



CAPÍTULO 5

DITERPENOS *ENT*-CAURANOS PRESENTES NO CAFÉ, CAFESTOL E CAVEOL - ASPECTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS

Maria Alice E. da Silva^a; Ana Laura M. Brand^a; Raquel C. Ribeiro^a; Rodrigo da S.Velloso^a; Fernanda A.Lima^a; Carlo M. Filho; Maria M. do N. Cruz^a; Humberto R. Bizzo^b; Fábio Junior M. Novaes^c; Claudia M. de Rezende^a*

^aInstituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-909 Rio de Janeiro-RJ

^bEmbrapa Agroindústria de Alimentos, 23020-470 Rio de Janeiro-RJ

^cDepartamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900 Viçosa-MG

*e-mail: crezende@iq.ufrj.br

Palavras-chave: *Coffea*; lipídeos; Rubiaceae.

INTRODUÇÃO

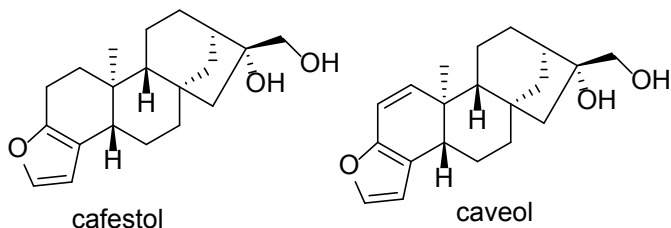
O café é um antigo conhecido nosso. Seu aroma é identificado à distância, e logo sabemos quando se está preparando um cafezinho. Mas por baixo deste rótulo de uma simples e cotidiana bebida, há um universo rico de substâncias químicas resultantes tanto de aspectos genéticos, agrícolas quanto edafoclimáticos. E entre estas substâncias, compondo a fração lipídica do café, encontram-se cafestol e caveol, diterpenos, temas deste capítulo.

Figura 1. Grãos de café arábica (*Coffea arabica* Linnaeus, Rubiaceae) em diferentes graus de amadurecimento (fonte própria). Os grãos mais vermelhos (bandeja abaixo), conhecidos como cereja, são aqueles sensorialmente apropriados para consumo humano



Cafestol e caveol (C&K) são álcoois diterpênicos pentacíclicos, furanoides, de esqueleto *ent*-caurano, que se distinguem pela presença de uma ligação dupla entre C1 e C2 (**Figura 2**). São produzidos exclusivamente por plantas do gênero *Coffea* (Rubiaceae), presentes nas duas espécies de café mais importantes comercialmente, que são *Coffea arabica* Linnaeus (café Arábica) e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner, cujas variedades mais conhecidas são robusta e conilon.¹ Cafestol, por sua vez, já foi encontrado em outra planta da família Rubiaceae, *Tricalysia dubia*.²

Figura 2. Estruturas químicas dos diterpenos cafestol e caveol



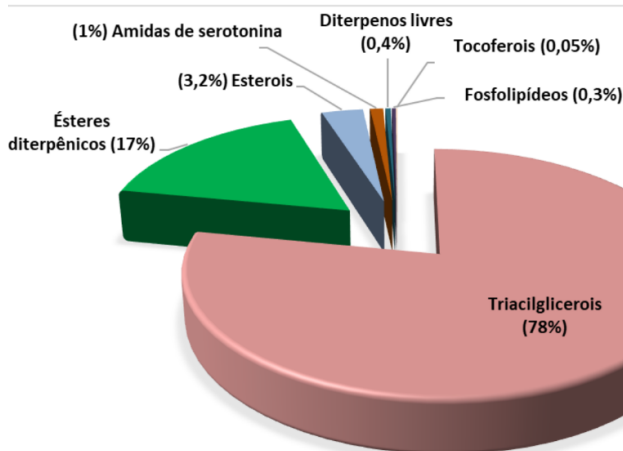
C&K são majoritariamente encontrados como ésteres monoesterificados na hidroxila primária ligada ao C17. Inicialmente, foram identificados seis ésteres de cafestol, com unidades acila contendo número de carbonos e grau de insaturação variados (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:0 e C22:0), a partir do óleo de café arábica.³ Inúmeros trabalhos se seguiram caracterizando estes e outros diterpenos acilados, inclusive para o caveol. A fim de simplificar as diversas referências bibliográficas existentes acerca deste assunto recomendamos, para uma abordagem geral acerca do assunto, a leitura da revisão de Speer e Kolling-Speer.¹ Apesar destes ésteres representarem mais de 90% da composição dos diterpenos do café, seus estudos se concentram nos álcoois livres, cafestol e caveol (**Figura 2**), especialmente por causa da complexidade de sua separação, já que até 24 ésteres de C&K podem ser observados nos grãos e nas bebidas de café.⁴ Nos estudos sobre processos extrativos, ensaios biológicos ou controle de qualidade do café, estes ésteres são invariavelmente hidrolisados aos álcoois primários.^{5,6}

Ainda é observado, em cafés da espécie robusta, o derivado metoxilado no C16 do cafestol e seus ésteres variados. 16-O-metil-cafestol (16-OMC) foi identificado pela primeira vez por Pettit Jr.,⁷ e seus ésteres quantificados por Speer em 1991 via cromatografia de permeação em gel (CPG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).⁸ Posteriormente foi descrita a existência de 16-O-metil-caveol em cafés robusta.¹ A contribuição dos diterpenos à fração lipídica do óleo de café representa cerca de 10-20 % m/m e 0,2-2,5 % da composição total do grão.^{4,9-11} O principal representante é o palmitato dos diterpenos C&K (C_{16:0}, 36-50%), seguido do linoleato (C_{18:2},

20-26%), oleato ($C_{18:1}$, 7-22%), estearato ($C_{18:0}$, 7-18%) e araquidato ($C_{16:0}$, 3-8%), sendo estes os mais comuns para arábica e canéfora.^{1,4,6} Em média, os grãos *C. arabica* contêm de 1,3-1,9 % (p/p) dos diterpenos, enquanto *C. canephora* contêm 0,2-1,5 %.¹² Tipicamente, teores entre 221 a 1.308 mg 100 g⁻¹ e 120 a 1.265 mg 100 g⁻¹ são encontrados para C&K em grãos arábica crus (não torrados), enquanto que 151 a 300 mg 100 g⁻¹ de cafestol e 0 a 200 mg 100 g⁻¹ de caveol são observados em grãos de robusta e conillon.^{4,6}

O café arábica possui uma composição lipídica mais abundante do que robusta e conilon, cuja composição química se encontra representada na **Figura 3**.

Figura 3. Composição química da fração lipídica do café arábica



ASPECTOS RELACIONADOS ÀS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS DITERPENOS DO CAFÉ

Em 1983, Thelle et al. descreveram a primeira correlação entre o consumo da bebida de café fervido e o aumento do colesterol na população norueguesa, que contou com 14.000 participantes de 20 a 54 anos de idade.

de. Foi observado que, para a ingestão de aproximadamente 9 xícaras/dia, ocorria um aumento do colesterol sérico de 12% e 11% para homens e mulheres, respectivamente.¹³ Portanto, C&K foram associados à hipercolesterolemia, posteriormente confirmada por outros autores.¹⁴

A bebida do café fervido, muito consumida nos países escandinavos, é feita com grãos de café de torra escura e granulometria fina que devem ser fervidos com água durante 10 minutos, seguido de repouso de 2 minutos antes do consumo para que ocorra a decantação do pó. A bebida não é filtrada em papel ou pano, de modo semelhante à prensa francesa e ao espresso. Urgert et al investigaram a concentração dos diterpenos nas bebidas fervida, turca, prensa francesa, espresso, moka, percolada e filtrada, por cromatografia a gás, e viram que o café fervido apresentava o maior teor de diterpenos, seguido do turco, da prensa francesa e do espresso, respectivamente.¹⁴ Num espaço de tempo em que diversos estudos foram realizados neste assunto, foi reforçada a reduzida concentração dos diterpenos na bebida filtrada, exaltando suas vantagens, inclusive sendo esta bebida quente do café a mais apreciada pelos brasileiros.⁶

A hipercolesterolemia é a única atividade biológica de C&K observada em humanos. Entretanto, estes diterpenos apresentam atividades biológicas interessantes demonstradas em estudos *in vitro* e *in vivo*, por exemplo, antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiosteoclastogênese, anti-diabetes, antiadipogênese e hipoglicemiante. Diversos estudos são reportados nestes assuntos e assim recomendamos, a fim de simplificar e reduzir o número de referências bibliográficas a serem citadas, que os leitores consultem a revisão de Silva et al.⁵ e de Novaes et al.⁶

Cafestol e caveol têm um interessante perfil antiproliferativo e pró-apoptótico em diferentes linhagens celulares e reduzem a resistência das células cancerígenas às drogas antineoplásicas. Curiosamente, eles são os únicos compostos bioativos no café que mostram atividade antitumoral significativa em linhagens celulares para alguns tipos de câncer.⁵

EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE CAFESTOL E CAVEOLA PARTIR DOS GRÃOS CRUS DE CAFÉ

A extração de C&K se dá, mais comumente, a partir do óleo do café ou diretamente do grão cru. O óleo é comercialmente obtido por prensagem, em prensas mecânicas, e pela extração com solventes, sendo mais comum o extrator Soxhlet, especialmente para fins analíticos. Outros estudos já foram realizados, sendo alguns dos pioneiros aqueles empregando técnicas como ultrassom, micro-ondas desenvolvido por nosso grupo de pesquisas, fluido supercrítico e extração acelerada por solvente, que se encontram discutidos e comparados em Dong et al (2021).¹⁵

O óleo ou o grão de café fornecem a complexa mistura dos ésteres já descritos, sendo assim há necessidade de saponificação ou transesterificação destes extratos para se obter C&K livres da porção acila. O processo não é trivial e há consenso, na literatura científica, de que a saponificação direta a quente dos grãos crus de café, catalisada por base e seguida da extração com um solvente orgânico, é o procedimento que fornece o maior rendimento destes diterpenos.^{10,16} Neste contexto se inicia uma das importantes contribuições do nosso laboratório de pesquisas à química do café.

A CONTRIBUIÇÃO DO LAROMA – LABORATÓRIO DE ANÁLISE DE AROMAS DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UFRJ – AO ESTUDO DO CAFÉ E SUA FRAÇÃO LIPÍDICA

Nosso grupo vem se dedicando ao estudo da matriz do café há aproximadamente 20 anos. Os primeiros trabalhos focaram em compreender os voláteis oriundos da torra do café e sua correlação com os precursores presentes nos grãos crus.¹⁷ Logo se verificou a necessidade de empregar técnicas analíticas de alta sensibilidade e resolução, e neste período adquirimos,

num consórcio, um HPLC acoplado a um espectrômetro de massas sequencial (EM/EM) de alta resolução a partir do qual foram desenvolvidos diversos trabalhos pioneiros sobre a composição química do café, especialmente em metabolômica. Nesta, estudos sobre a composição química abrangente de metabólitos sob diversas condições são realizados. No caso do café, foram investigados metabólitos sob a influência de diferentes espécies, processos de pós-colheita e região geográfica, com diferentes extratos e por imageamento dos grãos via MS.¹⁸⁻²⁰

A dificuldade na detecção dos lipídeos nesta matriz, assim como em outras de origem animal ou vegetal, era a realidade desta época. Os estudos sobre lipidômica em EM estavam se estruturando e, neste cenário, eventualmente observávamos a presença dos diterpenos em situações diversas, correlacionadas aos processos de pós-colheita e aos estágios de amadurecimento dos grãos crus, dois aspectos que afetam fortemente a composição química tanto do grão cru quanto dos grãos torrados.

Rapidamente concluímos que, para dar prosseguimento a um estudo mais detalhado sobre os lipídeos do café, haveria a necessidade de implantar no laboratório alguns protocolos de isolamento e análise destes diterpenos, em escala macro.

Dada a termolabilidade destas substâncias e a sensibilidade do núcleo furânico às condições ácidas diversas, optamos por seguir no caminho da saponificação direta a quente dos grãos de café cru para alcançar o isolamento de C&K. A metodologia foi adaptada a partir de Dias et al.¹⁶ por Novaes et al. através de estudos de otimização da etapa de saponificação (tempo de reação e quantidade de hidróxido de potássio empregado) e da seleção do melhor solvente de extração dos diterpenos, empregando os parâmetros de solubilidade de Hansen.¹¹ Ao fim do processo otimizado, obteve-se um rendimento de 1,5 % m/m da mistura C&K a partir de 0,5 g de amostra, 14 % mais eficiente que o estudo original. Investigamos a seguir a possibilidade do aumento da escala do método, que rendeu cerca de 1,6 g dos diterpenos a partir de 300 g de grãos verdes de café arábica. Uma escala pouco usual na Química de Produtos Naturais.

De posse desta metodologia, com a qual passamos a ter estes diterpenos em grande quantidade e alta pureza (>99%), diversas contribuições científicas inéditas foram e vem sendo alcançadas por nosso grupo de pesquisas.

Um dos estudos que deve ser destacado se refere a identificação dos metabólitos do cafestol através do modelo *in vivo* zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton-Buchanan, 1822), empregando CLAE-EM/EM com fonte de ionização eletronebulização (ESI) e detector orbitrap.²¹ O modelo do zebrafish, ou peixe zebra, possui enzimas metabólicas homólogas às dos humanos, é de fácil operação, com baixo valor de manutenção e não é necessária a manipulação direta do peixe, e sim da água do aquário. Neste contexto, foi proposta uma rota de fragmentação para o cafestol com a caracterização de fragmentos diagnósticos, que guiaram a elucidação estrutural dos metabólitos do peixe zebra. Observou-se a formação de 5 metabólitos inéditos na literatura, oriundos de reações CYP-independente e CYP-dependentes de Fase I, cuja elucidação estrutural foi realizada com o auxílio de análises *in silico* com os softwares SMARTCyp, Way2Drug e XenoSite.

Este estudo guiou duas outras investigações. Na primeira delas,²² foi investigada a bioacessibilidade do cafestol a partir da bebida de café fervido, empregando uma metodologia de digestão *in vitro* estática, acompanhada do estudo dos possíveis metabólitos formados durante o processo de digestão, utilizando CLAE-EM/EM. Três possíveis metabólitos foram identificados, dois formados durante a fase oral da digestão com m/z 331,1909 $[M+H]^+$ e m/z 349,2014 $[M+H]^+$ e um formado durante a fase gástrica, com m/z 364,2124 $[M+H]^+$, cuja sugestão estrutural também foi baseada nos softwares SMARTCyp, XenoSite e Way2Drug, seguido de racionalização por MS.

No segundo trabalho,²³ foi avaliada como a utilização de três leveduras comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, empregadas na indústria de panificação e de vinhos, influenciavam a composição química dos grãos de café cru no processo de pós-colheita por via úmida, um dos procedimentos mais empregados para a obtenção de cafés especiais na atualidade. Os processos de pós-colheita do café cru causam profundas alterações na composição química destes grãos como revisado neste trabalho, e diferenças significati-

vas foram observadas pela primeira vez para C&K, em comparação com o café controle, com redução de 54% para cafestol e 53% para caveol.²³ O processo saltou aos nossos olhos haja visto o papel negativo do cafestol perante a hipercolesterolemia humana. Também teriam estes metabólitos impacto no metabolismo lipídico? Assim sendo, foi realizada uma investigação sobre a natureza química dos metabólitos formados neste ambiente fermentativo, por CLAE-EM/EM, onde oito substâncias puderam ser sugeridas, entre elas derivados carboxílicos, aldeídicos e um aduto de hidroximetilfurfural.²⁴ Cabe ressaltar que este processo de produção foi incorporado ao portfólio de cafés especiais da fazenda produtora parceira.

A partir destes três estudos, nosso laboratório vem investigando rotas sintéticas para a produção de alguns destes metabólitos, de modo a compreender seu papel biológico em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Os primeiros estudos sobre lipidômica do grão de café foram mais recentemente realizados por nosso grupo de pesquisa.²⁵

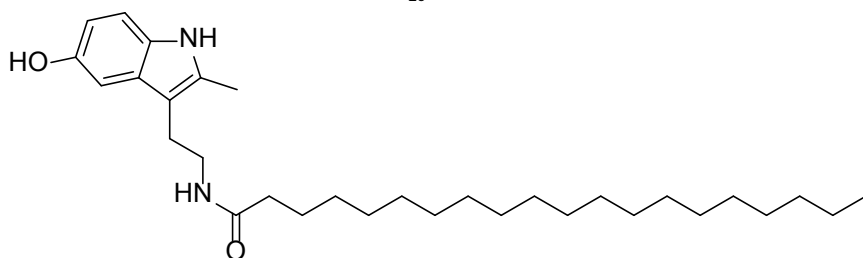
Em paralelo, foi desenvolvido um processo de hidrogenação catalítica heterogênea da mistura de C&K em batelada e em fluxo contínuo.²⁶ Neste protocolo, a transformação de caveol em cafestol quase dobra o rendimento do processo global, mantendo a pureza do cafestol acima de 99%. Cabe destacar que a reação de hidrogenação catalítica heterogênea em fluxo contínuo do caveol se deu com formação de produto (cafestol) em 9,8 segundos. Nesta tese, foram ainda sintetizados ésteres aromáticos de cafestol inéditos, avaliados positivamente frente a atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos DPPH, ORAC, FRAP e supressão de oxigênio singlete.²⁷

Os diterpenos C&K vem sendo explorados ainda, no nosso grupo, quanto ao seu papel no óleo de café cru. Nos últimos anos tem havido interesse da indústria de cosméticos sobre este óleo como hidratante e emoliente, além da sua capacidade de bloquear raios solares UV nocivos à saúde humana.²⁸

Dada a termolabilidade dos diterpenos, investigamos inicialmente a extração do óleo dos grãos verdes moídos por esmagamento em prensa contínua do tipo rosca sem fim, um processo físico a frio semelhante ao que é usado comercialmente. Foi observado que o rendimento de óleo obtido

dos grãos Arábica crus variou entre 3 e 7%, abaixo do que é conhecido para a fração lipídica total do grão arábica, que pode chegar a até 17% (**Figura 3**). Mais recentemente, a fim de desestruturar por completo os grãos e romper as bolsas lipídicas onde os diterpenos se encontram, estudamos a moagem por extrusão com dupla rosca seguida da extração por Soxhlet. Ela favorece a ruptura mecânica de matérias primas mais rígidas, como no caso do grão do café. Neste processo, foi observado que o rendimento de óleo a partir do grão chegou a alcançar quase 16% (resultados não publicados). O trabalho encontra-se em andamento frente a concentração dos diterpenos e de outros lipídeos do café, como as amidas de serotonina C-5HT (**Figura 4**), outro grupo de metabólitos do café que nosso grupo vem se dedicando a pesquisar.²⁹

Figura 4. Estrutura química da amida C₂₀-5HT, majoritária em grãos de café



Trabalhos iniciais relativos ao aproveitamento da biomassa do café, especialmente de grãos defeituosos de baixo valor comercial, já se encontram em andamento. Esperamos apresentar resultados promissores destes estudos futuros no segundo livro sobre a química dos produtos naturais brasileiros.

CONCLUSÃO

Sempre que possível, a Ciência deve esclarecer, explorar e dar novos horizontes a assuntos diversos. Neste contexto, nada como buscar alternativas criativas para matrizes naturais brasileiras em abundância, como é o caso do café.

O Brasil é o maior produtor e exportador de grãos crus de cafés há mais de 100 anos. Olhar para esta matriz através dos olhos de um/a químico/a de produtos naturais é agregar valor e potencialidade a este produto. O grão de café é rico em metabólitos, e em poucas matrizes naturais nos deparamos com um teor tão expressivo de diterpenos, um dos motivos que nos fez mergulhar a fundo no estudo destas substâncias.

Além deste cenário, é preciso chamar atenção ao fato de que até 20% da produção brasileira de café é de grãos defeituosos, inadequados a exportação e que mais recentemente passaram a sofrer novas regras regulatórias para sua comercialização. Estes grãos possuem, em sua composição química, os mesmos metabólitos, em maior ou menor quantidade. Cabe a nós, como cientistas, entender como melhor aproveitá-los e dar destino nobre a esta biomassa residual tão expressiva.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências de fomento Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Embrapa Café.

REFERÊNCIAS

1. Speer, K.; Kölling-Speer, I.; Braz. J.; *Plant Physiol.* **2006**, *18*, 201.
2. Nishimura, K.; et al.; *J. Nat. Prodc.* **2007**, *70*, 758.
3. Kaufmann, H. P.; Hamsagar, R. S.; *Fett. Wiss. Technol.* **1962**, *64*, 734.
4. Moenfar, M.; Erny, G. L.; Alves, A. J.; *Food Meas. Charact.* **2020**, *14*, 1451.
5. Silva, M. A. E.; Brand, A. L. M.; Novaes, F. J. M.; Rezende, C. M.; *Food Rev. Int.* **2022**, *39*, 7048.
6. Novaes, F. J. M.; Silva, M. A. E.; Silva, D. C.; Aquino Neto, F. R.; Rezende, C. M.; *Plants* **2023**, *12*, 1580.
7. Pettitt, B. C. J.; *Agric. Food Chem.*, **1987**, *35*, 549.

8. Speer K. Em Proc. Euro Food Chem. VI, Hamburgo, Alemanha; Baltes. W.; Eklund, T.; Fenwick, R.; Pfannhauser, W.; Ruiter, H.-P. T. A., eds; Behr's Verlag GmbH Co.; Hamburg, 1991, vol. 1
9. Novaes, F. J. M.; Oigman, S. S.; Souza, R. O. M. A.; Rezende, C. M.; Aquino Neto, F. R.; *Talanta* **2015**, 139, 159.
10. Novaes, F. J. M.; Kulsing, C.; Bizzo, H. B.; Aquino Neto, F. R.; Rezende, C. M.; Marriott, P. J.; *J. Chromatog. A* **2018**, 1536, 75.
11. Novaes, F. J. M.; Lima, F. A.; Calado, V.; Marriott, P. J.; Aquino Neto, F. R.; Rezende, C. M.; *Ind. Crops Prod.* **2020**, 152, 112494.
12. Wermelinger, T.; D'Ambrosio, L.; Klopprogge, B.; Yeretzian, C.; *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, 59, 9074.
13. Thelle, D. S.; Arnesen, E.; Førde, O. H.; *N. Engl. J. Med.* **1983**, 308, 1454.
14. Urgert, R.; van der Weg, G.; Kosmeijer-Schuil, T. G.; van der Bovenkamp, P.; Hovenier, R.; Katan, M. B.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 2167.
15. Dong; *et al.*; *Ultrason. Sonochem.* **2021**, 74, 105578.
16. Dias, R. C. E.; Faria, A. F. de; Mercadante, A. Z.; Bragagnolo, N.; Benassi, M. de T.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, 24, 492.
17. Arruda; *et al.*; *Quim. Nova* **2012**, 35, 2044.
18. Garrett, R.; Rezende, C. M.; *Ifa, D. LWT.* **2015**, 65, 711.
19. Costa, R. G.; *et al.*; *LWT.* **2013**, 50, 496.
20. Garrett, R.; Vaz, B. G.; Hovell, A. M. C.; Eberlin, M. S. N.; Rezende, C. M.; *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 4253.
21. Andriolo, C. V.; Novaes, F. J. M.; Pereira, H. M. G.; Sardela, V. F.; Rezende, C. M.; *J. Chromatogr. B.* **2021**, 1186, 123028.
22. Brand, A. L. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2020.
23. Tinoco, N. A. B.; Pacheco, S.; Godoy, R. L. O.; Bizzo, H. R.; de Aguiar, P. F.; Leite, S. G. F.; Rezende, C. M.; *Food Res. Int.* **2019**, 115, 487.
24. Tinoco, N. A. B.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2020.
25. Silva, A. C. R.; Garrett, R.; Rezende, C. M.; Meckelmann, S. W.; *J. Food Comp. Anal.* **2022**, 111, 104587
26. Lima, F. A.; *et al.*; *ACS Omega* **2020**, 5, 25712.

27. Lima, F. A.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2022.
28. Wagemaker, T. A. L.; Carvalho, C. R. L.; Maia, N. B.; Baggio, S. R.; Guerreiro Filho, O.; *Ind. Crops Prod.* **2011**, 33, 469.
29. Brand, A. L. M.; *et al.*; *Food Rev. Int.* **2022**, 39, 4761.