

## INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO E DA TORREFAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO CAFÉ (*Coffea arabica*)

**Marcelo Henrique dos Santos\* e Bruno Lemos Batista**

Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, 37130-000 Alfenas - MG, Brasil

**Stella Maris da Silveira Duarte**

Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, 37130-000 Alfenas - MG, Brasil

**Celeste Maria Patto de Abreu**

Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras - MG, Brasil

**Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa**

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, 37130-000 Alfenas - MG, Brasil

Recebido em 26/4/06; aceito em 9/8/06; publicado na web em 22/7/07

INFLUENCE OF PROCESSING AND ROASTING ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COFFEE (*Coffea arabica*). The aim of this work is to evaluate the influence of processing (semi-dry and dry) and roasting (light, medium and dark) on the antioxidant activity of coffee brews, using tests to determine the reducing power and the DPPH scavenging, Fe<sup>+2</sup> chelating and lipid peroxidation inhibition activities. All of the coffee brews presented concentration-dependent antioxidant activity. The light coffee samples presented the higher reducing power and DPPH scavenging activity. Its ion chelating capacity was similar to the medium samples, but was less than the green coffee chelating capacity. The semi-dry processing was more efficient than the dry processing only for the reducing power. All of the samples presented high lipid peroxidation inhibition activity. Based on the results the degree of coffee roasting seems to be more important than the processing to determine the antioxidant activity of brews.

Keywords: coffee processing; coffee roasting; antioxidant activity.

### INTRODUÇÃO

Os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN), derivados do metabolismo normal ou de origem externa, podem danificar vários tipos de macromoléculas celulares como lipídios, proteínas e DNA, que poderiam causar algumas doenças degenerativas, cardiovasculares e certos tipos de câncer<sup>1,2</sup>.

Os compostos antioxidantes protegem os sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos das ERO e ERN a diversos alvos celulares. O consumo de alimentos ricos em antioxidantes pode conferir proteção auxiliar contra o estresse oxidativo, além de fornecer co-fatores para enzimas antioxidantes endógenas<sup>3</sup>. Entre os compostos vegetais com atividade antioxidante, destacam-se os fenóis<sup>4</sup>. A principal classe de compostos fenólicos é representada por ácidos hidroxicinâmicos, encontrados em quase todas as plantas, sendo o principal representante o ácido caféico, que ocorre, em muitos alimentos, esterificado ao ácido quínico, sendo chamado de ácido clorogênico<sup>5,6</sup>. Além destes compostos destacam-se ainda os tocoferóis, tocotrienóis, carotenóides, ácido ascórbico e minerais, dentre eles Al, Ba, Ca, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P e Zn<sup>3,7</sup>.

O café, uma das bebidas mais consumidas, é a principal fonte de ácido clorogênico da dieta humana<sup>8</sup>. Assim, a atividade antioxidante da bebida de café pode ser determinada pela contribuição de substâncias antioxidantes de ocorrência natural e induzidas pela torrefação e processamento do café<sup>9</sup>. A torrefação pode levar à perda de polifenóis, devido à degradação térmica progressiva. Contudo, este efeito pode ser minimizado pela formação de produtos antioxidantes da reação de Maillard<sup>9-12</sup>. Outro fator a

ser considerado é o processamento do café após a colheita<sup>13</sup>. O processamento por via seca, o mais antigo e mais usado no Brasil, consiste de um estágio de secagem natural (ao sol) ou artificial (em estufa) do fruto, que em seguida é descascado mecanicamente. No método por via semi-úmida, o café é despulpado e a remoção da mucilagem é normalmente realizada por fermentação. A seguir, o café é seco e descascado mecanicamente<sup>13</sup>. O processamento pode, potencialmente, alterar algumas propriedades do café, porém, não há trabalhos sobre a avaliação da influência do processamento sobre a atividade antioxidante do café.

A avaliação antioxidante pode ser feita utilizando-se testes *in vitro* e *in vivo*<sup>14-16</sup>. Por definição, a atividade antioxidante é a capacidade de um composto inibir a degradação oxidativa<sup>16</sup>. Assim, a atividade antioxidante, especialmente a inibição de reação em cadeia, de produtos naturais e alimentos, tem sido um parâmetro importante na determinação do valor dietético dos mesmos. A atividade antioxidante pode ser avaliada pelo potencial antioxidante, que é determinado pela composição e propriedades dos constituintes e, ainda, pela atividade biológica, que depende da biodisponibilidade do antioxidante, entre outros fatores<sup>16</sup>.

Uma das atividades bastante desejadas dos antioxidantes é a inibição da peroxidação lipídica. Os lipídios contribuem para determinar a qualidade de certos produtos alimentares, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis (por ex., "flavor," cor, textura). Por outro lado, os lipídeos conferem valor nutritivo aos alimentos, constituindo-se em fonte de energia metabólica, de ácidos graxos essenciais e de vitaminas lipossolúveis. Devido à sua abundância nas células e susceptibilidade à oxidação pela presença de grupos metilênicos entre duplas ligações, os ácidos graxos poliinsaturados são importantes alvos

\*e-mail: marcelo\_hs@yahoo.com.br

para os oxidantes<sup>1</sup>. Como essa oxidação desencadeia uma cascata auto-catalítica que gera numerosas substâncias oxidantes e genotóxicas, tais danos aos lipídios têm grandes implicações para a integridade do DNA, das proteínas e de outros lipídios<sup>1,17</sup>.

A peroxidação lipídica inicia-se pelo ataque à bicamada lipídica de qualquer espécie suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio bis-aliílico de um ácido graxo poliinsaturado. Após ser iniciado, o processo torna-se autocatalítico e somente termina quando se esgotarem as reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio<sup>17</sup>. Os principais produtos finais da lipoxidação compreendem álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos derivados da decomposição de hidroperóxidos<sup>1,17</sup> (Figura 1).

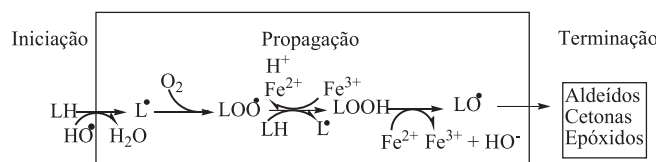


Figura 1. Representação das fases da peroxidação lipídica

Vários métodos são descritos na literatura para avaliação da peroxidação lipídica<sup>14-16</sup>, como a determinação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este teste avalia a formação de produtos finais da peroxidação lipídica, que podem ser potencialmente tóxicos para outras macromoléculas celulares<sup>16</sup>.

O teste de 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH) determina o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados ou presentes em alimentos e outras amostras biológicas. O teste do DPPH é baseado na capacidade do radical livre estável, 1,1-difenil-2-picrilidrazil, reagir com compostos doadores de H<sup>•</sup>, o que pode interromper as reações oxidativas em cadeia. O DPPH pode reagir com compostos fenólicos<sup>18</sup>, bem como com ácidos aromáticos contendo apenas um grupamento<sup>19</sup>, mas não reage com flavonóides<sup>18</sup>.

Os métodos baseados na redução do Fe<sup>+3</sup>, que determinam o poder redutor são também utilizados para avaliação da atividade antioxidante. Tais métodos avaliam a capacidade de compostos fenólicos reduzirem o Fe<sup>+3</sup>, com conseqüente formação de um complexo colorido com Fe<sup>+2</sup><sup>16</sup>.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante da bebida de café, utilizando testes para determinar o poder redutor e as atividades sequestrante de DPPH, quelante de Fe<sup>+2</sup> e de inibição da peroxidação lipídica.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Obtenção das amostras de café

As amostras de café (*Coffea arabica* L.) cultivar Mundo Novo, peneira 17/18, foram fornecidas pela Ipanema Agrícola S.A. (Alfenas, MG, Brasil). Foram utilizados frutos cereja sem defeitos, dos tratamentos semi-úmido (SU) e seco (S). As amostras foram torradas em torrador de laboratório com capacidade de 1 kg, em graus de torrefação claro, médio e escuro. O ponto de torrefação foi determinado visualmente, em 5 repetições. Em seguida, os grãos torrados foram moídos (moedor elétrico Raiar, modelo RA21) em granulometria fina, empacotados em embalagens de polietileno/alumínio/polipropileno, seladas a vácuo e estocada a -20 °C até o preparo da bebida.

### Preparo da bebida

Para o preparo da bebida, 10 g de café em pó foram colocados

sobre um filtro de papel Whatman N. 3. Em seguida, 100 mL de água deionizada a 90 °C foram vertidos sobre o pó<sup>10</sup>.

### Caracterização do café

#### Determinação do grau de torrefação

A cor do café torrado e moído foi determinada, em triplicata, usando-se colorímetro (Chromameter-2 Reflectance, Minolta, Osaka, Japan) acoplado a processador de dados (OP-300), antes do preparo da bebida. O instrumento foi padronizado contra um branco antes de cada leitura. A cor foi expressa em parâmetros da escala CIE ("Commision Internationale de Eclairage") L\*, a\*, b\*. O parâmetro L\* indica luminosidade que diminui com o aumento do grau de torrefação, já os parâmetros a\* e b\* (coordenadas de cromaticidade) indicam as direções das cores dos estágios do processo de torração onde +a\* indica cor vermelha, -a\* verde, +b\* amarela e -b\* azul.

#### Avaliação espectrofotométrica da bebida de café

A bebida de café foi diluída (quatro vezes) em água deionizada e utilizada para obtenção do espectro de varredura entre 280 e 420 nm. Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer FTIR 1000, na região de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>, utilizando-se pastilhas KBr. As análises de IV foram realizadas no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. Foram feitas medidas em triplicata.

#### Determinação do caráter aromático

Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mabry *et al.*<sup>20</sup>, com modificações. As amostras da bebida de café na concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup>, após filtração, foram diluídas em etanol, obtendo-se a concentração de 0,32 mg mL<sup>-1</sup>. Para cada amostra, foi obtido o espectro de varredura entre 200 a 400 nm; em seguida, na própria cubeta, foram adicionados 0,1 mL de AlCl<sub>3</sub> a 5% (p/v) e obteve-se o segundo espectro de varredura entre 200 a 400 nm. Foram adicionados 0,1 mL de HCl (10% v/v) e obteve-se o terceiro espectro de varredura. O segundo teste foi feito do mesmo modo, utilizando-se nova amostra. O primeiro espectro de varredura foi obtido sem a adição de reagentes. O segundo espectro de varredura foi obtido após a adição de 0,1 mL de acetato de sódio saturado a 3% (p/v) e o terceiro espectro após a adição de 0,1 mL de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> a 5% (p/v). Foram feitas medidas em triplicata.

#### Perfil cromatográfico da bebida de café

O perfil cromatográfico da bebida de café foi obtido utilizando-se cromatoplacas de sílica-gel GF<sub>254</sub> (Merck). Um volume de 0,05 mL de cada amostra foi aplicado e utilizou-se acetato de etila/ácido acético glacial/etanol (85:5:10 v/v/v) como fase móvel. O tempo de saturação da cuba foi de 2 h e o tempo de corrida foi de, aproximadamente, 20 min. Foram utilizados três reveladores: solução etanólica de DPPH (0,04% p/v); ferrocianeto de potássio 2% (p/v) e cloreto férrico 0,1% (p/v); Dragendorff iodado. Foram utilizados 0,05 mL de ácido ascórbico a 0,2 mg mL<sup>-1</sup> como padrão.

### Avaliação da atividade antioxidante

#### Avaliação do poder redutor

A avaliação do poder de redução da bebida de café foi realizada de acordo com a metodologia citada por Yen e Chen<sup>21</sup>, com modificações. As amostras da bebida de café foram diluídas, obtendo-se as seguintes concentrações: 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 mg mL<sup>-1</sup> e transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL de cada amostra, para tubos

de ensaio de 25 mL. A esta alíquota foram adicionados: 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 mL de  $K_3[Fe(CN)_6]$  a 1% (p/v). A mistura foi incubada a 45 °C por 20 min. Foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (p/v) à solução no tubo de ensaio, com posterior agitação. Um volume de 2,5 mL da mistura foi transferido para outro tubo de ensaio, no qual foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de  $FeCl_3$  a 0,1% (p/v), sob agitação. A leitura da absorbância foi realizada a 700 nm. A elevada absorbância indica grande poder redutor. As leituras foram realizadas em triplicata e neste teste utilizou-se como 100% de atividade a absorbância do padrão de BHT nas concentrações referidas para as amostras (0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 mg mL<sup>-1</sup>).

#### Atividade seqüestrante de radicais livres DPPH\*

A atividade seqüestrante de radicais livres DPPH (ASRL) da bebida de café foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Hatano *et al.*<sup>22</sup>, com modificações. Cada amostra foi diluída em etanol a 25; 50; 0,100 e 200 µg mL<sup>-1</sup>. Em 4 mL da amostra adicionou-se 1 mL de DPPH (0,5 mmol L<sup>-1</sup>) igualmente diluído em etanol. A mistura foi acondicionada em tubo de ensaio âmbar e agitada. Decorridos 30 min, fez-se a leitura a 517 nm. A baixa absorbância indica atividade seqüestrante de radicais livres. Os testes foram realizados em triplicata. A atividade seqüestrante (% ASRL) foi expressa em porcentagem por comparação ao controle, ácido ascórbico (200 µg mL<sup>-1</sup>), segundo a Equação:

$$\% \text{ ASRL} = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100$$

onde, Ac: absorbância controle ; At: absorbância teste (amostra).

#### Avaliação da atividade quelante de íons Fe<sup>2+</sup>

A atividade quelante de íons Fe<sup>2+</sup> foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Tang *et al.*<sup>23</sup>, com modificações. Cada amostra foi diluída em etanol, obtendo-se a concentração de 1,0 mg mL<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 1 mL das amostras foi transferida para tubos de ensaio âmbar de 25 mL. A esta alíquota foram adicionados 3,7 mL de água deionizada; 0,1 mL de  $FeSO_4$  ( $Fe^{2+}$ ) 2 mM e 0,2 mL de ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-bis(4-ácido fenil-sulfônico)-1,2,4-triazina; reagente cromogênico) 5 mM. A mistura foi agitada e após 20 min feita a leitura a 562 nm. A baixa absorbância indica atividade quelante. Os testes foram realizados em triplicata e utilizou-se EDTA (200 mg mL<sup>-1</sup>) como controle. A atividade do controle foi considerada 100% e a atividade quelante (%AQ) das amostras foi calculada segundo a Equação:

$$\% \text{ AQ} = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100$$

onde, Ac: absorbância controle; At: absorbância teste (amostra).

#### Determinação da inibição da peroxidação lipídica in vitro

A peroxidação lipídica foi determinada pela medida dos pro-

duto de oxidação que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Buege e Aust<sup>24</sup>. Os produtos da peroxidação de lipídios (peróxidos lipídicos, dialdeído malônico e outros aldeídos de baixo peso molecular) reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), produzindo bases de Schiff. Esses compostos são coloridos e sua concentração pode ser determinada por espectrofotometria a 535 nm.

Para este ensaio, foram utilizados ratos adultos machos Wistar (*Ratus norvegicus*) pesando 270 ± 20 g obtidos do biotério da Universidade Federal de Alfenas. Após a eutanásia por aprofundamento da anestesia, os cérebros dos animais foram retirados, pesados e homogeneizados com PBS 0,1M, pH 7,2 (volume equivalente a 4 vezes o peso fresco de tecido), em homogeneizador de tecidos e banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 3000 g, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, mantido em banho de gelo e utilizado nos ensaios. Alíquotas de 490 µL de homogeneizado de cérebro foram incubadas com 10 µL da bebida de café em diferentes concentrações (0,2; 2,0 e 20,0 mg mL<sup>-1</sup>) ou BHT a 37 °C, por 30 min. Tubos sem adição de bebida de café ou BHT foram utilizados como controle. Decorrido o tempo foram adicionados 500 µL de HCl a 25% (v/v), 500 µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (p/v, em NaOH 0,05M) e 45 µL de BHT 2% (p/v, em etanol). A mistura foi incubada em banho-maria a 98 °C por 15 min. Após o resfriamento em banho de gelo por 10 min foram adicionados 1,5 mL de butanol e as amostras foram agitadas vigorosamente em vórtex. A seguir, foram centrifugadas a 3000 g, por 5 min e a fração contendo butanol (superior) foi coletada e utilizada para determinação da absorbância a 535 nm. A concentração de TBARS foi calculada utilizando-se curva padrão de dialdeído malônico (MDA; 1,1,3,3-tetraetóxi-propano). A inibição da peroxidação lipídica foi calculada segundo a Equação:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100$$

onde, Ac: absorbância controle; At: absorbância teste (amostra).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do grau de torrefação foram expressos na Tabela 1. Observa-se que a cor do café mostrou-se diferente nos graus claro, médio e escuro, porém, a cor em amostras de café semi-úmido (SU) e seco (S) com o mesmo grau de torrefação foi igual. Isto indica que foi obtido o mesmo grau de torrefação nos dois tipos de processamento, o que é importante quando se deseja comparar a influência da torrefação nas propriedades do café.

Analisando-se os resultados da Tabela 2 observa-se que o pH das bebidas aumentou com a torrefação. Contudo, não houve diferença significativa entre os dois tipos de processamento do café. Os resultados expressos estão de acordo com Daglia *et al.*<sup>12</sup>, que também observaram aumento de pH, o qual está, possivelmente,

**Tabela 1.** Avaliação colorimétrica do grau de torrefação do café de acordo com a escala CIE

Processamento	Torrefação	L*	a*	b*
Semi-úmido	Clara	36,25±0,03 aA	+12,41±0,23 bA	+8,52±0,03 cA
	Média	32,95±0,02 aB	+11,83±0,19 bB	+5,28±0,05 cB
	Escura	29,20±0,17 aC	+10,28±0,47 bC	+1,42±0,05 cC
Seco	Clara	35,84±0,05 aA	+12,37±0,49 bA	+8,87±0,12 cA
	Média	33,19±0,24 aB	+11,82±0,36 bB	+5,21±0,21 cB
	Escura	29,84±0,52 aC	+10,27±0,89 bC	+1,41±0,01 cC

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,001), pelo teste de Tukey; médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,001), pelo teste de Tukey.

associado à decomposição do ácido quínico formando quinol, pirogalol e outros compostos<sup>25</sup>.

**Tabela 2.** Determinação do pH da bebida preparada com café submetido a diferentes processamentos e graus de torrefação

Processamento	Torrefação	pH
Semi-úmido	Clara	4,69±0,02 A
	Média	4,84±0,02 B
	Escura	5,14±0,04 C
Seco	Clara	4,72±0,03 A
	Média	4,85±0,02 B
	Escura	5,13±0,03 C

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ), pelo teste de Tukey.

O teor dos sólidos solúveis totais encontrado em todas as amostras foi de 20,0 mg mL<sup>-1</sup>. Este resultado está de acordo com Fernandes *et al.*<sup>26</sup> e indica que foram comparadas amostras com o mesmo rendimento.

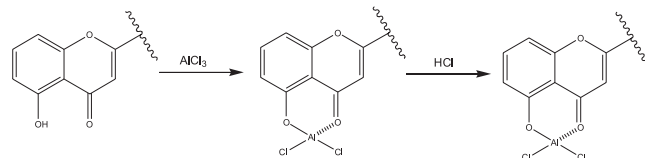
Alguns componentes do café verde (cru), tais como proteínas, peptídeos, aminoácidos aromáticos livres, trigonelina e cafeína, apresentam absorção em 280 nm, enquanto os ácidos clorogênicos absorvem em 320-325 nm. Tem sido relatado que outros componentes com absorção em 280 nm são formados durante a torrefação<sup>26</sup>. Entretanto, analisando-se a Tabela 3 verifica-se que o processamento parece também influenciar as modificações químicas decorrentes da torrefação, uma vez que nas amostras SU a torrefação clara e média não alterou significativamente a Abs<sub>280</sub>, enquanto que a torrefação escura diminuiu a absorção. Nas amostras S houve aumento significativo da Abs<sub>280</sub> com a torrefação.

A análise da absorção em 420 nm foi realizada para monitorar o desenvolvimento da cor marrom. Nota-se que o aumento do grau de torrefação aumentou a Abs<sub>420</sub>. De acordo com estudos Nicoli *et al.*<sup>10</sup> este aumento da absorção deve-se à formação de pigmentos marrons solúveis em água (Tabela 4).

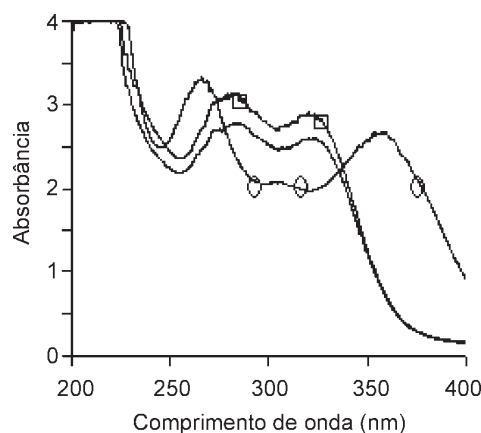
Na avaliação do caráter aromático pesquisou-se a presença de hidroxilas "PERI", características de flavonóides e de hidroxilas "ORTO", características de polifenóis, realizando-se varredura de 200 a 400 nm.

Com a adição de AlCl<sub>3</sub>, ocorre formação de um anel estável de 6 membros do átomo de alumínio com OH "PERI", resistente à ação de HCl (Figura 2). A Figura 3 apresenta os espectros da amostra pura,

após adição de AlCl<sub>3</sub> e de HCl. Nota-se que, após a adição de HCl, o anel se desfaz e o espectro da adição de HCl se assemelha ao da amostra pura, ou seja, este sistema praticamente não está presente nas amostras analisadas. A Figura 3 apresenta os resultados obtidos para a amostra com grau de torrefação claro processada por via seca, que representam os resultados obtidos para todas as amostras.



**Figura 2.** Formação do anel estável de 6 membros do Al<sup>3+</sup> com a "OH-PERI". A adição de HCl não induz a formação da estrutura original



**Figura 3.** Varredura espectrofotométrica de 200-400 nm da bebida preparada com café seco claro para pesquisa de "OH-PERI". Bebida pura (□), após adição de AlCl<sub>3</sub> (○) e após a adição de HCl (-)

Adicionando-se acetato de sódio ocorre a captação do H<sup>+</sup> da hidroxila "ORTO"; assim, o oxigênio com carga negativa pode reagir com H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> formando um anel de 5 membros (Figura 4). A Figura 5 apresenta os espectros da amostra pura, após adição de NaOAc e de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. A adição de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> modificou o espectro indicando a formação do anel. A Figura 5 apresenta os resultados obtidos para a amostra com grau de torrefação claro processada por via seca, que representa os resultados obtidos para todas as amostras.

**Tabela 3.** Espectrofotometria a 280 nm da bebida preparada com café submetido a diferentes processamentos e graus de torrefação

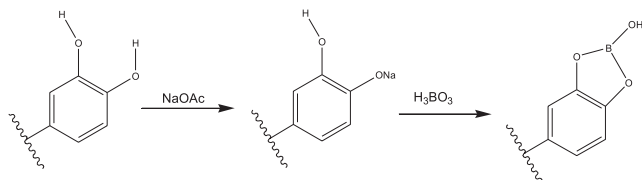
Processamento	Grau de torrefação			
	Verde	Claro	Médio	Escuro
Semi-úmido	1,81±0,01 aA	1,89±0,04 aA	1,89±0,07 aA	1,62±0,02 bA
Seco	1,13±0,01 aB	2,01±0,07 bA	1,81±0,05 bdA	1,64±0,01 cdA

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ), pelo teste de Tukey; médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ), pelo teste de Tukey.

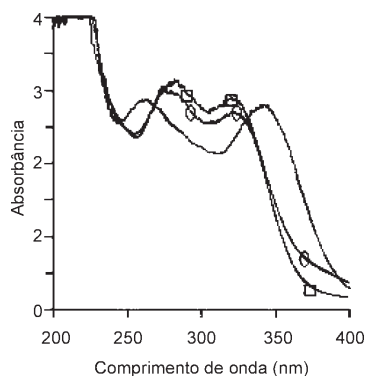
**Tabela 4.** Espectrofotometria a 420 nm da bebida preparada com café submetido a diferentes processamentos e graus de torrefação

Processamento	Grau de torrefação			
	Verde	Claro	Médio	Escuro
Semi-úmido	1,06±0,01 aA	1,72±0,01 bA	1,94±0,01 cA	2,06±0,01 dA
Seco	0,46±0,01 aB	1,83±0,01 bB	1,95±0,01 cA	2,19±0,01 dB

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ), pelo teste de Tukey; médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,001$ ), pelo teste de Tukey.



**Figura 4.** Ação do acetato e formação do anel de 5 membros com boro (“OH-ORTO”). A adição de  $H_3BO_3$  não induz a formação da estrutura original

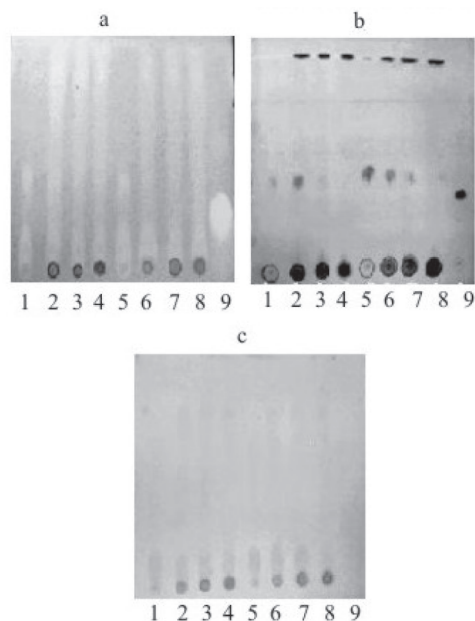


**Figura 5.** Varredura espectrofotométrica de 200-400 nm da bebida de café preparada com café seco claro para pesquisa de “OH-ORTO”. Bebida pura (□), após adição de NaOAc, (○) e após a adição de  $H_3BO_3$  (—)

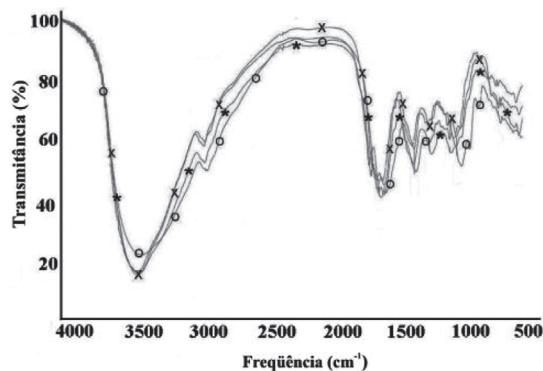
A cromatografia em camada delgada demonstrou substâncias antioxidantes com polaridades variadas, sendo as mais polares localizadas na parte inferior da cromatoplaça (Figura 6). As faixas na Figura 6a indicam locais de seqüestro de radicais DPPH. O ácido ascórbico (padrão) reage imediatamente com o DPPH, alcançando toda sua extensão em cerca de 15 s, assim como as amostras de café, indicando que as amostras apresentam atividade semelhante ao ácido ascórbico<sup>27</sup>. As manchas na Figura 6b indicam redução de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  revelado pela solução de  $FeCl_3$ , demonstrando a presença de substâncias redutoras de ferro nas amostras de café. O revelador Dragendorff iodado indica a presença de alcalóides, principalmente cafeína, visualizada pelas manchas evidentes na parte inferior da cromatoplaça (Figura 6c).

Os espectros das amostras de café após torrefação, na região do infravermelho, mostraram mudanças na intensidade das bandas de absorção quando comparados aos do café verde, principalmente nas bandas de 1700 e 1054  $cm^{-1}$ , que podem ser correspondentes a grupos carboxílicos de ácidos livres, nas amostras após torrefação e estiramento C-O, no café verde, respectivamente (Figura 7). Desta forma, a torrefação pode provocar a ruptura de ligações C-O dos ácidos clorogênicos, liberando o ácido quínico esterificado<sup>28</sup>. Por outro lado, este processo pode promover a liberação de ácidos carboxílicos, evidenciado pelo aumento da banda em 1700  $cm^{-1}$ . Nenhuma diferença significativa pôde ser verificada entre os três graus de torrefação no espectro no infravermelho.

O teste do poder redutor baseia-se na redução do íon ferricianeto a ferrocianeto que, na presença do íon férrico (proveniente do  $FeCl_3$ ), forma o azul da Prússia. A Tabela 5 apresenta os resultados do poder redutor. Nota-se que há aumento do poder redutor com a torrefação. Observa-se um alto poder de redução nas amostras com grau de torrefação claro a 5  $mg mL^{-1}$ , com valores superiores ao padrão, visto que a redução é dada tomando-se o BHT como 100%. Apesar do aumento do poder redutor com a torrefação, as amostras de grau escuro apresentaram menor poder redutor que as amostras com grau de torrefação claro, provavelmente devido ao diferente conteúdo de fenólicos nessas amostras, particularmente reduzidos após a torrefação<sup>29,30</sup>.



**Figura 6.** Cromatoplaças de sílica-gel da bebida preparada com café submetido a diferentes processamentos e graus de torrefação. Seco verde (1), seco claro (2), seco médio (3), seco escuro (4), semi-úmido verde (5), semi-úmido claro (6), semi-úmido médio (7), semi-úmido escuro (8) e padrão de ácido ascórbico (9). Revelação com DPPH (a), Ferricianeto/ $Fe^{3+}$  (b) e Dragendorff (c)



**Figura 7.** Espectros no infravermelho das amostras de café obtidas por processamento semi-úmido e diferentes graus de torrefação, utilizando pastilhas de KBr. Verde (○), claro (X), médio (★) e escuro (—)

Os radicais livres DPPH, que inicialmente apresentam cor roxa por possuírem elétron livre, perdem esta cor quando um radical hidrogênio doado por uma molécula antioxidante entra em ressonância com a molécula de DPPH, diminuindo-se, assim, a absorvância. O DPPH é um radical estável e com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. Assim sendo, apenas agentes redutores fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis em um modo estequiométrico<sup>31</sup>. Os resultados das amostras (Tabela 6), em porcentagem, foram apreciáveis (de 80-90% a 0,2  $mg mL^{-1}$ ) quando comparados com padrões a 0,2  $mg mL^{-1}$  como ácido ascórbico (96,5%), BHT (92,1%) e ácido gálico (95,3%). As amostras com grau de torrefação claro apresentaram maior porcentagem de inibição de radicais DPPH. Os dados da Tabela 6 indicam que houve formação de substâncias antioxidantes durante a torrefação, provavelmente compostos da reação de Maillard e melnoidinas, apesar da redução de compostos fenólicos naturalmente presentes na bebida de café.

**Tabela 5.** Valores da avaliação do poder redutor da bebida preparada com café submetido a diferentes processamentos e graus de torrefação

Processamento	Torrefação	% de poder redutor (mg mL <sup>-1</sup> )			
		0,1	0,5	1,0	5,0
Semi-úmido	Verde	18,05±0,46 <i>aA</i>	29,38±0,34 <i>bA</i>	47,50±0,46 <i>cA</i>	76,13±0,61 <i>dA</i>
	Clara	36,83±2,56 <i>aB</i>	40,48±0,15 <i>bB</i>	61,35±1,39 <i>cB</i>	115,39±1,97 <i>dB</i>
	Média	32,33±0,10 <i>aC</i>	36,34±0,80 <i>aC</i>	57,48±0,46 <i>bC</i>	72,94±0,10 <i>cA</i>
	Escura	20,33±2,02 <i>aA</i>	25,00±1,15 <i>bD</i>	34,83±0,62 <i>cD</i>	82,93±0,95 <i>dAC</i>
Seco	Verde	15,78±0,68 <i>aA</i>	24,11±0,22 <i>bD</i>	40,39±0,34 <i>cE</i>	85,45±0,03 <i>dC</i>
	Clara	26,39±1,42 <i>aC</i>	31,37±0,15 <i>bA</i>	47,39±0,81 <i>cA</i>	120,85±3,37 <i>dB</i>
	Média	26,99±2,64 <i>aC</i>	31,53±1,40 <i>bA</i>	55,81±1,27 <i>cC</i>	77,12±0,64 <i>dA</i>
	Escura	20,22±1,11 <i>aA</i>	26,35±0,13 <i>bD</i>	40,80±1,63 <i>cE</i>	78,92±0,50 <i>dAC</i>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey; médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

**Tabela 6.** Valores da atividade seqüestrante de radicais DPPH da bebida preparada com café submetido a diferentes processamentos e graus de torrefação

Processamento	Torrefação	% de seqüestro de radicais DPPH (mg mL <sup>-1</sup> )			
		25,0	50,0	100,0	200,0
Semi-úmido	Verde	17,56±0,29 <i>aA</i>	31,69±0,77 <i>bA</i>	63,63±1,94 <i>cA</i>	85,81±0,85 <i>dA</i>
	Clara	30,32±1,30 <i>aB</i>	50,03±1,16 <i>bB</i>	89,50±0,57 <i>cB</i>	91,61±0,32 <i>dB</i>
	Média	22,20±0,34 <i>aC</i>	41,96±0,69 <i>bC</i>	82,80±0,54 <i>cC</i>	90,16±0,32 <i>dB</i>
	Escura	22,36±0,08 <i>aC</i>	42,08±0,41 <i>bC</i>	80,64±1,14 <i>cC</i>	88,45±0,23 <i>dA</i>
Seco	Verde	18,32±0,81 <i>aA</i>	32,53±0,78 <i>bA</i>	64,28±1,85 <i>cA</i>	86,04±1,01 <i>dA</i>
	Clara	29,46±0,69 <i>aB</i>	46,20±0,50 <i>bB</i>	88,88±1,13 <i>Bc</i>	91,35±0,25 <i>dB</i>
	Média	20,93±0,30 <i>aC</i>	40,24±0,85 <i>bC</i>	69,30±0,74 <i>Ac</i>	89,88±0,40 <i>dB</i>
	Escura	16,53±0,30 <i>aA</i>	33,27±1,13 <i>bA</i>	66,63±0,85 <i>cA</i>	89,93±0,16 <i>dB</i>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey; médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

Na avaliação da atividade quelante, a ferrozina, um reagente cromogênico, torna a solução rósea de acordo com a quantidade de ferro disponível em solução. Assim, quanto menor a quelação de íons pela amostra, maior o número de íons disponíveis para reação com a ferrozina e maior será a absorbância. Os resultados apresentados na Tabela 7 mostraram que o tipo de processamento não interferiu no poder quelante. As amostras de café verde apresentaram maior atividade quelante, provavelmente devido à presença de compostos fenólicos funcionais. Contudo, o aumento do grau de torrefação diminuiu, significativamente, o poder quelante das amostras. A redução desta atividade, provavelmente, se deve à diminuição de compostos fenólicos e ácidos clorogênicos, apesar da formação de melanoidinas, através da Reação de Maillard, que possuem também atividade quelante<sup>32</sup>. Assim, a bebida de café pode ser considerada como antioxidante e sua ingestão pode contribuir para a quelação de metais de transição, que em excesso podem levar à peroxidação lipídica, com conseqüente lesão às membranas plasmáticas e à oxidação do DNA<sup>1,17</sup>. O Fe<sup>2+</sup> em solução, mesmo em concentração muito baixa, induz a geração de HO•, através da reação de Fenton, causando injúria ou morte celular<sup>1,17</sup>.

A inibição da peroxidação lipídica mostrou-se dependente da concentração e foi observada a partir da concentração de 0,2 mg mL<sup>-1</sup>. O processamento, bem como o grau de torrefação do café não alteraram a capacidade de inibir a lipoperoxidação (Tabela 8). Esta atividade pode ser atribuída à presença de compostos com atividade antioxidante na bebida de café, tais como compostos fenólicos, da reação de Maillard, melanoidinas, entre outros, acumulados ou formados durante o processamento e a torrefação do café.

**Tabela 7.** Valores da atividade quelante de íons Fe<sup>2+</sup> da bebida preparada com café submetido a diferentes processamentos e graus de torrefação

Processamento	Torrefação	% de quelação do Fe <sup>2+</sup>
Semi-úmido	Verde	14,97±0,45 <i>A</i>
	Clara	7,86±1,08 <i>B</i>
	Média	6,38±0,52 <i>B</i>
	Escura	2,95±0,55 <i>C</i>
Seco	Verde	16,11±0,23 <i>A</i>
	Clara	7,52±0,31 <i>B</i>
	Média	8,35±0,52 <i>B</i>
	Escura	4,11±0,69 <i>C</i>

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,01$ ), pelo teste de Tukey.

## CONCLUSÃO

Todas as bebidas de café estudadas apresentaram atividade antioxidante dependente da concentração. As amostras de café com grau de torrefação claro foram as que apresentaram maior poder redutor e atividade seqüestrante de radicais DPPH, enquanto que a capacidade quelante de ferro não diferiu das amostras com grau de torrefação médio, mas foi menor que a capacidade quelante do café verde. Apenas para o teste de poder redutor observou-se que o processamento semi-úmido foi mais eficiente que o processamento seco. Todas as amostras apresentaram alta atividade de inibição da peroxidação lipídica. Assim, pode-se concluir que o grau de torre-

**Tabela 8.** Inibição da peroxidação de lipídeos *in vitro* pela bebida preparada com café submetido a diferentes processamentos e graus de torrefação

Processamento	Torrefação	% de inibição da peroxidação lipídica (mg mL <sup>-1</sup> )		
		0,2	2,0	20,0
Semi-úmido	Clara	6,15±0,03 <i>aA</i>	37,92±0,43 <i>bA</i>	55,64±0,58 <i>cA</i>
	Média	7,28±0,01 <i>aA</i>	39,69±0,61 <i>bA</i>	58,70±1,36 <i>cA</i>
	Escura	6,16±0,02 <i>aA</i>	32,37±0,17 <i>bA</i>	52,29±0,91 <i>cA</i>
Seco	Clara	7,23±0,01 <i>aA</i>	37,54±0,55 <i>bA</i>	55,16±0,62 <i>cA</i>
	Média	7,40±0,01 <i>aA</i>	35,12±0,36 <i>bA</i>	54,35±0,75 <i>cA</i>
	Escura	5,42±0,02 <i>aA</i>	33,87±0,24 <i>bA</i>	53,34±1,62 <i>cA</i>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey; médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

fação parece ser mais importante que o tipo de processamento do café na determinação da atividade antioxidante da bebida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. L. C. de A. Barbosa (UFV) pela realização dos espectros no infravermelho, à FAPEMIG e ao CNPq pela bolsa de iniciação científica e à Ipanema Agrícola S. A. pelas amostras de café.

## REFERÊNCIAS

- Loureiro, A. P. M.; Di Mascio, P.; Medeiros, M. H. G.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 777.
- Willcox, J. K.; Ash, S. L.; Catignani, G. L.; *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, *44*, 275.
- Lapointe, A.; Couillard, C.; Lemieux, S.; *J. Nutr. Biochem.* **2006**, *17*, 645.
- Rice-Evans, C.; Miller, N. J.; Paganga, G.; *Free Radical Biol. Med.* **1996**, *20*, 933.
- Hollman, P. C.; Katan, M. B.; *Arch. Toxicol. Suppl.* **1998**, *20*, 237.
- Olthof, R. M.; Hollman, C. H.; Katan, B. M.; *J. Nutr.* **2001**, *131*, 66.
- Morgano, M. A.; Pauluci, L. F.; Mantovani, D. M. B.; Mory, E. E. M.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2002**, *22*, 19.
- Lafay, S.; Gil-Izquierdo, A.; Manach, C.; Morand, C.; Besson, C.; Scalbert, A.; *J. Nutr.* **2006**, *136*, 1192.
- López-Galilea, I.; Andueza, S.; Di Leonardo, I.; Peña, M. P.; Cid, C.; *Food Chem.* **2006**, *94*, 75.
- Nicoli, M. C.; Anese, M.; Manzocco, L.; Lerici, C. R.; *Lebens. Wiss. Technol.* **1997**, *30*, 292.
- Nicoli, M. C.; Anese, M.; Parpinel, M. T.; *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, *10*, 94.
- Daglia, M.; Papetti, A.; Gregotti, C.; Bertè, F.; Gazzani, G.; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1449.
- Suarez-Quiroz, M.; Gonzalez-Riosb, O.; Barela, M.; Guyota, B.; Schorr-Galindob, S.; Guiraudb, J-P.; *J. Food Microbiol.* **2005**, *103*, 339.
- Silva, F. A. M.; Borges, M. F. M.; Ferreira, M. A.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 94.
- Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K.; *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290.
- Roginsky, V.; Lissi, E. A.; *Food Chem.* **2005**, *92*, 235.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3<sup>rd</sup> ed, Oxford University Press: New York, 1999.
- Yokozawa, T.; Chen, C. P.; Dong, E.; Tanaka, T.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I.; *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 213.
- von Gadow, A.; Joubert, E.; Hansmann, C. F.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 632.
- Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thoms, M. B.; *Systematic identification of flavonoids*, Springer-Verlag: New York, 1970.
- Yen, G. C.; Chen, H. Y.; *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *67*, 415.
- Hatano, T.; Kagawa, H.; Yasuhara, T.; Okuda, T.; *Chem. Pharmacol. Bull.* **1988**, *36*, 1090.
- Tang, S. Z.; Kerry, J. P.; Sheehan, D.; Buckley, D. J.; *J. Food Chem.* **2002**, *76*, 45.
- Buege, J. A.; Aust, S. D.; *Methods Enzymol.* **1978**, *52*, 302.
- Menezes, H. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1990.
- Fernandes, S. M.; Pereira, R. G. F. A.; Pinto, N. A. V. D.; Nery, M. C.; Pádua, F. R. M.; *Cienc. Agrotecnol.* **2003**, *27*, 1076.
- Jaime, L.; Mendiola, J. A.; Herrero, M.; Soler-Rivas, C.; Santoyo, S.; Senorans, F. J.; Cifuentes, A.; Ibanez, E.; *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 2111.
- Monteiro, M. C.; Trugo, L. C.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 637.
- Trugo, L. C.; Macrae, R.; *Food Chem.* **1984**, *15*, 219.
- Trugo, L. C.; Macrae, R.; *Analyst* **1984**, *109*, 263.
- Schwars, K.; Bertelsen, G.; Nissen, L. R.; Gardner, P. T.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Huynh-Ba, T.; Lambelet, P.; McPhail, D.; Skibsted, L. H.; Tijburg, L.; *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, *212*, 319.
- Wijewickreme, A. N.; Kitts, D. D.; *J. Toxicol. Environ. Health, Part A* **1998**, *25*, 151.