

ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDATIVAS NA PRESERVAÇÃO DA QUALIDADE DO CAFÉ EM AMBIENTE REFRIGERADO¹

Giselle Figueiredo de Abreu²; Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa³; Marcelo Ribeiro Malta⁴; Cristiane Carvalho Pereira⁵; Flávio Meira Borém⁶; Stefânia Vilas Boas Coelho⁷; Pedro Henrique Assis Sousa⁸

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Pesquisa Café, Embrapa Café e INCT Café.

² Professora do UNICERP – Patrocínio, Patrocínio-MG, gfigueiredoabreu@hotmail.com

³ Pesquisadora, Embrapa Café, Lavras-MG, sttela.rosa@embrapa.br

⁴ Pesquisador EPAMIG, Lavras-MG, marcelomalta@epamig.ufla.br

⁶ Doutoranda Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, cristianecpe@gmail.com.br

⁷ Professor titular, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, flavioborem@deg.ufla.br

⁸ Pesquisadora, Dra., Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, stefaniavbc@gmail.com

⁷ Mestrando, Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, pedrohenriqueassissousa@gmail.com

RESUMO: Objetivou-se neste trabalho investigar a relevância da expressão de enzimas do processo antioxidativo na conservação da qualidade do café natural e café despulpado durante o armazenamento. Os cafés foram colhidos no estágio de maturação cereja e secados até 11% de umidade (bu) após processamento por via seca (natural) e por via úmida (despulpado). Após a secagem, parte dos grãos foi beneficiada e outra parte mantida em coco ou em pergaminho. Em seguida os grãos foram armazenados em condições controladas de ar refrigerado (10°C e umidade relativa de 50%) e em ambiente com temperatura controlada de 25°C, por período de 12 meses. A expressão das enzimas catalase, esterase e peroxidase foi avaliada nos grãos dos cafés antes e após três, seis e doze meses de armazenamento por meio de expressão em gel de eletroforese. Estes resultados foram comparados ao perfil sensorial e fisiológico das amostras. Constatou-se que a expressão das enzimas do processo antioxidativo está associada com alterações na qualidade dos grãos de café. O café natural obtido pelo processamento via seca é mais sensível às alterações bioquímicas do que os processados por via úmida, revelado pela maior expressão da enzima catalase. O efeito benéfico da refrigeração do ar de armazenagem na preservação da qualidade do café é evidenciado pela maior expressão das enzimas catalase, peroxidase e esterase, após seis meses. A expressão das enzimas do processo antioxidativo está associada ao efeito protetor da presença do pericarpo no café natural e do endocarpo no café despulpado, indicando que o beneficiamento é prejudicial à conservação da qualidade dos grãos.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea arabica* L. Pós-colheita. Catalase. Esterase. Peroxidase.

ACTIVITY OF ANTIOXIDATIVE ENZYMS IN PRESERVATION OF COFFEE QUALITY IN COOLED ENVIRONMENT

ABSTRACT: The objective of this study was to investigate the relevance of the antioxidant process enzyme expression in the conservation of the quality of natural coffee and pulped coffee during storage. The coffees were harvested at the cherry stage and dried to 11% moisture (bu) after dry (natural) and wet (pulped) processing. After drying, part of the grain was processed and part kept in coconut or parchment. Then the grains were stored under controlled conditions of refrigerated air (10°C and 50% relative humidity) and in an environment with controlled temperature of 25°C, for a period of 12 months. The enzymatic expression of catalase, esterase and peroxidase enzymes was evaluated in coffee beans before and after three, six and twelve months of storage by electrophoresis gel expression. These results were compared to the sensory and physiological profile of the samples. It was found that the expression of antioxidant enzymes is associated with changes in coffee bean quality. Natural coffee obtained by dry processing is more sensitive to biochemical changes than those processed by wet, revealed by the higher expression of the catalase enzyme. The beneficial effect of storage air cooling on coffee quality preservation is evidenced by the higher expression of catalase, peroxidase and esterase enzymes after six months. The expression of antioxidant enzymes is associated with the protective effect of the presence of pericarp in natural coffee and endocarp in pulped coffee, indicating that processing is detrimental to the conservation.

KEY WORDS: *Coffea arabica* L., Postharvest. Catalase. Esterase. Peroxidase

INTRODUÇÃO

Na pós-colheita do café, os grãos estão sujeitos a inúmeras alterações físicas, fisiológicas e bioquímicas, as quais podem interferir negativamente na qualidade sensorial (BORÉM et al., 2013, 2014). Esses eventos podem causar a deterioração dos grãos e sementes, promovendo a produção de espécies reativas de oxigênio, degradação e inativação de enzimas, redução da atividade respiratória e a perda de integridade das membranas celulares (SHARMA et al., 2012; VIDIGAL et al., 2009). O avanço do processo deteriorativo pode ser detectado por alterações na expressão de sistemas enzimáticos em grãos e sementes quando submetidas a condições de estresse, como ocorre durante o armazenamento

(DUSSERT et al., 2006; SHARMA et al., 2012). Análises bioquímicas podem, portanto, prover marcadores da deterioração, contribuindo para garantir a conservação da qualidade de grãos e sementes de café ao longo do armazenamento. As principais enzimas envolvidas no sistema de proteção contra a deterioração são as catalases, peroxidases, superóxido dismutases, dentre outras enzimas antioxidativas, as quais atuam como removedoras de “espécies reativas de oxigênio” (BERJAK, 2006). Essas espécies, conhecidas como radicais livres causam alterações funcionais em membranas, promovendo a peroxidação de lipídios, inativação de enzimas e a degradação de ácidos nucleicos.

Durante a pós-colheita os grãos de café estão sujeitos ao estresse causado pelas operações de beneficiamento, realizado mecanicamente para a remoção do pericarpo, no caso do café natural, e do endocarpo, no caso do café despulpado. Esta operação pode causar trincas ou danos latentes, que serão evidenciados posteriormente, durante o armazenamento. Estes danos mecânicos podem provocar a desestruturação de membranas celulares e desorganização celular, promovendo a redução na qualidade (SELMAR; BYTOF; KNOPP, 2008).

Normalmente, os grãos de cafés são armazenados após o beneficiamento, sendo que as condições de armazenamento em grande escala são realizadas em modelos convencionais, utilizando sacos de juta e em ambiente com temperatura e umidade relativa não controlados. Portanto, os grãos ficam expostos a condições de estresse durante o armazenamento. Uma alternativa para reduzir ou evitar o estresse causado aos grãos nesta etapa é a refrigeração da massa de grãos, que tem mostrado resultados positivos na qualidade dos grãos (RIGUEIRA et al., 2009). Neste trabalho investigou-se a relevância da expressão de isoenzimas do processo oxidativo na conservação da qualidade de grãos de café submetidos a diferentes tipos de processamento e de beneficiamento e diferentes condições de armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se grãos de *Coffea arabica* L. cv, Catuaí Amarelo, obtidos de lavoura da Fazenda Experimental da Fundação Procafé, no município de Varginha, MG. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação cereja e submetidos a dois tipos de processamentos, via seca e via úmida. Parte dos frutos selecionados foi submetida imediatamente à secagem (café natural) e outra parte foi secada após descascamento mecânico e retirada da mucilagem por fermentação em água durante 24 horas (café despulpado).

Os cafés foram secados até a meia seca em telas de polietileno disposta de maneira suspensas e revolvidos 12 vezes ao dia, até que atingissem umidades de 30% bu (base úmida), no café natural, e de 25% bu, no café despulpado. A partir da meia-seca, os cafés foram transferidos para secadores mecânicos de camada fixa, onde a temperatura da massa de grãos foi mantida em 35°C e monitorada constantemente por meio de termômetro de mercúrio, até a umidade de 11 % bu.

Após secagem, parte dos grãos foi beneficiada no descascador conjugado para limpeza, benefício e ventilação PA-DESC da empresa Palini&Alves, e a outra parte não foi beneficiada. Os grãos de café foram embalados em sacos de polipropileno Jutex® e armazenados por 12 meses em dois ambientes, em câmara fria com controle de temperatura e umidade relativa (10 °C, 50% UR) e em sala de armazenamento com temperatura constante de 25 °C, sem controle da umidade relativa do ar. No momento das avaliações, os grãos de café armazenados sem beneficiamento foram beneficiados manualmente para evitar danos.

Antes e após três, seis e doze meses de armazenamento, foram coletadas amostras de todos os tratamentos, as quais foram mantidas em *deepfreezer* (-80°C) até a realização da análise eletroforética de isoenzimas. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e mantidas em -80 °C até o momento das análises.

Para a extração das enzimas esterase, catalase e peroxidase utilizou-se metodologia descrita por Alfenas (2006). A corrida eletroforética ocorreu em sistema de géis de poliacrilamida. Os géis foram revelados para as enzimas esterase, catalase, álcool desidrogenase e peroxidase, conforme Alfenas (2006). A avaliação dos padrões enzimáticos foi feita de maneira qualitativa de acordo com a presença e intensidade das bandas, utilizando-se um transiluminador.

Os resultados obtidos na análise eletroforética de isoenzimas foram comparados ao perfil sensorial dos cafés, realizado de acordo com a metodologia proposta por Lingle (2011) e ao perfil fisiológico dos grãos, avaliado pelo teste de germinação, de acordo com as Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 observa-se a expressão da enzima catalase nos grãos de café submetidos aos diferentes tipos de processamento e beneficiamento e diferentes condições de armazenamento. Nota-se maior expressão da enzima catalase no café natural, em comparação com o café despulpado. Em outros estudos também foi detectada maior expressão enzimática da catalase, coincidente com pior qualidade fisiológica em grãos de café processados por via seca, comparado aos processados por via úmida (TAVEIRA et al., 2012), indicando maior requisição da enzima frente ao evento deteriorativo. Ao longo do armazenamento observou-se a redução da expressão da enzima catalase, principalmente no café natural armazenado nas condições de 25 °C. Estes resultados podem estar associados com o nível de deterioração, já que nestes tratamentos observa-se baixo desempenho fisiológico e sensorial ao longo do armazenamento quando comparado aos grãos processados por via úmida (Figura 2 e 3), sugerindo que o armazenamento do café natural sob temperatura de 25 °C pode propiciar avanço do processo deteriorativo dos grãos.

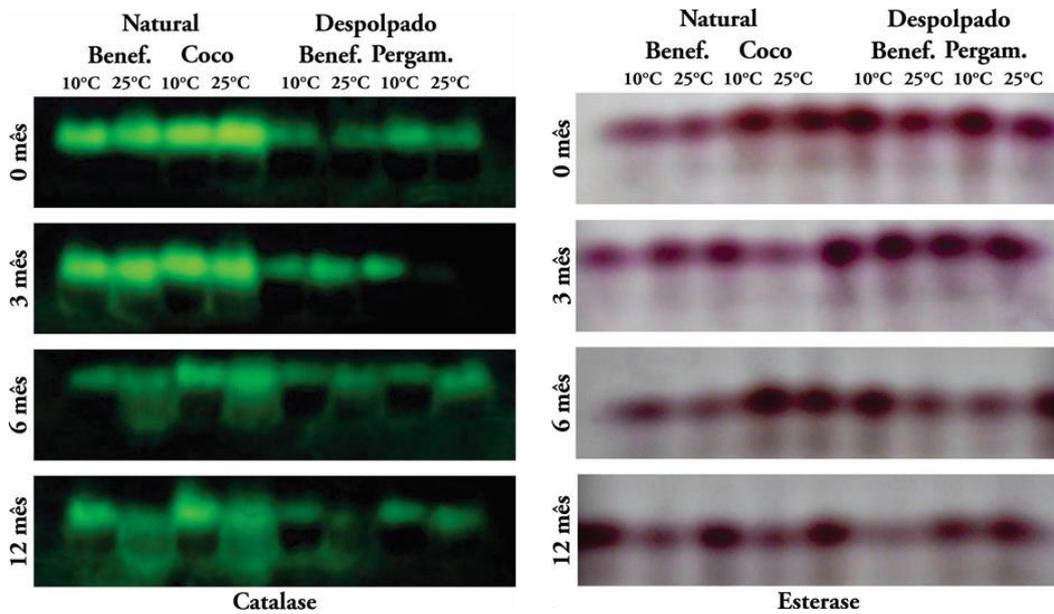


Figura 1 - Perfil eletroforético de isoenzimas da Catalase (CAT) e Esterase (EST) em grãos de café processados por via seca (café natural) e por via úmida (despolpado), armazenados beneficiados ou não, por 12 meses em diferentes condições.

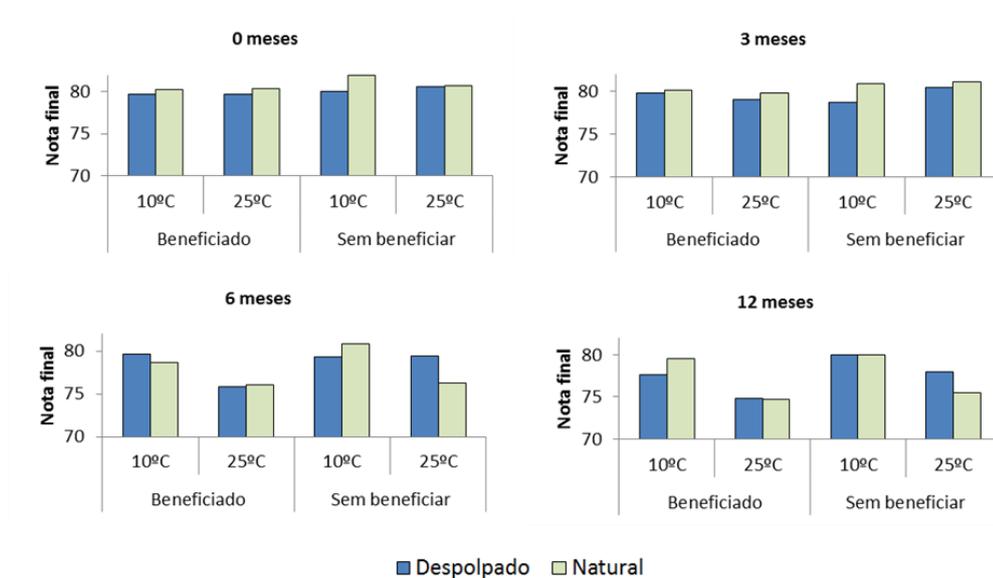


Figura 2 - Perfil sensorial dos grãos de café processados por via úmida (café despolpado) e por via seca (café natural), armazenados beneficiados ou não, por 12 meses em diferentes condições.

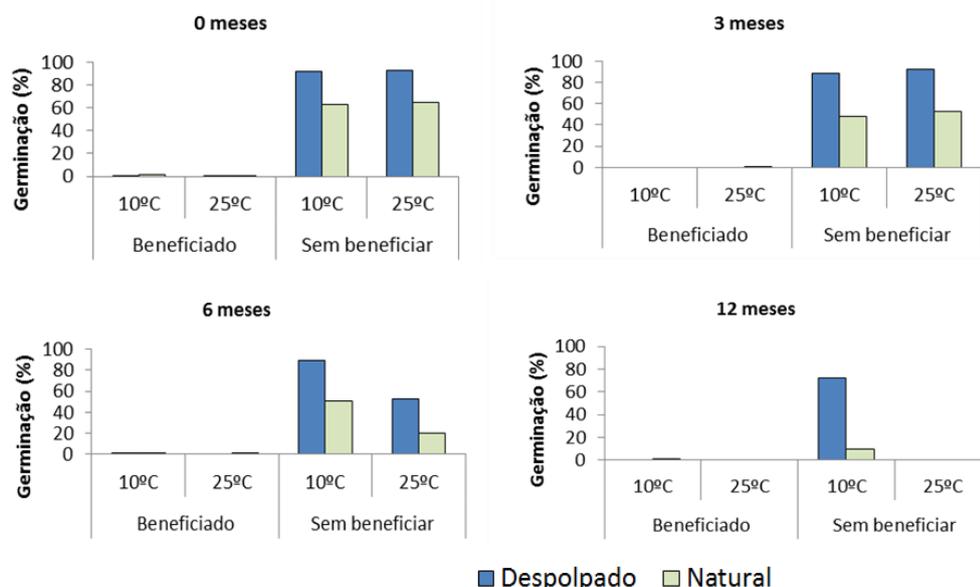


Figura 3 - Perfil fisiológico dos grãos de café, por meio do teste de germinação, processados por via úmida (café despulpado) e por via seca (café natural), armazenados beneficiados ou não, por 12 meses em diferentes condições.

O café beneficiado mecanicamente apresentou menor expressão da catalase, quando comparado aos grãos não beneficiados, durante o armazenamento. Ao associar este resultado com o perfil fisiológico, nota-se que a germinação dos grãos beneficiados e armazenados foi nula, desde a primeira época de avaliação. No perfil sensorial também foi notado maior redução da qualidade nos cafés armazenados beneficiados, nos dois processamentos (Figura 3).

Dessa maneira, a menor expressão da CAT pode ser explicada pelo fato de que estes grãos já estão em estado de deterioração avançado, provavelmente pela presença de danos mecânicos causados pelo beneficiamento, afetando a síntese de enzimas (SHARMA et al., 2012). Já nos cafés armazenados sem beneficiamento, a presença do pericarpo (casca) pode ter favorecido a conservação da qualidade ao longo do armazenamento. Ressalta-se que, esses grãos não apresentavam danos mecânicos, uma vez que foram beneficiados manualmente, antes da avaliação.

Para os grãos de café despulpados não foram observadas grandes diferenças na expressão da enzima catalase, possivelmente por que o café processado por via úmida é menos sensível às alterações causadas pelas etapas de pós-colheita quando comparado ao café natural (MALTA et al., 2013; SAATH et al., 2014; TAVEIRA et al., 2012).

Em relação às condições de armazenamento (10 °C, UR 50% e 25 °C), observou-se maiores diferenças a partir de seis meses de armazenamento (6 meses), com maior expressão enzimática da CAT nos cafés armazenados em temperatura de 25 °C, sem controle da UR em comparação aos grãos de café armazenados em ambiente refrigerado (10 °C, UR de 50%). Contudo, essa situação foi mais evidente nos cafés processados por via seca, o que foi também, observado nos resultados da análise sensorial (Figura 3).

Para a enzima Esterase (EST) observou-se, de maneira geral, maior expressão enzimática em grãos de café, antes do armazenamento (tempo zero de avaliação) ou nos primeiros meses de armazenamento, com redução da expressão dessa enzima ao longo do armazenamento (Figura 1), assim como foi observado na avaliação da qualidade sensorial (Figura 3). Em outras espécies também foi constatada maior intensidade das bandas e atividade da enzima esterase antes do armazenamento e a diminuição da intensidade das bandas e atividade da enzima com o avanço do processo de deterioração ao longo do armazenamento (PADILHA et al., 2001; SANTOS; MENEZES; VILELA, 2004).

Observou-se também diferenças no perfil eletroforético da enzima esterase em relação ao tipo de processamento, com maior expressão da enzima no café natural não beneficiado no início do armazenamento, quando comparado com os cafés submetidos ao beneficiamento. Observou-se também maior expressão da enzima nos cafés não beneficiados e armazenados a 10 °C a partir dos seis meses de armazenamento, ressaltando o efeito benéfico da temperatura mais baixa do ar e da presença do pericarpo protegendo os grãos.

Já nos grãos processados por via úmida (despulpado), nota-se no início do armazenamento um padrão similar da expressão da EST entre os tratamentos. Contudo, a partir dos 6 meses de armazenamento é observada redução da expressão enzimática em grãos de café beneficiados e armazenados em temperatura de 25 °C em relação aos outros tratamentos. Por outro lado, não houve alteração da expressão da enzima quando o café despulpado foi armazenado em ar refrigerado (10 °C), independentemente do beneficiamento.

Os cafés com maior expressão da enzima esterase, os quais não foram submetidos ao beneficiamento e foram armazenados em temperatura constante de 10 °C, também apresentaram melhor desempenho fisiológico (Figura 2). Esta relação entre a expressão da enzima e a qualidade fisiológica dos grãos de café também foi observada por Brandão Júnior et al. (2002), que relataram diminuição do número de bandas e intensidade da enzima esterase com a perda da viabilidade das sementes de café, corroborando os resultados obtidos neste trabalho.

Com relação à enzima peroxidase é possível observar aumento da expressão enzimática ao longo do armazenamento (Figura 4). Esta enzima está associada à oxidação por peróxidos, promovendo a desintoxicação celular ao remover o peróxido de hidrogênio. Este é um importante mecanismo de defesa em organismos vegetais (HAN; LIU; YANG, 2009; MOUSSA; ABDEL-AZIZ, 2008). Antes do armazenamento observou-se menor expressão da peroxidase no café despulpado e submetido ao beneficiamento mecânico em comparação aos demais tratamentos (Figura 4).

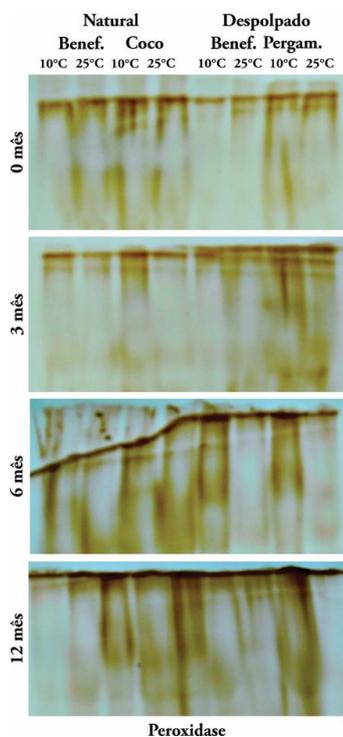


Figura 4 - Perfil eletroforético da isoenzima Peroxidase (PO) em grãos de café processados por via seca (café natural) e por via úmida (despulpado), armazenados beneficiados ou não, por 12 meses em diferentes condições.

Nos grãos de café despulpado, é possível observar maior expressão enzimática da peroxidase, a partir do sexto mês de armazenamento em condições refrigeradas (10 °C e UR 50%), em relação aos grãos armazenados em temperatura mais alta, independentemente do tipo de beneficiamento. Já no café natural, a maior expressão da enzima ocorreu em cafés não beneficiados (em coco) e armazenados em temperatura mais baixa, de 10 °C, e com umidade relativa controlada de 50%. Nos dois processamentos, os cafés que tiveram maior expressão da peroxidase também possuíam melhor desempenho fisiológico. Resultados semelhantes foram encontrados por diversos autores, os quais observaram maior expressão enzimática da peroxidase em cafés com qualidade fisiológica superior (SAATH et al., 2014; TAVEIRA et al., 2012), já que a perda da sua atividade pode tornar a semente mais sensível aos efeitos de O₂ e radicais livres sobre os ácidos graxos insaturados de membrana. Esta situação provoca a degeneração de membranas e o comprometimento fisiológico de grãos e sementes.

CONCLUSÕES

1. A expressão de enzimas antioxidativas está associada à deterioração de grãos de café.
2. Grãos de café obtidos pelo processamento via seca são mais sensíveis que os processados via úmida, às alterações bioquímicas no processo deteriorativo, revelado pela maior expressão das enzimas catalase.
3. O efeito benéfico da conservação de grãos de café em ambiente refrigerado é evidenciado pela maior expressão das enzimas catalase e peroxidase, a partir de seis meses de armazenamento.
4. A proteção do endosperma, pela presença do pericarpo ou do endocarpo é benéfica à manutenção da qualidade e está relacionada à expressão de enzimas antioxidativas.

AGRADECIMENTOS

A UFPA, CAPES, FAPEMIG, CNPQ e Fundação Procafé.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C (2006). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV. 627 p.
- BERJAK, P (2006). Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Sci. Res.**16:1-15. <http://dx.doi.org/10.1079/SSR2005236>
- BORÉM, F.M.; ISQUIERDO, E.P.; OLIVEIRA, P.D.; RIBEIRO, F.C.; SIQUEIRA, V.C.; TAVEIRA, J.H.S. (2014). Effect of intermittent drying and storage on parchment coffee quality. **Biosci. J.**,30:609-616. Supl. 2.
- BORÉM, F.M.; RIBEIRO, F.C.; FIQUEIREDO, L.P.; GIOMO, G.S.; FORTUNATO, V.A.; ISQUIERDO, E.P. (2013). Evaluation of the sensory and color quality of coffee beans stored in hermetic packaging. **J. Stored Prod. Res.**52:1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2012.08.004>
- BRANDÃO JÚNIOR D.S.; VIEIRA, M.G.G.C.; HILHORST, H.W.M. (2002). Tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Rev. Bras. Sementes** [online]. 24(2):17-23. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222002000100004>.
- BRASIL. (2009) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**.pp. 395.
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL (2005) **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville; American Society of Plant Physiologists, 451 p.
- DUSSERT, S.; DAVEY, M.W.; LAFFARGUEL, A.; DOULBEAU, S; SWENNEN, R.; ETIENNE, H. (2006). Oxidative stress, phospholipids loss lipid hydrolysis during and storage of termediate seeds. **Physiol. Plant.**127(2):192-204. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00666.x>
- HAN, C.; LIU, Q.; YANG, Y. (2009). Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Piceaasperata* seedlings. **Plant Growth Regul.** 58(2):153–162. <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-009-9363-2>
- MALTA, M. R.; ROSA, S.D.V.F.; LIMA, P.M.; FASSIO, L.O.; SANTOS, J.B. (2013). Alterações na qualidade do café submetido a diferentes formas de processamento e secagem. **Engenharia na Agricultura.** 21 (5): 431-440. <http://dx.doi.org/10.13083/1414-3984.v21n05a01>
- MOUSSA, R.; ABDEL-AZIZ, S. M. (2008). Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. **Aust. J. Crop Sc.** (1):31–36.
- PADILHA, L.; VIEIRA, M. G. G. C.; VON PINHO, E. V. R.; CARVALHO, M. L. M. (2001) Relação entre o teste de deterioração controlada e o desempenho de sementes de milho em diferentes condições de estresse. **Rev. Bras. Sementes.** 23:198-204. <http://dx.doi.org/10.17801/0101-3122/rbs.v23n1p198-204>
- RIGUEIRA RJA, LACERDA FILHO AF, VOLK MBS (2009) Avaliação da qualidade do feijão armazenado em ambiente refrigerado. **Alim.Nutr.** 20(4):649-655.
- SAATH, R.; BROETTO, F.; BIAGGIONI, M. A.; BORÉM, F. M.; ROSA, S. D. V. F.; TAVEIRA, J. H. S. (2014) Activity of some isoenzymatic systems in stored coffee grains. **Ciênc. e Agrotec.** 38(1):15-24. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000100002>
- SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A (2004) Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Rev. Bras. Sementes.** 26:110-119.<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222004000100017>
- SANTOS, M. A.; CHALFOUN, S. M.; PIMENTA, C. J (2009). Influência do processamento por via úmida e tipos de secagem sobre a composição, físico química e química do café (*Coffea arabica* L.). **Ciênc. e Agrotec.** 33:213-218.
- SELMAR, D.; BYTOF, G., KNOPP, S. E. (2008). The storage of green coffee (*Coffea arabica*): Decrease of viability and changes of potential aroma precursors. **Ann. Bot.**101:31-38. DOI: 10.1093/aob/mcm277 PMID: PMC2701840
- SHARMA, P., JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany** 2012:1- 26. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/217037>
- TAVEIRA, J. H. S.; ROSA, S. D. V. F.; BORÉM, F. M.; GIOMO, G. S.; SAATH, R. (2012) Perfis proteicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesq. Agropec. Bras.** 47(10):1511-1517. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012001000014>.
- VIDIGAL, D.S.; DIAS, D. C. F. S.; VON PINHO, E. V. R.; DIAS, L. A. S. (2009) Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicumannuum* L.). **Rev. Bras. Sementes** 31(2):129-136. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222009000200015>
- ZHANG, M.; MAEDA, Y.; FUTIHATA, Y.; NORRAMURA, Y.I.; ESASHI, Y. (1994) A mechanism of seed deterioration in relation to volatile compounds evoked by dry seeds themselves. **Seed Sci. Res.** 4(1):49-56..