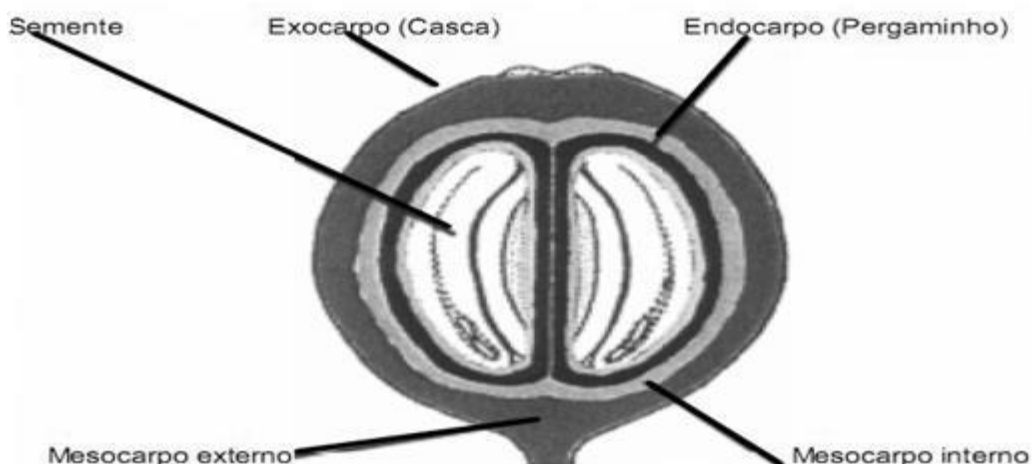
### 2.1 GRÃOS DE CAFÉ

O café pertence à família Rubiaceae, que inclui mais de seis mil espécies, sendo que a maioria delas é arbustos tropicais. Os grãos de café são produzidos pela planta *Coffea* L., originária da África e de algumas ilhas do Oceano Índico. Do ponto de vista econômico, as duas espécies mais importantes cultivadas são a *arábica* e *canephora* (café *robusta* ou *conilon*) (FIUZA et al., 2009).

O café *arábica* cresce normalmente em altitudes elevadas (600-2.000 m) e responde por aproximadamente 80% da produção mundial de café. O café *robusta* pode crescer em altitudes mais baixas, as lavouras são mais produtivas, possui maior resistentência a doenças, no entanto produz grãos de qualidade sensorial inferior, se comparado ao *arábica*. A bebida obtida do café *robusta* não possui sabores variados e diferenciados, no entanto apresenta maiores concentrações de sólidos solúveis. Devido a essa característica, os grãos de café *robusta* são empregados na indústria de café solúvel. Além dessas diferenças, o café *robusta* apresenta 2,5% de cafeína e 8 a 12% de ácidos clorogênicos enquanto o *arábica* apresenta 1%. e 7 a 10%, respectivamente (KY et al., 2001; MUSSATTO et al., 2011).

Conforme apresentado na Figura 1 o fruto do cafeeiro é formado por duas sementes e o pericarpo. O pericarpo é diferenciado em exocarpo, mesocarpo e endocarpo. O exocarpo, comumente denominado casca, é o tecido mais externo do fruto. O mesocarpo, também denominado mucilagem, está fortemente aderido ao pergaminho do grão. O endocarpo ou pergaminho é a estrutura mais interna, sendo composto essencialmente por material celulósico. A semente do café é formada pelo embrião, endosperma (o principal tecido de reserva) e por um envoltório, denominado película prateada (AVALLONE et al., 2000; BORÉM, 2008).

Figura 1 – Esquema ilustrativo do corte longitudinal do grão de café



Fonte: Adaptado de (AVALLONE *et al.*, 2000)

O Brasil é o maior produtor mundial de café e tem garantido a manutenção e o crescimento da participação no mercado internacional devido ao clima propício e a qualidade dentro dos padrões exigidos (CAVALARI *et al.*, 2010).

A partir dos grãos beneficiados pode ser produzida a bebida de café torrado que se destaca no mercado internacional como uma das mais consumidas e apreciadas (KUMAZAWA; MASUDA, 2003).

O café pode ser processado, após a colheita, por meio de duas vias: seca ou úmida. Os grãos submetidos a esses processamentos apresentam significativas diferenças sensoriais, quando submetidos à torração. O processamento via seca consiste em secar os frutos com todas as suas partes constituintes, ou seja, casca, polpa, mucilagem, pergaminho e o grão. Desta forma, esses cafés requerem um maior tempo para serem secados, quando comparados aos cafés processados por via úmida (VILLELA, 2002).

Pelo processamento via úmida pode ser produzido três tipos de café: os cafés descascados (a mucilagem remanescente do descascamento mecânico não é removida), os despulpados (obtidos pela retirada da mucilagem remanescente por fermentação) e os desmucilados (a mucilagem é removida por processos mecânicos) (BORÉM, 2008; GONZALEZ-RIOS *et al.*, 2007).

A torração de grãos de café, em temperaturas elevadas e tempo controlado, proporciona várias mudanças na composição química e conseqüentemente nas

características sensoriais e atividades biológicas do café (DAGLIA et al., 2000; SACCHETTI et al., 2009).

Dentre os prováveis benefícios associados ao consumo da bebida de café destacam-se: ação antidepressiva, redução na absorção de colesterol e glicose, redução no desenvolvimento da doença de Parkinson e atividade antioxidante (DÓREA, 2005; KOZUMA et al., 2005).

Além do consumo do café torrado como bebida, os grãos de café verde podem ser utilizados como extrato seco adicionado a sucos e outras bebidas; extrato aquoso consumido diretamente como bebida, pós e cápsulas e extratos adicionados a produtos dermocosméticos (OCHIAI et al., 2004; WATANABLE et al., 2006).

O aumento de consumo de extratos de grãos de café verde está associado principalmente à atividade inibitória do acúmulo de gordura e de peso corporal e prevenção de diabetes *mellitus* tipo 2 (CHU, 2001; ONAKPOYA; TERRY; ERNST, 2011; SHIMODA; SEKI; AITANI, 2006; WATANABE et al., 2006)

No mercado de produtos cosméticos, observa-se um crescimento da utilização de matérias-primas de origem vegetal. Esse fato pode ser explicado por diversos motivos, entre os quais está a preferência dos consumidores por produtos naturais. O óleo de café verde vem recebendo destaque por atuar como emoliente e hidratante e bloqueador de raios ultravioletas nocivos à pele (TSUKUI; OIGMAN; REZENDE, 2014).

Os extratos de café verde, obtidos por solventes polares, podem ser empregados na indústria cosmética. A incorporação de extrato hidroetanólico de café em formulações fotoprotetoras foi capaz de aumentar a capacidade fotoprotetora, sem ocasionar irritação da pele (ODA 2014; RODRIGUES et al., 2015).

Grãos de café verde são, com base na matéria seca, constituídos principalmente por carboidratos, sendo a maior parte insolúvel, lipídios, proteínas, ácidos clorogênicos, minerais, cafeína, trigonelina e aminoácidos livres. As substâncias presentes nos grãos de café crus são determinantes para a qualidade do café, uma vez que são precursores de substâncias formadas durante a torração, que são responsáveis pelo sabor e aroma da bebida (MOREIRA et al., 2012; MUSSATTO et al., 2011).

Os carboidratos estão presentes no grão na forma de polissacarídeos e como açúcares de baixo peso molecular, que incluem tri, di e monossacarídeos redutores

e não redutores (HALAL, 2008). O café apresenta diversos minerais, como potássio, magnésio, cálcio, sódio, ferro, manganês, rubídio, zinco, cobre, estanho, cromo, vanádio, bário, níquel, cobalto, chumbo, molibdênio, titânio e cádmio (HALAL, 2008).

## 2.2 SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

As substâncias fenólicas são originadas do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Além disso, são formadas em condições de estresse como infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outras (NACZK e SHAHIDI, 2004).

São caracterizadas pela presença de um anel aromático com, no mínimo, uma hidroxila ligada (SOTO-VACA et al., 2012). Essas substâncias são classificadas de acordo com o número de unidade fenólicas em fenóis simples, polifenóis, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzoico, do ácido cinâmico e cumarinas), flavonoides, taninos (hidrolisáveis e condensados), estilbenos, chalconas, lignanas e ligninas (Tabela 1) (STALIKAS, 2007; TSAO, 2010).



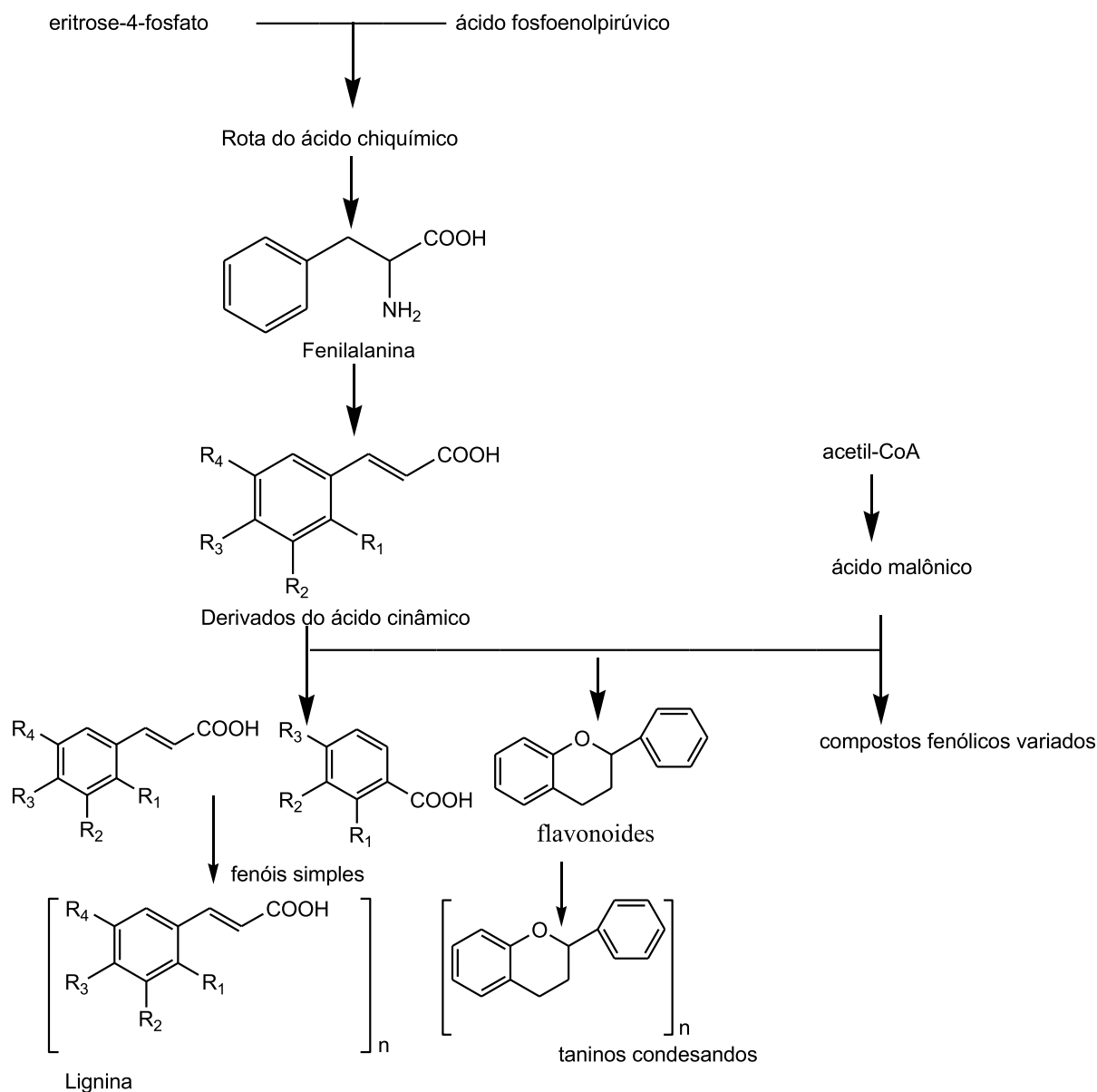
Tabela 1- Classificação das substâncias fenólicas

<b>Estrutura básica</b>	<b>Classes de substâncias fenólicas</b>
<b>C6</b>	Fenóis simples, benzoquinonas
<b>C6-C1</b>	Ácidos benzoicos
<b>C6-C2</b>	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
<b>C6-C3</b>	Fenilpropanoides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas e isocumarinas
<b>C6-C4</b>	Naftoquinonas
<b>C6-C1-C6</b>	Xantonas, benzofenonas
<b>C6-C2-C6</b>	Estilbenos, antraquinonas
<b>C6-C3-C6</b>	Flavonoides, isoflavonoides e chalconas
<b>(C6--C6)2</b>	Lignanias
<b>(C6-C3-C6)2</b>	Diflavonoides
<b>(C6-)n</b>	Melaninas vegetais
<b>(C6-C3)n</b>	Ligninas
<b>(C6-C1)n</b>	Taninos hidrolisáveis
<b>(C6-C3-C6)n</b>	Taninos condensados

Fonte: SIMÕES et al. (2004)

A via do ácido chiquímico dá origem aos principais fenólicos, outros de menos importância para planta são originados da via do AcetilCoA, porém os flavonoides e taninos são biossintetizados pela via mista acetato-chiquimato (Figura 2) (TREUTTER, 2001).

Figura 2 - Esquema de produção das substâncias fenólicas: Rota do ácido chiquímico e do AcetilCoA



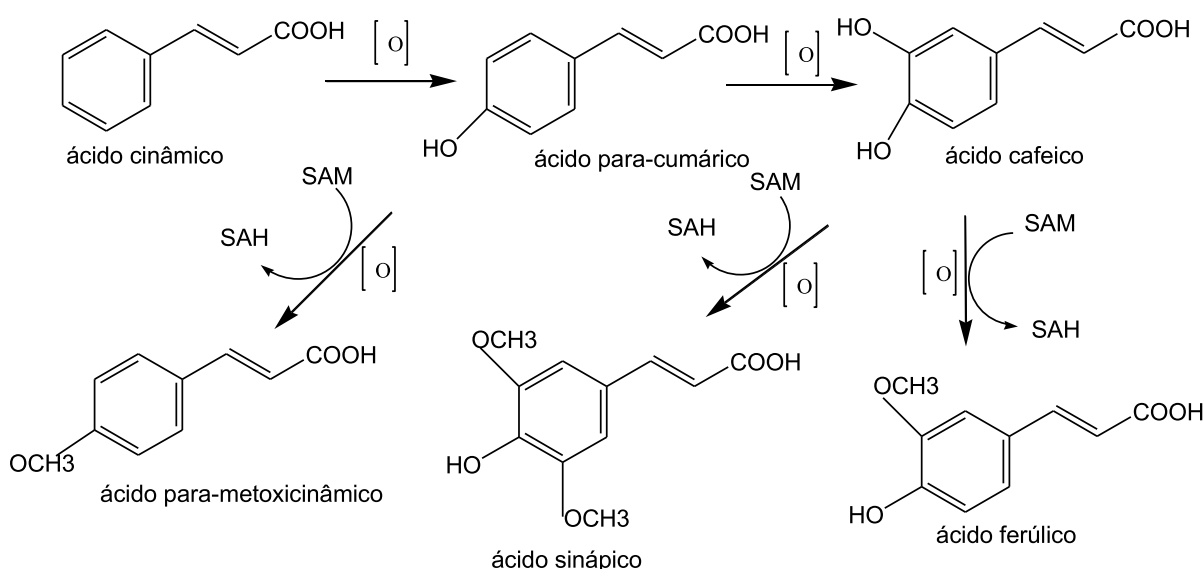
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.  
Programa utilizado ChemDraw Pro 8

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em ácidos benzoicos, ácidos cinâmicos e as cumarinas. O ácido cinâmico e seus derivados, o ácido para-hidroxicinâmico (para-cumárico), ácido 3,4-diidroxicinâmico (ácido cafeico), ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico (ácido ferúlico), ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinâmico (ácido sinápico) e ácido para-metoxicinâmico são importantes como constituintes naturais e

como prováveis progenitores para formação de outras substâncias contendo esqueleto do tipo C6-C3 (JASINSKI, 2010; SOARES, 2002).

A maior parte dos derivados do ácido cinâmico são formados a partir de processos oxidativos e/ou metilações (sendo estes derivados formados pela ação do cofator enzimático s-adenosil metionina - SAM) sobre o ácido cinâmico (Figura 3) (JASINSKI, 2010).

Figura 3 - Proposta biossintética para derivados do ácido cinâmico



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.  
Programa utilizado ChemDraw Pro 8

Pressupõe-se que a reação de esterificação pela qual o resíduo cinamoil é ligado ao grupo hidroxila do ácido quínico envolve o éster do ácido cinâmico com a coenzima A. Assim, esse éster representa o início para muitos tipos de metabólitos do ácido cinâmico: formação de éster, oxidação, redução de aldeídos e extensão de cadeia pela reação com unidades de malonil-CoA (JASINSKI, 2010).

O grupo de substâncias derivadas do ácido cinâmicos apresenta ampla distribuição nas plantas na forma de ésteres, amidas e glicosídeos. Os ácidos clorogênicos (CGA) são formados a partir da esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos trans-cinâmicos: o ácido cafeico (3,4-di-hidroxicinâmico), o ferúlico (3-metoxi, 4-hidróxi), sinápico (3,5-dimetóxi, 4-hidróxi) ou o p-cumárico (4-hidróxi). Podem ser classificados de acordo com o tipo, número e posição dos resíduos acila: mono ésteres (ácidos cafeiolquínicos - ACQ; cumaroilquínicos- pACQ

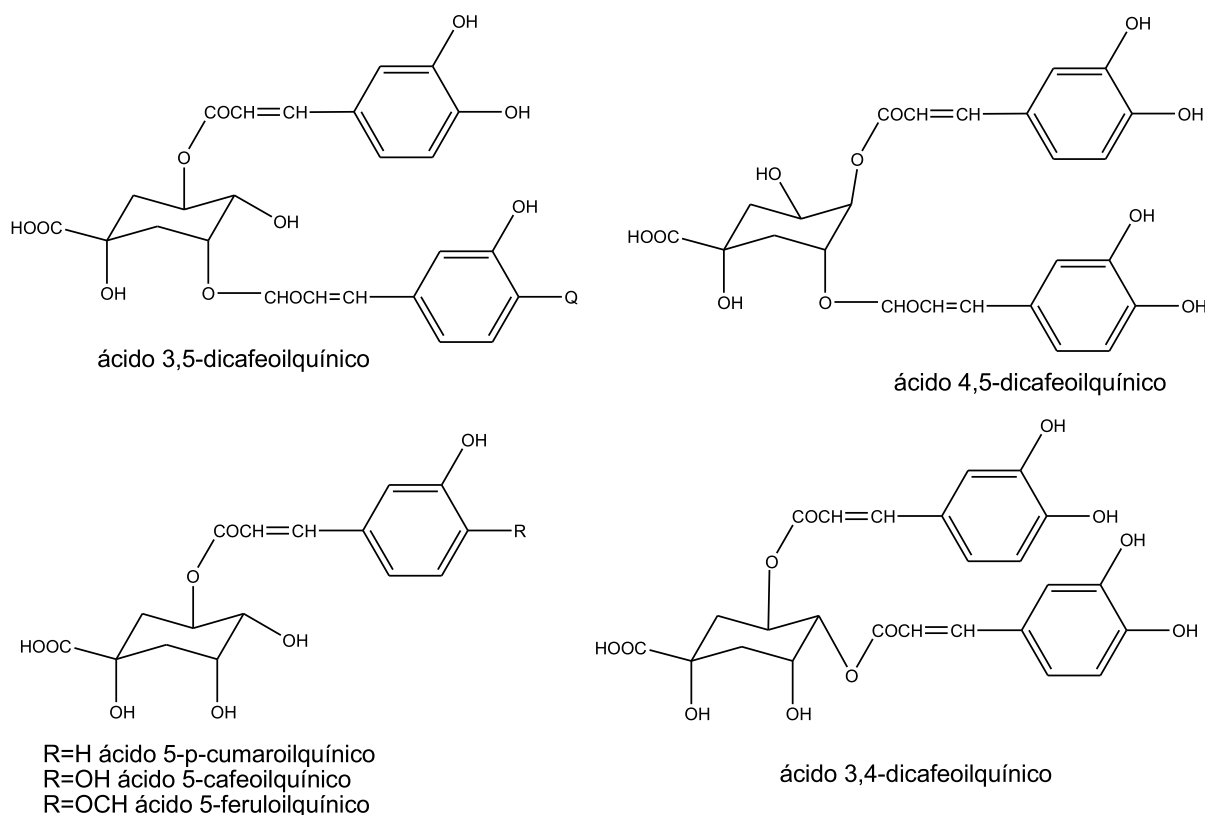
e feruloilquínicos - AFQ); di (diACQ), tri (triACQ) e tetra ésteres (tetraACQ) e ainda ésteres mistos dos ácidos cafeico e ferúlico (ácidos cafeiol-feruloilquínicos). Os mais comuns e conhecidos são os mono ésteres do ácido cafeoilquínico, principalmente o ácido 5-O-cafeoilquínico (5-ACQ) (CLIFFORD, 1999).

Dentre os ácidos clorogênicos presentes no café, o componente majoritário é o ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ). O principal efeito fisiológico do 5-ACQ é a sua ação antioxidante, também atribuída ao seu produto de hidrólise, o ácido cafeico.

O ácido cafeico (3,4 ácido dihidroxicinâmico) é uma substância fenólica encontrada em plantas. Estudos prévios sobre sua atividade biológica, indicam que possui atividade antioxidante, antiviral, antitumoral e anti-inflamatória CHAO; HSU; YIN, 2009; GÜLÇIN, 2006; IKEDA et al., 2011; MORI; IWAHASHI, 2009; RAJENDRA-PRASAD et al., 2011)

Além do 5-ACQ, estão presentes no café o ácido 3-O-cafeoilquínico, ácido 4-cafeoilquínico, ácido 3-feruloilquínico, ácido 5-feruloilquínico, dentre outros. As esterificações nas posições 3, 4, e 5, geram vários isômeros (Figura 4) (ABRAHÃO, 2007; ESQUIVEL e JIMÉNEZ, 2012; LIMA et al., 2010).

Figura 4 – Estrutura química de alguns ácidos clorogênicos presentes no café



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.  
Programa ChemDraw Pro 8

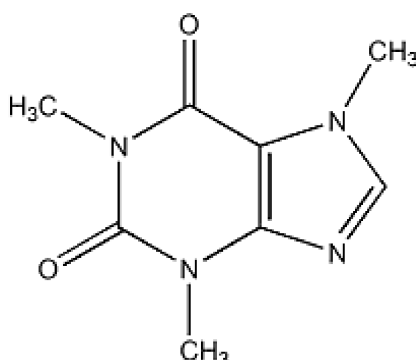
A atividade antioxidante dos ácidos clorogênicos está relacionada à sua estrutura química, permitindo que atuem no início e na propagação do processo oxidativo, quelando metais ou sequestrando radicais livres. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos é determinada, geralmente, pelo número de hidroxilas presentes na molécula, embora outras características contribuam para essa atividade. A dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico participa da atividade do radical por ressonância e deslocamento do elétron desemparelhado (SOARES, 2002; SOUSA et al., 2007).

As substâncias fenólicas presentes nos grãos de café apresentam diversos efeitos farmacológicos como antimicrobiano, anti-inflamatório, prevenção da degeneração da retina e atividade antioxidante (ALMEIDA et al., 2006; CHANG et al., 2010; LIMA et al., 2010; JANG et al., 2014).

### 2.3 CAFEÍNA

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é o principal pseudoalcaloide encontrado nos grãos de café, sendo encontrada na polpa, no citoplasma do grão e ligada à parede celular (Figura 5). A cafeína está fortemente relacionada à qualidade do café torrado, contribuindo com sabor amargo. Além disso, atua antagonizando os efeitos da adenosina, um neurotransmissor que causa o sono, sendo provavelmente a principal razão para a popularidade do café. Outros benefícios da cafeína incluem a atividade antioxidante, melhora do humor, melhor desempenho no exercício físico e redução dos sintomas associados à doença de Parkinson (HECKMAN; WEIL; DE MEJIA, 2010; MAZZAFERA e SILVAROLLA, 2010 NOGUEIRA; TÁCITO; GUIMARÃES, 2003).

Figura 5 – Estrutura química da molécula de cafeína



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.  
Programa ChemDraw Pro 8

A cafeína possui grande importância comercial devido à sua utilização em bebidas populares como o café e chá. Além de ser empregada em diversas bebidas e em diferentes medicamentos na indústria farmacêutica (GOKULAKRISHNAN; CHANDRARAJ; GUMMADI, 2005).

A presença de cafeína na planta apresenta a vantagem de inibir o crescimento de outras plantas, atua na defesa contra predadores e inibe o crescimento microbiano (BRASS, 2009; FUJII; ONO; HIROOKA, 2002).

O custo da cafeína obtida pela extração é maior, quando comparado à síntese química. No entanto, os resíduos químicos presentes na cafeína pela síntese dificultam o seu emprego em diversos setores industriais. O alto custo de produção

da cafeína natural estimula as pesquisas que visam o desenvolvimento de processos para a sua obtenção com menor custo (WANG et al.; 2005).

Os métodos biotecnológicos empregando microrganismos tornaram-se soluções práticas e econômicas para muitos processos nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Muitos produtos com atividade farmacêutica, incluindo antibióticos, antitumorais e anti-inflamatórios, podem ser produzidos por meio da biotransformação microbiana. No entanto, poucos trabalhos foram publicados para a produção de cafeína (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; BOAVENTURA; LOPES; TAKAHASHI, 2004; CUNHA et al., 2009; MOREIRA et al., 2008; WANG et al.; 2005; WANG et al.; 2008)

Os métodos tradicionais para o aumento de produção de cafeína são as alterações nas condições de cultivo da planta ou o desenvolvimento de novas espécies que possuam maiores teores dessa substância. No entanto, esses métodos promovem um aumento limitado de cafeína tornando necessário o desenvolvimento de novas estratégias para aumentar o seu conteúdo em produtos naturais (WANG et al., 2005).

Por outro lado, a descafeinização torna-se necessária, como por exemplo para reduzir o conteúdo de cafeína em produtos alimentícios; tratamento de efluentes contendo cafeína, que são tóxicos para o meio ambiente e descafeinização de resíduos para que possam ser utilizados em outras aplicações (BUERGE et al., 2003; MAZZAFERA, 2002; WHITE; RASMUSSEN, 1998)

Alguns microrganismos podem degradar a cafeína enquanto outros toleram altas concentrações, essa variabilidade deve-se a diferenças nos mecanismos enzimáticos ou nos sistemas de regulação. Além da degradação microbiana, a cafeína pode ser degradada pela ação direta de enzimas (GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ; ROUSSOS; AUGUR, 2013)

A degradação da cafeína e outras metilxantinas por meio da utilização de enzimas ou microrganismos tem despertado o interesse científico uma vez que este processo apresenta vantagens quando comparados aos métodos convencionais. Os resultados obtidos são mais específicos, econômicos e com sustentabilidade ambiental (GOKULAKRISHNAN et al., 2005).

Os métodos convencionais, como a extração com solvente ou fluido supercrítico, ou envolve solvente tóxicos ou são de alto custo. Como esses métodos não são específicos para a cafeína, ao serem utilizados podem remover outras

substâncias como aquelas responsáveis pelo aroma, comprometendo a qualidade do produto (GUMMADI; DASH; DEVARAI, 2009).

A cafeína inibe a lipoperoxidação induzida por radicais hidroxilas (OH.) e peróxidos (ROO.), convertendo em um potente antioxidante com capacidade similar à glutathiona e superior ao ácido ascórbico (CLIFFORD e RAMIREZ-MARTINEZ, 1991). Em um estudo realizado por Noschang et al. (2009), foi observado um aumento na atividade da superóxido dismutase e da catalase no córtex cerebral de ratos tratados com cafeína.

## 2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação de radicais livres no organismo. Essas moléculas têm um elétron isolado livre para se ligar a qualquer outro elétron, e por isso são extremamente reativas e podem ser produzidas por fontes endógenas ou exógenas (VANCINI et al., 2002).

Os processos biológicos, como redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons atuam como fonte endógena de radicais livres. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

Nos processos biológicos há formação de uma variedade de radicais livres, que podem ser classificados em cinco grupos: espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN), espécies reativas de enxofre (ERS), espécies reativas de carbono (ERC) e os complexos de metais de transição, sendo as EROs mais abundantes no organismo (Tabela 2) (SOARES, 2002).



Tabela 2- Classificação dos radicais livres

<b>Espécies reativas</b>	<b>Radicais livres</b>
<b>(ERO)</b>	Íon superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), Hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ), Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), Alcoxila ( $RO^{\cdot}$ ), Peroxila ( $ROO^{\cdot}$ ), Peridroxila ( $HOO^{\cdot}$ ), Oxigênio singlete ( $^1O_2$ )
<b>(ERN)</b>	Fenildiazina ( $C_6H_5N^{\cdot}$ ), Óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ )
<b>(ERS)</b>	Tiol ( $RS^{\cdot}$ )
<b>(ERC)</b>	Triclorometil ( $CCl_3^{\cdot}$ )
<b>Complexos de metais de transição</b>	$Fe^{+3}/Fe^{+2}$ , $Cu^{+2}/Cu^{+}$

Fonte: Adaptado de Soares, 2002.

Esses radicais, em baixas concentrações, podem atuar de maneira benéfica em defesa contra agentes infecciosos, formação de ATP por meio de ADP na mitocôndria, regulação do crescimento celular e produção de oxigenases (lipoxigenase e cicloxigenase) para formação de prostaglandinas e leucotrienos (DEVASAGAYAM et al., 2004).

O estresse oxidativo ocorre quando o equilíbrio redox, ou seja, o balanço entre espécies químicas “pró-oxidantes” e “antioxidantes” é alterado. O estresse oxidativo, pode ocasionar uma série de danos, dentre os quais pode-se destacar a oxidação dos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, processo denominado de peroxidação lipídica. Esse processo, afeta a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade (BARREIROS; DAVID, 2006; SOARES, 2002).

Além disso, os produtos da oxidação dos lipídios da membrana podem acarretar alterações em certas funções celulares. Os radicais livres podem provocar modificações nas proteínas celulares, resultando na fragmentação das mesmas, podendo haver ativação ou inativação de certas enzimas, isso devido à reação dos radicais livres com aminoácidos constituintes da cadeia polipeptídica. A reação de radicais livres com ácidos nucleicos, gera mudanças em moléculas de DNA e conseqüentemente alterações cromossômicas (DRÖGE, 2002; SOSA et al., 2012).

Há também, além destes efeitos indiretos, ação tóxica resultante de altas concentrações de íon superóxido e peróxido de hidrogênio na célula. Danos que

culminam em várias patologias, tais como doenças neurodegenerativas, inflamatórias, cardiovasculares, alergias, disfunções imunológicas, hemorragias, catarata, envelhecimento acelerado e câncer (VALKO et al., 2007).

Os antioxidantes, sintéticos ou naturais, podem prevenir ou retardar as reações de oxidação no organismo ou em produtos susceptíveis à essa deterioração (HUANG e PRIOR, 2005).

Os antioxidantes atuam contra o estresse oxidativo por meio da prevenção da formação de radicais livres, da capacidade de complexar com metais, do sinergismo com outros agentes antioxidantes, da inibição de enzimas pró-oxidantes e no reparo dos danos causados (LI; GIBSON, 2012; LÓPEZ-ALARCÓN e DENICOLA, 2013).

Diversos estudos já demonstraram os efeitos protetores dos componentes fenólicos do café contra o estresse oxidativo (CHU et al., 2009; NATELLA et al., 2002; ZHAO et al., 2008). Esses fenólicos foram capazes de captar radicais alcoxila ( $RO\bullet$ ), alquilperoxila ( $ROO\bullet$ ), superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxila ( $HO\bullet$ ), óxido nítrico ( $NO\bullet$ ), além do oxidante peroxinitrito ( $ONOO^-/ONOOH$ ) (WANG; HO, 2009).

## 2.5 BIOTRANSFORMAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

Sistemas biológicos podem ser empregados para produzir alterações na estrutura químicas de compostos. Esse processo, denominado biotransformação, tem sido progressivamente utilizado como um meio de obtenção de substâncias terapêuticas. Dentre as reações realizadas são incluídas as de oxirredução, hidroxilação, hidrogenação, hidrólise, metilações, isomerização, glicosilações e esterificações de vários substratos exógenos (BANERJEE; SINGH; RAHMAN, 2012; LIU; YU, 2010).

Por meio do emprego de processos de biotransformação, é possível reavaliar os produtos naturais já estudados, não somente para fins de modificações das moléculas, mas também para melhorar a eficiência das mesmas que possuem aplicabilidade mais ampla na criação de análogos (BANERJEE; SINGH e RAHMAN, 2012).

Substâncias bioativas, oriundas de produtos naturais, muitas vezes estão ligadas quimicamente a moléculas de açúcares ou a outros conjugados. Esses

conjugados podem influenciar na atividade biológica da substância alterando a biodisponibilidade e a ligação ao receptor (FANet al., 2013).

Sistemas isolados de enzimas ou microrganismos podem ser empregados nos processos de biotransformação. Os isolados de enzimas estão comercialmente disponíveis ou podem ser obtidos a partir dos microrganismos produtores (HANSON, 1995).

A biotransformação possui vantagens sobre a síntese orgânica, como por exemplo alta estereosseletividade, a redução de reações colaterais, condições operacionais brandas, facilidade no processo e na separação dos produtos, redução de custos e biosustentabilidade (LIU; YU, 2010).

A biotransformação usando microrganismos é realizada por meio de processos fermentativos. Os microrganismos usados na fermentação devem ser reconhecidos como seguros, conceituados como GRAS (*Generally Regarded as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (CONESA et al., 2001)

A fermentação submersa tem como característica principal a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis, possui relativa facilidade de cultivo em grande escala, pois apresenta homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros do processo, principalmente se monitorados por sensores adequados. Entretanto, a maior probabilidade de contaminação, pela maior quantidade de água, é um inconveniente desse processo (COUTO; SANROMÁN, 2006).

A fermentação em estado sólido (FES) utiliza substratos úmidos o suficiente para propiciar o crescimento e o metabolismo do microrganismo (SINGHANIA et al., 2009). Esse sistema possui algumas vantagens, tais como: maior concentração do produto, menor volume de águas residuais e menor atividade de água para possíveis microrganismos contaminantes. Entretanto, esse sistema possui como desvantagem a dificuldade de ampliação do processo, em grande parte devido à transferência de calor e dificuldade de homogeneidade de cultura (MARTINS et al., 2011; SINGHANIA et al., 2009).

A seleção do microrganismo, a escolha do substrato, a otimização dos parâmetros que afetam o crescimento microbiano e a produção, o isolamento e a purificação do produto são etapas dos processos fermentativos que devem ser otimizadas (PANDEY, 2003). Dentre os fatores que afetam o crescimento microbiano e a fermentação, destacam-se: temperatura, pH e pressão osmótica, fontes de

carbono e nitrogênio, enxofre, fósforo, oxigênio e fatores orgânicos de crescimento (COUTO; SANROMÁN, 2006).

Na fermentação sólida, outros fatores importantes para o crescimento microbiano e atividade no substrato, particularmente a granulometria e níveis de umidade/atividade de água, são pontos críticos. Geralmente pequenas partículas de substrato fornecem uma grande superfície de contato com o microrganismo. Contrariamente, grandes partículas fornecem maior aeração, mas limitam a superfície de contato para uso microbiano. O tamanho da partícula deve ser selecionado de acordo com cada processo. (PANDEY et al., 1999).

A umidade do meio de fermentação é um fator determinante no sucesso da fermentação sólida. Níveis baixos de umidade do meio diminuem a solubilidade do substrato sólido, porém níveis elevados de umidade causam diminuição da porosidade e dificultam a transferência de oxigênio. (MAHADIK et al., 2002).

Fungos filamentosos e leveduras constituem os microrganismos adequados para FES, uma vez que podem crescer em condições de pouca atividade de água (SINGHANIA et al., 2009). Outra característica que torna os fungos filamentosos ideais para a FES é o fato de serem tolerantes às pressões osmóticas elevadas (KRISHNA, 2005).

Os fungos filamentosos, além de apresentarem-se promissores no melhoramento de substâncias de fontes vegetais, são importantes produtores de enzimas termoestáveis de alto valor científico e comercial (MARTINS et al., 2002).

## 2.6 FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos são um grupo eucarioto morfológicamente complexo e distribuído no planeta, na natureza possuem um papel importante como decompositores biológicos. Dentre os fungos, os Ascomicetos e Basidiomicetos saprófitos são os mais eficientes na decomposição da biomassa lignocelulósica e conseguem se adaptar a diferentes fontes de carbono e nitrogênio (BOUW; WATTENBERG, 2008)

O filo Ascomicota se diferencia dos outros por sua reprodução, onde há produção de esporos em ascas (esporângios). A maior parte dos Ascomicetos são filamentosos, ou seja, exibem formas estruturais distintas durante seu ciclo de vida. A estrutura vegetativa básica é a hifa, um filamento tubular originado da germinação do esporo reprodutivo. Quando o micélio se encontra em culturas líquidas, ele

apresenta diferentes formas, entre filamentos de micélios dispersos a massas de micelas densas (VIEIRA, 2014).

Os *Aspergillus* spp. são anamórficos e pertencem ao reino Fungi, filo Ascomycota, ordem dos Eurotiales, família Trichocomaceae e gênero *Aspergillus*. As espécies mais conhecidas são a *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*. Estes podem ser patogênicos ao ser humano como por exemplo o *A. flavus*, que pode produzir aflatoxinas. Os fungos filamentosos que possuem o status de GRAS são amplamente usados para a produção de bioprodutos como exemplo o *A. nidulans*, *A. oryzae* e o *A. niger* (GALAGAN et al., 2005; SOARES et al., 2010).

O *Aspergillus awamori* tem como sinônimos *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Aspergillus longobasidia*, *Aspergillus pseudocitricus*, *Aspergillus miyakoensis*. Suas colônias são pretas com as bordas brancas. (MYCOBANK; CANADA, 2014).

As espécies de *Aspergillus* possuem grande aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica. O *Aspergillus awamori* destaca-se como um ótimo produtor de várias enzimas hidrolíticas, como xilanases e celulases. É considerado um excelente produtor de exo e endoglicosidases. Essas enzimas são utilizadas na clarificação de sucos de fruta e bebidas alcoólicas, produção de xarope de glicose e maltose, dentre outros produtos (SIVARAMAKRISHNAN et al., 2007; ZÚÑIGA et al., 2011; (LE MOS; PEREIRA, 2013).

### 3 OBJETIVOS

#### OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de biotransformação de grãos de café verde (*Coffea arabica* L.), empregando o fungo filamentoso *Aspergillus awamori*, visando a melhoria de atividades biológicas.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência do tempo de fermentação no processo de biotransformação dos grãos de café verde;
- Determinar o teor de fenólicos nos extratos de café verde obtidos por biotransformação;
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos de café verde biotransformado por meio dos métodos DPPH• e do poder redutor do ferro;
- Avaliar a influência da biotransformação nos teores de ácido cafeoilquínico (5-ACQ), ácido cafeico e cafeína, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS DE CAFÉ VERDE

Foram utilizados grãos de café verde beneficiados (*Coffea arabica* L.), adquiridos da Cooperativa dos Cafeicultores das Matas de Minas, Viçosa, Minas Gerais. Os grãos de café verde foram moídos em moinho de facas micro (MSSL-030) e tamisados (granulação de 840  $\mu\text{m}$  /malha nº 20). As amostras foram armazenadas sob refrigeração (2-8 °C) até o período de realização do processo fermentativo.

### 4.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Foi utilizado o fungo filamentosso *Aspergillus awamori* CCDCA 1041, isolado do café, pertencente à Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O fungo foi reativado em tubos contendo o meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) a 22 °C  $\pm$  2. O meio foi esterilizado em autoclave 121°C por 15 minutos. Os repiques foram realizados a cada 15 dias.

### 4.3 PREPARO DO INÓCULO FÚNGICO

Os esporos de *Aspergillus awamori* CCDCA 1041, após crescimento de 7 dias, foram transferidos para um tubo contendo solução salina. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer e a suspensão foi diluída para obtenção de  $10^7$  esporos/mL.

### 4.4 BIOTRANSFORMAÇÃO DO CAFÉ VERDE

Alíquotas de 10 g do café verde moído foram transferidas para *erlenmeyers* de 250 mL, a seguir adicionou-se 10 mL de água deionizada. Posteriormente, foi realizada a esterilização por calor úmido a 121 °C por 15 minutos. Após esterilização

e resfriamento, foram inoculados 1 mL da suspensão de esporos ( $1 \times 10^7$  esporos/mL) de *Aspergillus awamori* CCDCA 1041. Na amostra controle não fermentada a adição de 1 mL da suspensão de esporos, foi substituída por 1 mL de solução salina. As amostras foram incubadas a 25 °C por 24, 48, 72 e 96 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.4.1 Extração dos metabólitos

Os extratos de grãos de café verde biotransformados e o controle foram extraídos empregando 70 mL de solução etanólica 80%, sob agitação em *shaker* (200 rpm por 2 horas a 25 °C). Os extratos foram filtrados utilizando papel de filtro, tipo millex 14  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.2 Determinação do teor de sólidos totais

Os teores de sólidos totais dos extratos hidroetanólicos biotransformados e controle (mg de sólidos totais/mL de etanol 80%) foram determinados em balança com sistema de aquecimento por infravermelho, na qual a amostra foi submetidas à temperatura de 105 °C até peso constante.

### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS FENOLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS DE CAFÉ VERDE

Os teores de polifenóis totais nos extratos hidroetanólicos biotransformados pelo *Aspergillus awamori* CCDCA 1041 e no extrato não biotransformado foram determinados segundo o método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*, utilizando ácido gálico como padrão (SINGLETON; ROSSI, 1965).

A partir de uma solução estoque de 1 mg/mL de ácido gálico em etanol, foram preparadas, em triplicata, cinco concentrações (1 a 5  $\mu\text{g/mL}$ ) para construção da curva de calibração. Em tubos de ensaio foram adicionados 5 mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* 10% e os tubos foram agitados e deixados em repouso durante 8 minutos. Foram colocados 4 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4 m/v. Após 2 h de reação em temperatura ambiente, as absorvâncias das soluções de ácido gálico foram medidas



por meio de espectrofotômetro em 760 nm. Os brancos foram preparados da mesma forma substituindo ácido gálico por 1 mL de água destilada. Para zerar a leitura no espectrofotômetro foi utilizado etanol.

Foram preparadas soluções dos extratos de café verde na concentração de 200 µg/ mL. Os padrões de 5-ACQ, ácido cafeico, cafeína, quercetina e rutina foram preparados em concentrações de 30 µg/mL. Alíquota de 1 mL das soluções foram transferidas para tubos de ensaio, onde foram acrescentados 5mL do reativo de *Folin-Ciocalteu* 10%. Após 8 minutos, adicionou-se 4 mL de solução de carbonato de sódio a 4% m/v. Os resultados das amostras foram expressos como gramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 gramas de café (g de EAG / 100 g de café). O ensaio foi realizado em triplicata.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE CAFÉ VERDE

##### 4.6.1 Método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

Para avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH•, os diferentes extratos obtidos foram diluídos em álcool etílico nas concentrações de 15, 30, 60, 90 e 120 µL/mL. Os padrões de 5-ACQ, ácido cafeico, cafeína, quercetina e rutina foram preparados nas concentrações de 1, 3, 5, 6, 12, 15 e 17 µg/mL. Foram adicionados em tubos de ensaio 4 mL da amostra e 1 ml da solução de DPPH 0,5 mmol/L. Após 30 min de reação, a leitura foi realizada em espectrofotômetro em 517 nm. O branco das amostras constituiu-se de 4 mL de suas respectivas soluções e 1,0 mL de etanol, sendo realizado para cada umas das concentrações utilizadas. O controle negativo foi constituído por 4 mL de etanol e 1,0 mL de solução de DPPH, para o branco do controle negativo foi usado somente etanol. O ensaio foi realizado em triplicata.

A partir das leituras obtidas no espectrofotômetro, determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante (%AA) que corresponde à quantidade de DPPH reduzida pelas amostras, utilizando a seguinte fórmula:

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

Após o cálculo das porcentagens da atividade antioxidante das amostras, os valores obtidos foram usados para a montagem curvas de concentrações versus absorbâncias. A concentração efetiva para inibir 50% do DPPH ( $CE_{50}$ ) foi calculada por meio do gráfico de porcentagem de redução do radical DPPH• versus concentração do extrato no meio reacional. Por meio da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foram obtidas as equações da reta para determinar o  $CE_{50}$ .

#### 4.6.2 Método do poder de redutor do ferro

Foi realizada a atividade antioxidante pelo método do poder de redução do ferro (OYAIZU, 1986). Foram preparadas soluções estoque das amostras utilizando água como diluente. A partir das soluções estoque, foram feitas diluições para obtenção de concentrações de 5, 15, 30, 60, 100  $\mu\text{g/mL}$  para as amostras 1, 2, 3, 4, 5, 8, e 10  $\mu\text{g/mL}$  para os padrões. Em seguida, foram adicionados aos tubos, 3 mL de tampão fosfato de potássio (200 $\mu\text{M}$ , pH 6,6) e 3 mL de solução ferrocianeto de potássio a 1% (m/v). Os tubos foram incubados a 50°C por 20 minutos em banho-maria, posteriormente foi adicionado aos tubos 3 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% (m/v). Foram retirados 2,5 mL da solução adicionados de 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico a 0,1% (m/v). O branco das amostras foi composto por 1 mL de água e todos reagentes, exceto as soluções das amostras.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 700 nm, obtendo as curvas de concentrações versus absorbâncias. Por meio da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foram obtidas as equações da reta para determinar o cálculo da concentração de extrato de 0,5 de absorbância ( $EC_{50}$ ) das amostras.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÁCIDO CLOROGÊNICO, ÁCIDO CAFEICO E CAFEÍNA

Os reagentes utilizados foram metanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA), água deionizada ultrapurificada em sistema Milli-Q (Millipore®) e ácido fosfórico P.A. (marca Quimex e pureza de 85%). Todos os solventes foram filtrados em membrana

de 0,45  $\mu\text{m}$  com o auxílio de um sistema acoplado a bomba de vácuo e degaseificados durante 15 minutos em banho de ultrassom a 45 °C. Os padrões de ácido clorogênico (pureza  $\geq 95\%$ ), ácido cafeico (pureza  $\geq 98\%$ ), e cafeína (pureza  $\geq 99\%$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

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

Foi utilizado o HPLC modular (Waters®) composto por uma bomba binária (Waters® 1525), detector de foto diodo (Waters® 2998) e injetor automático (Waters® 2707). Os dados coletados das amostras e padrões foram tratados e analisados utilizando o *software* Empower®3. A cromatografia foi realizada em coluna de fase reversa de sílica C18 modelo Promosil (Agela Technologies®) de 150 mm x 4,6 mm com partículas de 5  $\mu\text{m}$ .

O eluente utilizado foi preparado utilizando água ultrapurificada acidificada com 0,1% de ácido fosfórico (Solvente A) e metanol (Solvente B). Primeiramente a coluna foi equilibrada por 20 minutos com a fase móvel, composta de 95% do solvente A e por 5% do solvente B. Após a injeção (50  $\mu\text{L}$ ) dos extratos e padrões, a eluição dos compostos ocorreu com um gradiente de concentração dos solventes de forma que a concentração do solvente B aumentou de 5% para 40% em 20 minutos e de 40% para 100% em 10 minutos, permanecendo em 100% por 10 minutos. O fluxo de eluição foi de 1 mL/minuto e a coluna foi mantida a 30 °C em forno de aquecimento.

Os padrões de ácido clorogênico, cafeína e os extratos foram diluídos em água/metanol (95:5 v/v) e o ácido cafeico foi diluído em 100% de metanol. Foram preparadas soluções dos padrões nas concentrações de 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  para construção da curva de calibração através do método do padrão externo, enquanto que as amostras foram analisadas em triplicatas na concentração de 2 mg/mL. Os padrões de ácido clorogênico, ácido cafeico e cafeína e os extratos foram analisados em 272 nanômetros.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa de estatística GraphPad Prism® (versão 6.0). Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão (DP), comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise

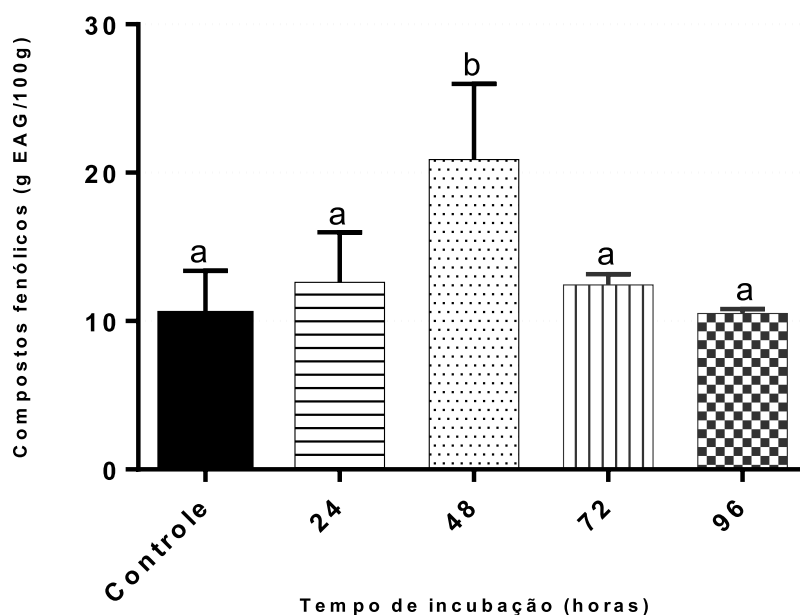
de variância ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas. Foram consideradas diferenças significativas os valores de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS DURANTE O PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE CAFÉ VERDE (*Coffea arabica* L.)

Os teores de substâncias fenólicas variaram durante o processo fermentativo (Figura 6) observou-se um aumento progressivo dos teores de fenólicos nos extratos de café verde biotransformados até o tempo de incubação de 48 horas, quando comparados à amostra controle (extrato de café verde não biotransformado). Após esse tempo de fermentação, observou-se um declínio nos teores de compostos fenólicos. Os teores de fenólicos totais foram calculados por meio da equação da reta obtida pela regressão linear ( $y=0,1145x-0,0075$ ) com coeficiente de correlação linear ( $r = 0,9963$ ).

Figura 6 – Teores de substâncias fenólicas durante o processo de biotransformação de café verde (*Coffea arabica* L.) por *Aspergillus awamori* CCDCA 1041



Controle (extrato de café verde não biotransformado). Os resultados representam a média ( $n=3$ )  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p<0,05$ )  
 Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O teor de substâncias fenólicas determinado no tempo de 48 horas ( $19,38 \pm 5,09$  g de EAG/100 g) foi 99,71% superior ao obtido no extrato de café verde não biotransformado ( $9,71 \pm 2,01$  g de EAG/100 g). Os valores de substâncias fenólicas

nos demais tempos avaliados (24, 72 e 96 horas) foram respectivamente  $(14,14 \pm 3,37; 12,34 \pm 0,71$  e  $10,62 \pm 0,29$  g de EAG/100 g).

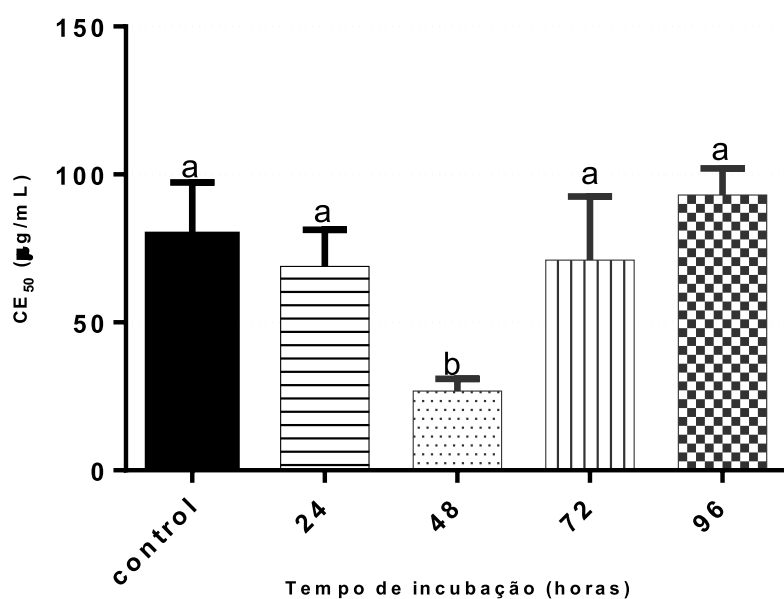
## 5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DURANTE O PROCESSO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE CAFÉ VERDE (*Coffea arabica* L.)

### 5.2.1 Método do sequestro do radical DPPH

Houve um decréscimo no valor determinado de  $CE_{50}$  até tempo de 48 horas de incubação, quando comparado à amostra controle (Figura 7). A atividade antioxidante no tempo de 48 horas ( $28,48 \pm 4,14$   $\mu\text{g/mL}$ ) foi de 193,85% superior à obtida no extrato de café verde controle ( $84,53 \pm 17,73$   $\mu\text{g/mL}$ ) pelo método DPPH. Os valores de  $CE_{50}$  dos tempos de 24, 72 e 96 horas foram respectivamente ( $64,48 \pm 12,43; 76,21 \pm 21,40$  e  $95,57 \pm 8,99$   $\mu\text{g/mL}$ ).

Figura 7 - Atividade antioxidante, pelo método DPPH, durante o processo de biotransformação de café verde (*Coffea arabica* L.) por *Aspergillus awamori* CCDCA

1041



Controle (extrato de café verde não biotransformado). Os resultados representam a média (n=3)  $\pm$  desvio padrão. Letras iguais não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Fonte: ELABORADO PELO PROPRIO AUTOR

Dentre os padrões avaliados, a quercetina apresentou maior atividade antioxidante ( $5,97 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$ ) seguida do ácido cafeico ( $6,31 \pm 0,38 \mu\text{g/mL}$ ), rutina ( $11,79 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$ ), sendo que o 5-ACQ apresentou menor atividade antioxidante ( $13,05 \pm 0,27 \mu\text{g/mL}$ ). A cafeína não apresentou atividade antioxidante pelo método DPPH.

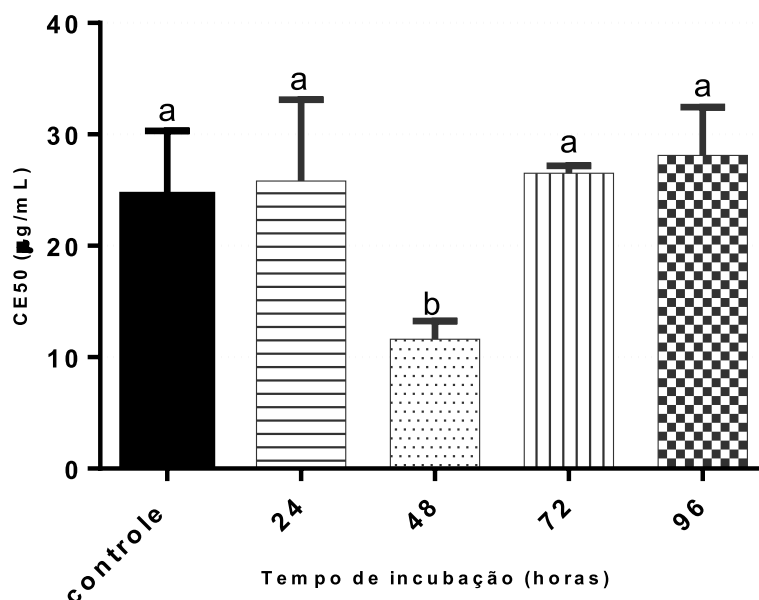
### 5.2.2 Atividade antioxidante pelo método do poder de redução do ferro

Os resultados foram expressos em valores de  $CE_{50}$ , concentração mínima necessária de extrato capaz de inibir em 50% a atividade oxidante dos radicais livres. Houve um aumento da atividade antioxidante no tempo de 48 horas, depois a mesma diminuiu. O  $CE_{50}$  no tempo de 48 horas ( $12,24 \pm 1,64 \mu\text{g/mL}$ ) foi de 111,27% menor do que o controle ( $26,35 \pm 5,75 \mu\text{g/mL}$ ). Os valores de  $CE_{50}$  dos tempos de 24,72 e 96 horas foram respectivamente ( $24,73 \pm 7,30$ ;  $26,89 \pm 0,67$  e  $28,22 \pm 4,33 \mu\text{g/mL}$ )

Dentre os padrões o ácido cafeico apresentou maior atividade com  $EC_{50}$  ( $2,54 \pm 0,42 \mu\text{g/mL}$ ) em seguida a quercetina ( $3,00 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$ ), posteriormente o 5-ACQ ( $4,16 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$ ) e com menor atividade a rutina ( $7,70 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$ ). A cafeína não apresentou atividade pelo método do poder de redução.

Figura 8 - Atividade antioxidante, pelo método do poder redutor, durante o processo de biotransformação de café verde (*Coffea arabica* L.) por *Aspergillus awamori*

CCDCA 1041



Os resultados representam a média (n=3) ± desvio padrão. Letras iguais, não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05)

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

### 5.3 QUANTIFICAÇÃO DE 5-ACQ, ÁCIDO CAFEICO E CAFEÍNA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Os teores de 5-ACQ, ácido cafeico e cafeína foram quantificados a partir de curvas de calibração construídas a partir da área dos picos obtidas e as concentrações das soluções padrões desses compostos que foram de 25, 50, 100, 150 e 200 µg/ mL (Tabela 3).

Tabela 3 - Equações das retas e os coeficientes de correlação linear.

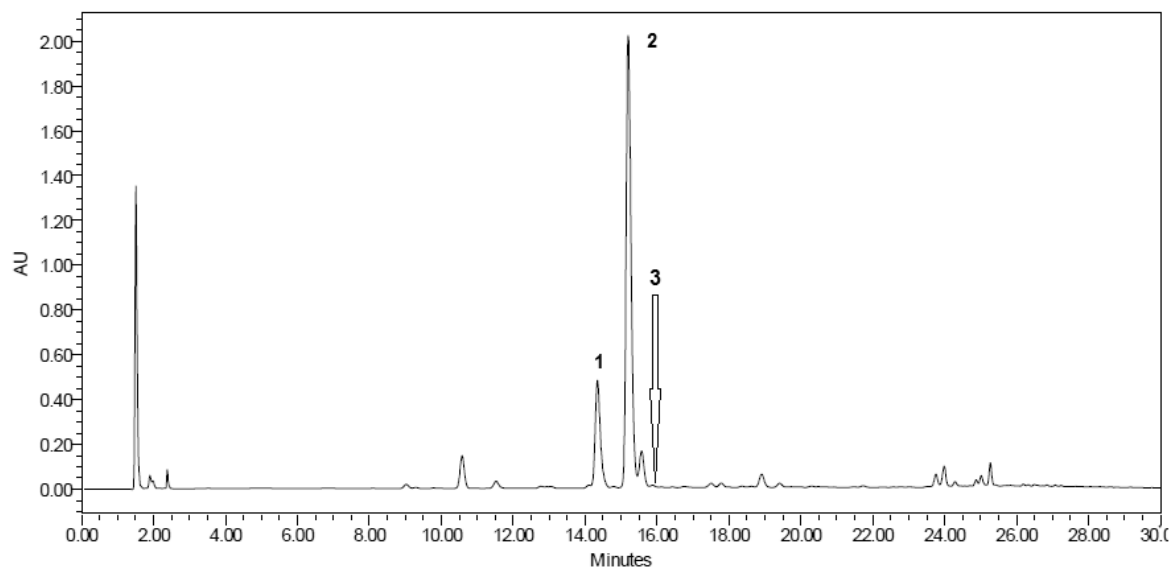
Padrões	Equações	R
5-ACQ	$y = 52.085,2972x + 107.836,1321$	0,9989
Ácido cafeico	$y = 91307x - 460881$	0,9963
Cafeína	$y = 120460x - 81113$	0,9987

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR



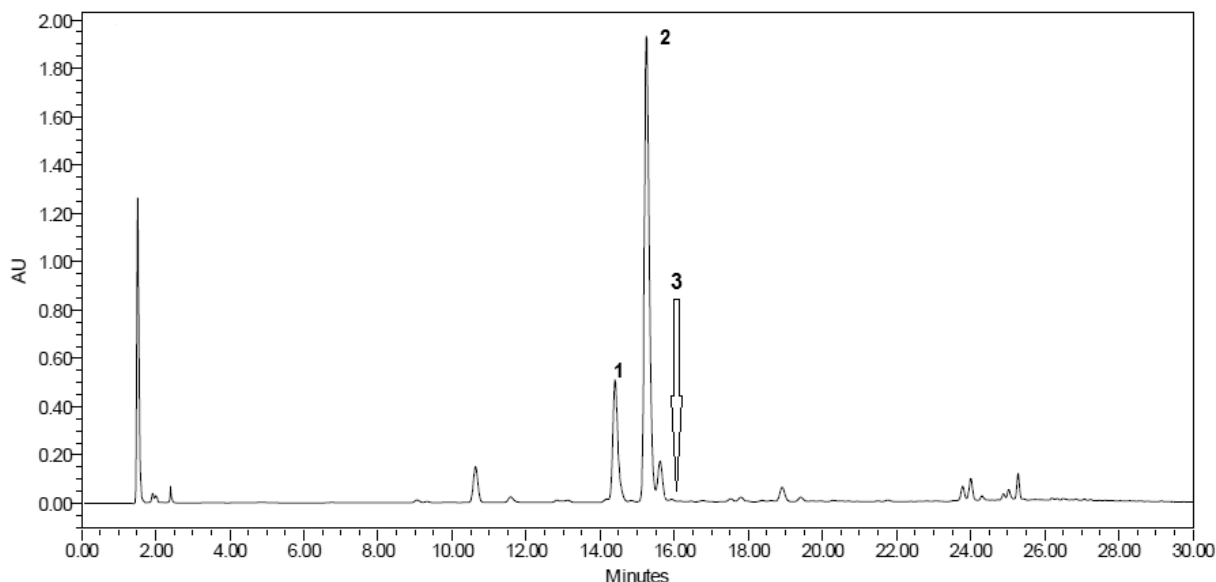
Os perfis cromatográficos dos extratos de café verde não biotransformado e biotransformado nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas encontram-se representados nas Figuras 9 a 13.

Figura 9 – Perfil cromatográfico do extrato de café verde não biotransformado



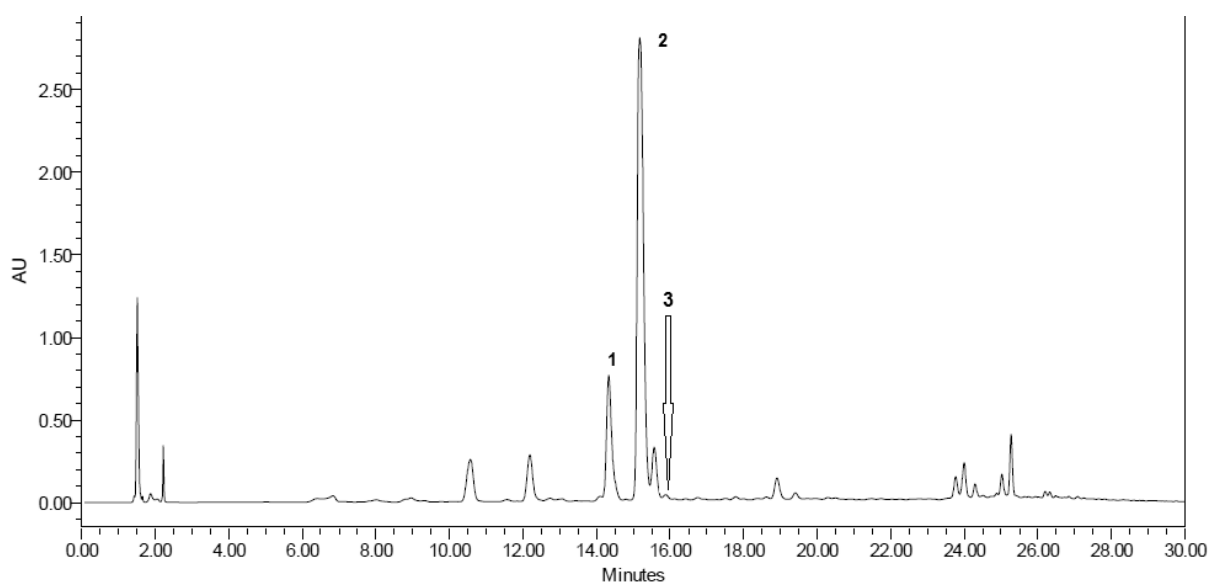
(1):5-ACQ; (2):cafeína; (3):ácido cafeico Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 10 – Perfil cromatográfico do extrato de café verde biotransformado (24 h)



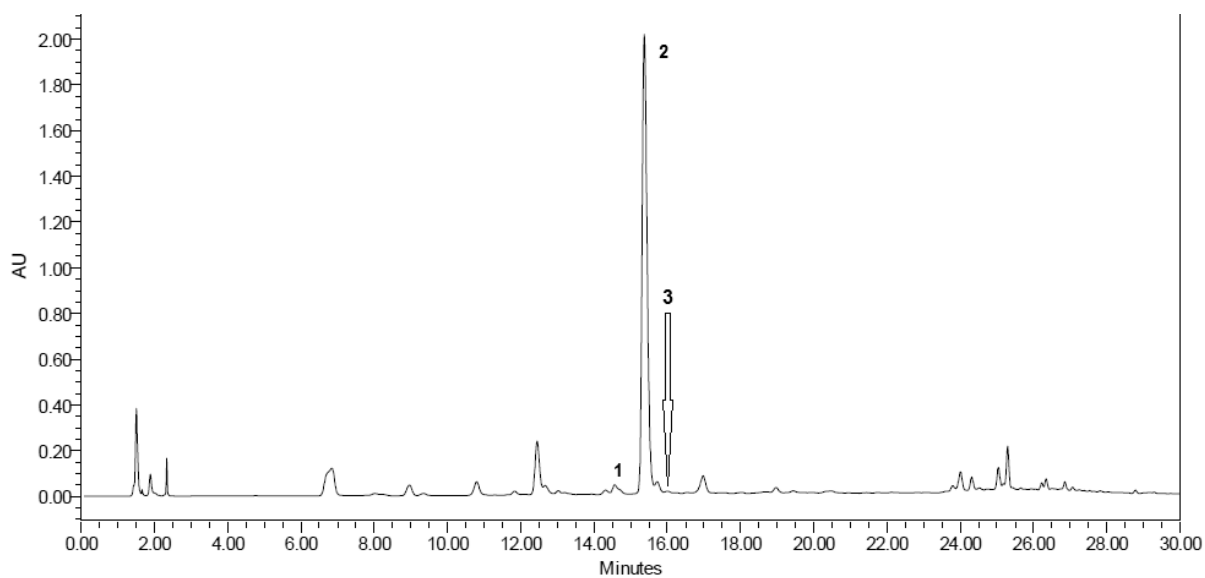
(1):5-ACQ; (2):cafeína; (3):ácido cafeico Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Figura 11 – Perfil cromatográfico do extrato de café verde biotransformado (48h)



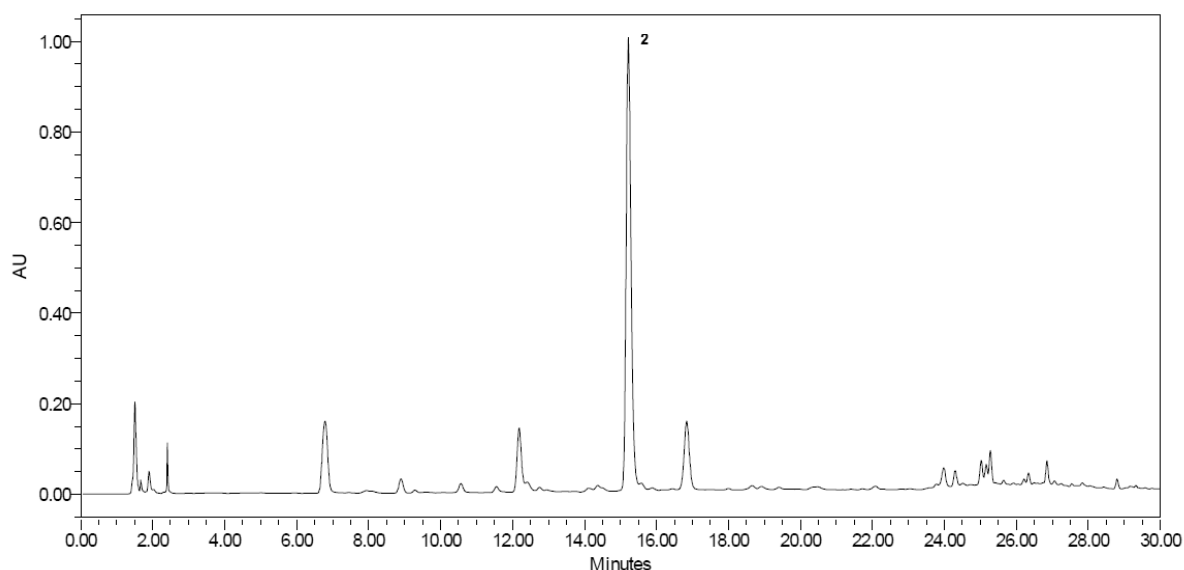
(1):5-ACQ; (2):cafeína; (3):ácido cafeico Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR.

Figura 12 – Perfil cromatográfico do extrato de café verde biotransformado (72h).



(1):5-ACQ; (2):cafeína; (3):ácido cafeico Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 13 – Perfil cromatográfico do extrato de café verde biotransformado (96h)



(2):cafeína Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os teores de 5-ACQ, cafeína e ácido cafeico nos extratos não biotransformados (controle) e biotransformados foram calculados considerando-se as curvas de calibração obtidas e os valores estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentrações de 5-ACQ, ácido cafeico e cafeína ( $\mu\text{g/mL}$ ) durante o processo de biotransformação de café verde (*Coffea arabica* L.) pelo fungo *Aspergillus awamori* CCDCA 1041.

Amostra	5-ACQ	Ácido cafeico	Cafeína
Controle	98,12 $\pm$ 9,14a	6,60 $\pm$ 0,10a	162,11 $\pm$ 9,00a
24 horas	106,93 $\pm$ 13,39a	6,82 $\pm$ 1,30a	163,15 $\pm$ 9,71a
48 horas	153,58 $\pm$ 9,96b	11,25 $\pm$ 9,20b	283,17 $\pm$ 4,66c
72 horas	15,62 $\pm$ 4,48c	7,27 $\pm$ 2,16a	112,17 $\pm$ 43,64a,b
96 horas	-	-	64,22 $\pm$ 15,53b

Os resultados representam a média ( $n=3$ )  $\pm$  desvio padrão. (-) não detectado. Letras iguais na mesma coluna, não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ( $p<0,05$ ) Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os valores máximos do 5-ACQ, ácido cafeico e cafeína foram alcançados após 48 horas de fermentação. Os valores de 5-ACQ, ácido cafeico e cafeína no tempo de 48 horas foram de 56,31%, 70,83% e 74,88% respectivamente, sendo

superiores à mostra controle. Após o período de 48 horas, observou-se um declínio nos valores de 5-CQ, ácido cafeico e cafeína. No tempo de 96 horas somente a cafeína foi identificada, sendo a concentração inferior aos demais tempos de fermentação.

## 6 DISCUSSÃO

O processo de biotransformação dos grãos de café verde pelo fungo *Aspergillus awamori* CCDCA 1041, promoveu uma alteração das concentrações de 5-ACQ, ácido cafeico e cafeína. A atividade antioxidante do café verde é atribuída principalmente à sua fração fenólica, no entanto a atividade antioxidante da cafeína também é descrita na literatura como um inibidor eficaz da peroxidação lipídica ,além de prevenir a oxidação da molécula de DNA (AZAM et al., 2003; GOMEZ-RUIZ; DAVID; AMES, 2007).

O aumento de todas as substâncias avaliadas ocorreu no tempo de 48 horas, no qual foi observada uma maior atividade antioxidante pelos métodos DPPH e poder redutor. Pelos métodos de investigação da atividade antioxidante empregados nesse trabalho a cafeína não apresentou atividade antioxidante. Os ácidos clorogênicos e ácidos cinâmicos presentes no café podem ser encontrados tanto na forma livre como ésteres com açúcares, lipídios e com polissacarídeos como xiloglucanos e pectinas (BEL-RHLID et al., 2013; FARAH; DONANGELO, 2006; TORRES-MANCERA et al., 2013).

O aumento das concentrações de fenólicos possivelmente foi ocasionado pela produção de enzimas fúngicas capazes de clivar a ligação dos compostos fenólicos e da cafeína com a parede celular e com outras moléculas ocasionando o aumento da concentração dessas substâncias. Dentre as enzimas que possivelmente são produzidas destacam-se as hidrolases, como a  $\beta$ -glicosidase e a  $\alpha$ -arabinofuranosidase . (BHANJA et al., 2008; GOTTSCHALK et al., 2010). O aumento da concentração de ácido cafeico pode ter ocorrido pela quebra da ligação éster do 5-ACQ gerando ácido cafeico e ácido quínico (TORRES-MANCERA et al., 2013).

Os trabalhos de biotransformação do café são direcionados principalmente aos resíduos de sua produção. Dentre estes resíduos destacam-se a fermentação de casca de café e polpa utilizando microrganismos para obtenção de maior atividade antioxidante pelo aumento dos teores de substâncias fenólicas e cafeína (LOPEZ et al., 2013; GARCÍA et al., 2015).

Busca-se também o aumento da atividade antioxidante do café torrado, por meio da biotransformação. A co-fermentação de café torrado pela bactéria *Acetobacter aceti*, e pelas leveduras *Zygosaccharomyces bailii* e *Brettanomyces*

*clausenii*. apresentou um aumento de 5-ACQ, ácido cafeico e cafeína (WATAWANA et al., 2015).

O processo de biotransformação propiciou uma alteração significativa na concentração da cafeína. Tanto a degradação da cafeína quanto a sua produção são objetos de estudo para pesquisa e aplicação industrial. A descafeinização é empregada para reduzir o conteúdo de cafeína em produtos alimentícios; tratamento de efluentes contendo cafeína, que são tóxicos para o meio ambiente e descafeinação de resíduos para que podem ser utilizados em outras aplicações (BUERGE et al., 2003; MAZZAFERA, 2002; WHITE; RASMUSSEN, 1998).

Considerando a importância comercial da produção de cafeína para atender às indústrias farmacêutica e de alimentos, a busca por novos métodos de produção assim como a otimização dos métodos já empregados tornaram-se objetivos de vários trabalhos científicos (ALTERMANN et al., 2013; GOKULAKRISHNAN et al., 2005; ZHAO et al., 2011; WANG et al.; 2005; WANG et al., 2008; WATAWANA et al., 2015).

Tanto a produção de cafeína como a descafeinização podem ser realizadas por meio de processos empregando microrganismos. Os resultados obtidos são mais específicos, econômicos e com sustentabilidade ambiental, quando comparados aos métodos tradicionalmente empregados (GOKULAKRISHNAN et al., 2005).

A biotransformação do café verde pelo *Aspergillus awamori* CCDCA 1041 propiciou um aumento da produção de cafeína no tempo de 48 horas, após esse período foi observada uma degradação da substância, quando comparada à amostra controle. Após o período de 48 horas, também foi observada uma degradação de 5-ACQ e ácidos cafeico, devido ao metabolismo fúngico (BRAND et al., 2000; STOILOVA et al., 2006).

Além do café, a fermentação de outras fontes naturais é relatada na literatura propiciando o aumento dos teores de fenólicos e cafeína (WANG et al., 2005; TORRES-MANCERA et al., 2013). A fermentação do chá verde e chá preto por fungos presentes no próprio chá aumentou os teores de cafeína no chá preto em 27.57% no decimo quarto dia e no chá verde em 86.41% após 28 dias de fermentação (WANG et al., 2005).

Chás fermentados por *Aspergillus niger* apresentaram maior atividade antioxidante pelos métodos de determinação das substâncias reativas ao ácido

tiobarbitúrico, do  $\beta$ -caroteno e do DPPH (MORAIS; AUGUSTO; MARTINEZ 2012). A FES, empregando *Bacillus subtilis* com soja amarela promoveu um aumento dos fenóis e da atividade antioxidante pelos métodos do poder redutor e do DPPH (SANJUKTA et al., 2015)

Os microrganismos podem ser empregados tanto para a síntese de substâncias com atividade antioxidante quanto para modificar a estrutura de substâncias a fim de aumentar a atividade antioxidante (TRONINA et al., 2013; GEROMICHALOU et al., 2015).

## 7 CONCLUSÃO

A biotransformação dos grãos de café verde empregando o fungo *Aspergillus awamori* CCDCA 1041 promoveu alterações nos teores de substâncias fenólicas, 5-ACQ, ácido cafeico e cafeína, sendo os maiores valores observados no tempo de 48 horas.

O extrato de café verde biotransformado (48 horas de fermentação) apresentou maior atividade antioxidante pelos métodos avaliados quando comparado ao extrato não biotransformado.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a fermentação dos grãos de café verde pode ser utilizada para o aumento dos teores de 5-ACQ, ácido cafeico e cafeína, ressaltando que essas substâncias apresentam várias aplicações nas indústrias farmacêutica, de alimentos e cosmética.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, Sheila Andrade. **Qualidade da bebida e atividade antioxidante do café in vivo e in vitro**. 2007. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2007.
- ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 414-420, nov. 2010
- ALMEIDA, A. P. et al. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8738–8743, nov. 2006
- ALTERMANN, M. A. et al. A influência da cafeína como recurso ergogênico no exercício físico: sua ação e efeitos colaterais. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 2, n. 10, p. 212–223, mar. 2013.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, out. 2010.
- ANDRADE, Jeyce Kelle Ferreira. **Avaliação da atividade anticâncer da nitrofurantoína e de seus novos derivados**. 2013 (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. 2013
- ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 299–304, out. 2012.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, set. 2007.
- AO, C. et al. Antioxidant phenolic compounds from *Smilax sebeana* Miq. **Food Science and Technology**, v. 44, n. 7, p. 1681–1686, set. 2011
- ARELLANO-GONZÁLEZ, M. A. et al. Antioxidant activity of fermented and nonfermented coffee (*Coffea arabica*) pulp extracts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 374–378, mai 2011.
- AVALLONE, S. et al. Polysaccharide constituents of coffee-bean mucilage. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 8, p. 1308–1311, nov. 2000.
- AZAM, S. et al. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 9, n. 9, p. 325–330, set. 2003.

BALLESTEROS, L. F.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 12, p. 3493–3503, dez. 2014.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, fev. 2006.

BANERJEE, S.; SINGH, S.; RAHMAN, L. Biotransformation studies using hairy root cultures - A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 461–468, mai-jun. 2012.

BEL-RHLID, R. et al. Biotransformation of caffeoyl quinic acids from green coffee extracts by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 28, mai. 2013.

BERGOLD, A. ; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão new antifungic drugs: A review. **Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 5, n. 2, p. 159–172, jul-dez. 2004.

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

BHOITE, R. N.; MURTHY, P. S. Biodegradation of coffee pulp tannin by *Penicillium verrucosum* for production of tannase, statistical optimization and its application. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, n. 1, p. 727–735, abr. 2014.

BLOIS, M. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 191, n. 19, p. 1199–1200, abr. 1958.

BOAVENTURA, M. A. D.; LOPES, R. F. A P.; TAKAHASHI, J. A. Microorganisms as tools in modern chemistry: The biotransformation of 3-indolylacetonitrile and tryptamine by fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 345–347, nov. 2004.

BORÉM, Flavio Meira **Pós-colheita e qualidade do café**. 1. Ed. UFLA .2008

BOUW, H.; WATTENBERG, A.; ZORN, H. Fungal secretomes—nature's toolbox for white biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 381–388, set. 2008.

BRAND, D. et al. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1-2, p. 127–133, jul. 2000.

BRASS, F. E. B. Análise de atividade alelopática de extrato aquoso de falsa- murta sobre a germinação de picão-preto e caruru. **Enciclopédia Biosfera**, v. 5, p. 1–19, 2009.

- BRAVO, L.; SOURCES, D.; SIGNIFICANCE, N. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, nov. 1998.
- BRITO, L. F. et al. Efeito dos resíduos de café seco e fermentado por *Monascus ruber* no metabolismo de camundongos Apo E. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 99, n. 2, p. 747–754, jul. 2012.
- BUERGE, I. J. et al. Caffeine, an anthropogenic marker for wastewater contamination of surface waters. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 691–700, mai. 2003.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 131–134, ago. 2005.
- CANADA -Environment and Climate Change Canada. **Draft Screening Assessment for *Aspergillus awamori* ATCC 22342 (=A. niger ATCC 22342) and *Aspergillus brasiliensis* ATCC 9642**. Canada, 2014 Disponível em: <<http://www.ec.gc.ca/ese-ees/default.asp?lang=En&n=87F8F8B9-1>>. Acesso em: 23 dez. 2015.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, jan. 2013.
- CAVALARI, E. et al. Competitividade do complexo cafeeiro: uma análise a partir do market share e das vantagens comparativas simétricas. **Revista de Economia**, v. 2, n. 1, p. 116–124, jan. 2010.
- CHANG, W.-C. et al. Chlorogenic acid attenuates adhesion molecules upregulation in IL-1beta-treated endothelial cells. **European Journal of Nutrition**, v. 49, n. 5, p. 267–75, ago. 2010.
- CHAO, P.-C.; HSU, C.-C.; YIN, M.-C. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. **Nutrition & metabolism**, v. 6, p. 6 - 33, mar. 2009.
- CHU, Y.-F. et al. Roasted coffees high in lipophilic antioxidants and chlorogenic acid lactones are more neuroprotective than green coffees. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9801–9808, nov. 2009.
- CHU, Y.-F. et al. Type 2 diabetes-related bioactivities of coffee: Assessment of antioxidant activity, NF-κB inhibition, and stimulation of glucose uptake. **Food Chemistry** v. 124, n. 3, p. 914–920, fev. 2011.
- CHUNG, Y. C.; CHANG, C. T.; CHAO, W. W.; LIN, C. F.; CHOU, S. T. Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 8, n. 50, p. 2454 - 2458, abr. 2002

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 362–372, mar. 1999.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZMARTINEZ, J. R. Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. **Food Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 35–42, 1991.

CONESA, A. et al. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. **Fungal Genetics and Biology**, v. 33, n. 3, p. 155–171, ago. 2001.

COUTEAU, D. et al. Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 873–881, jun. 2001.

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

CUI, Y Q. et al. Influence of fermentation conditions and scale on the submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. **Enzyme and Microbial technology**, v. 23 p. 157–167, ago. 1998.

CUNHA, I. G. B. et al. Metabólitos bioativos do endófito Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 2, p. 120–123, abr. 2009.

CRUZ, Ana Paula Gil. **Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante**. 2008. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. 2008.

DAGLIA, M. et al. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1449–1454, mai. 2000.

DE MARIA, C. A.B.; MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C. Componentes voláteis do café torrado. Parte I: compostos heterocíclicos. **Química nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 209-217, 1999.

DE OLIVEIRA, P. M. A. et al. Enrichment of diterpenes in green coffee oil using supercritical fluid extraction – Characterization and comparison with green coffee oil from pressing. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 137–145, ago. 2014.

DEVASAGAYAM, T P. et al. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, n. October, p. 794–804, out. 2004.

DEY, T. B.; BANERJEE, R. Application of decolourized and partially purified polygalacturonase and  $\alpha$ -amylase in apple juice clarification. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 97–104, mai. 2014.

DÓREA, J. G.; DA COSTA, T. H. M. Is coffee a functional food? **The British Journal of Nutrition**, v. 93, n. 6, p. 773–782, jun. 2005.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, jan. 2002.

DUARTE, G. S.; FARAH, A. Effect of simultaneous consumption of milk and coffee on chlorogenic acids' bioavailability in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 14, p. 7925–7931, out. 2011.

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

FAN, L. et al. Gastrodin production from p-2-hydroxybenzyl alcohol through biotransformation by cultured cells of *Aspergillus foetidus* and *Penicillium cyclopium*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 1, p. 138–148, mai 2013.

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

FARAH A.; MONTEIRO M.; DONANGELO CM, L. S. 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA) from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. **Journal of Nutrition**, v. 138, n. 12, p. 2309–2315, dez. 2008.

FIUZA, Gabriel Godofredol. **Poder de mercado do café brasileiro nos eua abordagem via demanda residual**. 2000. (Dissertação Mestrado) Fundação Getulio Vargas, Rio de Janeiro, RJ. 2000.

FUJII, S.; ONO, E. Y. S.; HIROOKA, E. Y. Ocratoxina A em café: controle e metodologia analítica com ênfase a inovação no contexto de segurança alimentar. **Ciências Agrárias**, v. 23, n. 2, p. 273–292, jul. 2002.

FUJIOKA, K.; SHIBAMOTO, T. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 217–221, jan. 2008.

GALAGAN, J. E. et al. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. **Nature** v. 438, n. 7071, p. 1105–1115, dez. 2005.

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

GEROMICHALOU, E. et al. Regioselective chemical and rapid enzymatic synthesis of a novel redox - Antiproliferative molecular hybrid. **European Journal of Medicinal chemistry**, v. 96, n. 1, p. 47–57, mai. 2015.

GOKULAKRISHNAN, S.; CHANDRARAJ, K.; GUMMADI, S. N. Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 225–232, jul. 2005.

- GOMEZ-RUIZ, J. A.; DAVID, L.; AMES, J. M. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 6962–6969, ago. 2007.
- GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. DA S. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, n. 1, p. 72–78, mai. 2010.
- GROSS, G.; JACCAUD, E.; HUGGETT, A. C. Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 547–554, jun. 1997.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, n. 2-3, p. 213–220, 2006.
- GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 474–480, jul. 2006.
- GUMMADI, S. N.; DASH, S. S.; DEVARAI, S. Optimization of production of caffeine demethylase by *Pseudomonas* sp. in a bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 713–720, mai. 2009.
- GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; ROUSSOS, S.; AUGUR, C. Effect of caffeine concentration on biomass production, caffeine degradation, and morphology of *Aspergillus tamarii*. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 3, p. 195–200, mai. 2013.
- HALAL, Shanise Lisie Mello. **Composição , processamento e qualidade do café.**(Trabalho de Conclusão de Curso) UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, PELOTAS,RS. 2008.
- HAN, W. et al. Kinetic analysis of a crude enzyme extract produced via solid state fermentation of bakery waste. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 9, p. 2043–2048, jul. 2015.
- HAN, W. et al. Utilization of wheat for biohydrogen production by a combination of solid-state fermentation and batch fermentation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 17, p. 5849–5855, mar. 2015.
- HANSON, James Ralph. **An Introduction to Biotransformations in Organic Chemistry**, W.H. Freeman (Ed.), Spektrum, 1995.
- HECKMAN, M.; WEIL, J.; DE MEJIA, E G. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: A comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 77–87, 1750-3841, abr. 2010
- HERNÁNDEZ, J. A.; HEYD, B.; TRYSTRAM, G. Prediction of brightness and surface area kinetics during coffee roasting. **Journal of Food Engineering** v. 89, n. 2, p. 156–163, nov. 2008.

HUANG, D BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, fev. 2005.

IKEDA, K. et al. Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 28, n. 4, p. 595–598, 2011.

JANG, E. et al. Chlorogenic acid and coffee prevent hypoxia-induced retinal degeneration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 1, p. 182–191, jan. 2014

JASINSKI, Vanessa Cristina Godoy. **Óleos essenciais e compostos fenólicos de espécimes masculinos e femininos de Baccharis uncinella DC.** 2010. (Dissertação de mestrado). Química Aplicada Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR. 2010.

JIN, S. et al. Enhanced extraction genistein from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] roots with the biotransformation of immobilized edible *Aspergillus oryzae* and *Monascus anka* and antioxidant activity evaluation. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1285–1292, jun. 2013.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 453–464, ago. 2010

KARTHIKEYAN, A.; SIVAKUMAR, N. Citric acid production by Koji fermentation using banana peel as a novel substrate. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5552–5556, mar. 2010.

KONISHI, Y.; KOBAYASHI, S.; SHIMIZU, M. Transepithelial transport of p-coumaric acid and gallic acid in Caco-2 cell monolayers. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67, n. 11, p. 2317–24, nov. 2003.

KONISHI, Y.; ZHAO, Z.; SHIMIZU, M. Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7539–7543, out. 2006.

KOZUMA, K. et al. Antihypertensive effect of green coffee bean extract on mildly hypertensive subjects. **Hypertension Research**, v. 28, n. 9, p. 711–718, set. 2005.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems-an overview. **Critical Reviews in Biotechnology** v. 25, n. 1-2, p. 1–30, jan-jun. 2005.

KUMAZAWA, K.; MASUDA, H. AGRICULTURAL AND Effect of pH on the Thermal Stability of Potent Roasty. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 8032–8035, dez. 2003.

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

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

LEMOS, J. L.; PEREIRA, N. E. I. 2013 Produção de xilanases por *Aspergillus awamori* e a determinação do seu peso molecular por eletroforese em condições desnaturantes. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 1, n. 1, p. 45–52, fev. 2013.

LI, L.; ISHDORJ, G.; GIBSON, S. B. Free Radical Biology and Medicine Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer : Implications for cancer treatment. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 7, p. 1399–1410 , jul. 2012

LIMA, A. R. et al. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p. 20–24 , 2010.

LIMA, Matheus Vicente. **Propriedades físico-químicas do café**. 2006. (Tese Doutorado) Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. 2006.

LIN, C.; WEI, Y.; CHOU, C. Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi. **Food microbiology**, v. 23, n. 7, p. 628–33 , out 2006.

LIN, S. et al. Enhanced DPPH radical scavenging activity and DNA protection effect of litchi pericarp extract by *Aspergillus awamori* bioconversion. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 108, set. 2012.

LINDSAY, J. Risk Factors for Alzheimer's Disease: A Prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. **American Journal of Epidemiology**, v. 156, n. 5, p. 445–453 , 2002.

LIU, J.; YU, B. Biotransformation of bioactive natural products for pharmaceutical lead compounds. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 14, p. 1400–1406 , 2010.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta** v. 763, p. 1–10 , 2013.

LÓPEZ, T. et al. Incremento de la capacidad antioxidante de extractos de pulpa de café por fermentación láctica en medio sólido. **Journal of Food**, v. 11, n. 4, p. 359–365, fev. 2013.

MACHLIN, L.J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients, **The faseb Journal**, v. 1, n. 6, p. 441-445, dez. 1987.

MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715–721 , dez. 2002.

MANACH, C. Polyphenols : food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727 – 747, 2004.



MARTINEZ, S. et al. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 1, p. 1–9, jan. 2004.

MARTINS, E. S. et al. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 949–954, abr. 2002.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365–373, mai-jun. 2011.

MAZZAFERA, P. Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. **Scientia Agricola**, v. 59, p. 815–821, out-dez. 2002.

MAZZAFERA, P.; SILVAROLLA, M. B. Caffeine content variation in single green Arabica coffee seeds. **Seed Science Research**, v. 20, n. 03, p. 163–167, set. 2010.

MCCUE, P.; SHETTY, K. Role of carbohydrate-cleaving enzymes in phenolic antioxidant mobilization from whole soybean fermented with *Rhizopus oligosporus*. **Food Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 27–37, fev. 2003.

MONTEIRO, M.C.; MARQUES, V.X.; FARAH, A. Chlorogenic acids from green and roasted coffees are equally absorbed and metabolized by humans. **The FASEB Journal**, v.24, p.922-929, abr. 2010.

MORAIS, C.; AUGUSTO, C.; MARTINEZ, R. Avaliação da atividade antioxidante in vitro dos chás mate e verde antes e após a biotransformação por lipases. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 661–669, out-dez; 2012.

MOREIRA, A. S. P. et al. Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. **Food & Function**, v. 3, n. 9, p. 903, mai. 2012.

MOREIRA, M. E. C. et al. Atividade antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1738–1742, 2008.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; DE MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado. Parte II. Compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 195–203, 2000.

Moreira, Maria Eliza de Castro. **Avaliação do potencial farmacológico do café (*Coffea arabica* L.) verde e torrado**. Lavras, 2013. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG. 2013.

MORI, H.; IWAHASHI, H. Antioxidant activity of caffeic acid through a novel mechanism under UVA irradiation. **Journal of Clinical Biochemistry And Nutrition**, v. 45, n. 1, p. 49–55, jun. 2009.

MUSSATTO, S. et al. Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. **Food and Bioprocess Technology** v. 4, n. 5, p. 661–672, jul. 2011.

MUSSATTO, S. I. et al. Economic analysis and environmental impact assessment of three different fermentation processes for fructooligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 673–681, set. 2015.

MYCOBANK DATABASE Fungal Databases, Nomenclature & Species. *Aspergillus awamori*. Disponível em: [http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr\\_=119955](http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=119955). Acesso em: 23 dez. 2015.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, v. 1054, n. 1-2, p. 95–111, out. 2004.

NAIDU, M. M. et al. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee CGA content total phenolic content. **Food Chemistry**, v. 107, p. 377–384, 2008.

NATELLA, F. et al. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6211–6216, out. 2002.

NOGUEIRA, F. D.; TÁCITO, P.; GUIMARÃES, G. Composição química, produção e qualidade do café fertilizado com diferentes fontes e doses de nitrogênio. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p. 1246–1252, nov-dez. 2003.

NOSCHANG, C. G. et al. Interactions between chronic stress and chronic consumption of caffeine on the enzymatic antioxidant system. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 9, p. 1568–1574, mar. 2009.

OCHIAI, R. et al. Green coffee bean extract improves human vasoreactivity. **Hypertension research : journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 27, n. 10, p. 731–737, out. 2004.

ODA, Fernando. Bombarda. **Avaliação da utilização de subprodutos de Coffea arabica I. para fins cosméticos**. Araraquara, 2014. (Trabalho de Conclusão de Curso). Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho”. Rio Claro. SP, 2014

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OLTHOF, M. R. et al. Human nutrition and metabolism chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans 1. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1806–1814, jun. 2003.

ONAKPOYA, I.; TERRY, R.; ERNST, E. The use of green coffee extract as a weight loss supplement: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2011, n. 1, p. 1–6, 2011.

OYAIZU, M. Studies on product of browning reaction – Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 307-315, jan. 1986.

PANDEY, A. New developments in solid state fermentation: I-bioprocess and products. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 149–162, jul. 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 81–84, mar. 2003.

PEREIRA, A. et al. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. **Journal of Biosciences**, v. 58, n. 7-8, p. 590–593, jul-ago. 2003.

PEREIRA, Cristiane de Souza Siqueira. **Avaliação de diferentes tecnologias na extração do Óleo do Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L)**. 2009. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro, Seropédica, RJ. 2009

PHOSRITHONG, N.; SAMEE, W.; NUNTHANAVANIT, P.; UNGWITAYATORN, J. In vitro antioxidant activity study of novel chromone derivatives. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 79, p. 981-989, jun. 2012

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, jun. 2005.

POMPEU, Darly Rodrigues. **Adsorção de três famílias de compostos fenólicos em resinas sintéticas macroporosas**. 2007. (Dissertação Mestrado). Universidade Federal do Pará, Belém, PA. 2007

RAJENDRA-PRASAD, N. et al. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 349, n. 1-2, p. 11–19, mar. 2011.

RANHEIM, T.; HALVORSEN, B. Coffee consumption and human health--beneficial or detrimental?--Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. **Molecular nutrition & food research**, v. 49, n. 3, p. 274–284, mar. 2005.

RASHAD, M. M. et al. Improvement of nutritional quality and antioxidant activities of yeast fermented soybean curd residue. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 28, p. 5504–5513, jun. 2011.

ROCHA, L. D.; MONTEIRO, M. C.; TEODORO, A. J. Anticancer Properties of Hydroxycinnamic Acids -A Review. **Cancer and Clinical Oncology**, v. 1, n. 2, p. 109, out. 2012.

RODRIGUES, F. et al. Are coffee silverskin extracts safe for topical use? An in vitro and in vivo approach. **Industrial Crops and Products**, v. 63, p. 167–174, jan. 2015.

SACCHETTI, G.; DI MATTIA, C.; PITTIA, P.; MASTROCOLA, D. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 1, p. 74-80, jan. 2009.

SALDAÑA, M. D. A.; MAZZAFERA, P.; MOHAMED, R. S. Extração dos alcalóides : cafeína e trigonelina dos grãos de café com CO<sub>2</sub> supercrítico. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 17, n. 4, p. 1–10, 1997.

SALVA, T.J.G.; LIMA, V.B. A composição química do café e as características da bebida e do grão. **O agrônomo**, v.59, n.1, p. 57-59, 2007.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. 1 ed. Canoas: Ed. ULBRA, 2004. 212p.

SANJUKTA, S. et al. Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 14, n. 1, p. 650–658, abr. 2015.

SANTOS, M D. et al. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2236–2240 , nov. 2006.

SHIMODA, H.; SEKI, E.; AITANI, M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 6, p. 1–9, mar. 2006.

SHIN, J. Y. et al. Pharmacological activities of coffee roasted from fermented green coffee beans with fungal mycelia in solid-state culture. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 42, n. 3, p. 487–496, mar. 2013.

SIMÕES, C.M.C. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS, 2001. 883p.

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

SIVARAMKRISHNAN, S. et al. Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 66, n. 8, p. 621–626 , set. 2007

SOARES, I. A. et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700–705 , jun-set. 2010.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutricao**, v. 15, n. 1, p. 71–81 , jan-abr. 2002.

SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, p. 376–390 , jan. 2013.

SOTO-VACA, A. et al. Evolution of good polyphenolics from color and flavor problems to health benefits Evolution of Phenolic compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 6658–6677 , mai. 2012.

SOUSA, F. C. F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 642–654 , out. 2008.

SOUZA, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, mar-abr. 2007.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268–3295 , dez. 2007.

STOILOVA, I. et al. Biodegradation of high amounts of phenol, catechol, 2,4-dichlorophenol and 2,6-dimethoxyphenol by *Aspergillus awamori* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1036–1041, 2006.

SUN, Z. et al. Mixed Food Waste as Renewable Feedstock in Succinic Acid Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 5, p. 1822–1833 , ago. 2014.

TIVERON, Ana Paula. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil Piracicaba**. 2010. (Dissertação Mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2010.

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

TREUTTER, D. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. **Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 1, p. 71–89 , mai. 2001.

TRONINA, T. et al. Antioxidant and antiproliferative activity of glycosides obtained by biotransformation of xanthohumol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 7, p. 1957–1960, abr. 2013.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231–1246 , dez. 2010.

TSUKUI, A.; OIGMAN, S. S.; REZENDE, C. M. Oil green coffee beans: Diterpenes cafestol and kahweol. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 16–33, jan. 2014.

VALENTE, A. M. M. P et al .Production of 5-hydroxy-7-methoxy-4-methylphthalide in a culture of *Penicillium crustosum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 2, p. 487–496 , abr-jun. 2013.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VANCINI, R. L. et al. Influência do exercício sobre a produção de radicais livres. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, v. 10, n. 2, p. 47–58, 2002.

VEIGA, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 308–313, abr-jun. 2008.

VIEIRA, Monclaro Antonielle. **Caracterização de múltiplas formas de xilanases produzidas por Aspergillus oryzae quando crescido**. 2014. CDissertação de Mestrado) Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2014.

WAGEMAKER, T. A. L. et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of green coffee oil in cosmetic formulations. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 9, n. 2, p. 207–214, nov. 2012.

WANG, X. et al. Study on the increase mechanism of the caffeine content during the fermentation of tea with microorganisms. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1086–1091, abr. 2008.

WANG, X. et al. Effect of microbial fermentation on caffeine content of tea leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 7238–7242, set. 2005.

WATANABE, T. et al. The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. **Clinical and experimental hypertension**, v. 28, n. 5, p. 439–449, jul. 2006.

WATAWANA, M. I.; JAYAWARDENA, N.; WAISUNDARA, V. Y. Enhancement of the Functional Properties of Coffee Through Fermentation by “Tea Fungus” (Kombucha). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, p. 2596–2603, mai. 2015.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 410, n. 3, p. 223–236, jun. 1998.

ZHAO, Z. et al. 5-caffeoylquinic acid and caffeic acid down-regulate the oxidative stress- and TNF-alpha-induced secretion of interleukin-8 from Caco-2 cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 3863–3868, mai. 2008.

ZHAO, H. et al. Changes of constituents and activity to apoptosis and cell cycle during fermentation of tea. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 3, p. 1862–1875, mar. 2011.

ZÚÑIGA, U. F. R. et al. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 8, n. 1, p. 912–919, ago. 2011.