

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE BEBIDAS DE CAFÉ: INFLUÊNCIA DA FORMA DE PREPARO

Daniel Mansur Rabelo¹, Bárbara oliveira Henriques², Rachel Oliveira Castilho³, Renata Adriana Labanca⁴

¹Mestrando em Ciências de Alimentos, UFMG, Belo Horizonte-MG, dm.rabelo@yahoo.com.br

²Mestre e Doutoranda em Ciências Farmacêuticas, UFMG, Belo Horizonte-MG, bo.henriques@yahoo.com.br

³Professora Adjunta, PhD, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte-MG, rocastilho@ig.com.br

⁴Professora Adjunta, PhD, Faculdade de Farmácia, UFMG, Belo Horizonte-MG, renata@bromatologia.ufmg.br

RESUMO: O café é uma das bebidas mais consumidas do mundo e tem sido muito estudada a sua influência na saúde humana. A atividade antioxidante, ou a eliminação de radicais livres do organismo, que podem ser responsáveis por muitas doenças crônico-degenerativas tem sido atribuída ao café pela presença de ácido clorogênico, cafeína e melanoidinas. Um dos fatores que pode influenciar a concentração desses compostos e dessa forma a atividade é a forma de preparo: por infusão (filtrado), por decocção sem filtração (fervido) ou por pressão (expresso). O objetivo desse trabalho foi comparar as atividades antioxidantes, medidas *in vitro* de bebidas produzidas a partir de uma mesma amostra de café, preparadas dessas três formas diferentes. Para isso, foi utilizada uma amostra de café gourmet, em que foram preparadas bebidas de mesma concentração, das três formas. Foi realizado o teste de atividade antioxidante por dois métodos: captura do radical DPPH e captura do radical ABTS (atividade antioxidante equivalente ao Trolox – TEAC). A atividade encontrada para o café fervido foi menor nos dois testes, indicando que suas condições de extração desfavoreceram a atividade. Porém, foi encontrada maior atividade para o expresso no teste de DPPH e para o filtrado no teste de TEAC, gerando um resultado inconclusivo quanto à diferença dos dois.

PALAVRAS-CHAVE: Café, atividade antioxidante, forma de preparo, forma de extração

IN VITRO ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COFFEE DRINKS: INFLUENCE OF THE BREWING PROCEDURE

ABSTRACT; Coffee is one of the most consumed beverages in the world and has been widely studied its influence on human health. The antioxidant activity, or the elimination of free radicals from the body which can be responsible for many chronic degenerative diseases has been attributed to coffee by the presence of chlorogenic acid, caffeine and melanoidins. One of the factors that can influence the concentration of these compounds and thus the activity is the brewing procedure: infusion (filtered coffee), decoction without filtration (boiled coffee) or pressure (espresso coffee). The aim of this study was to compare the antioxidant activity, measured *in vitro*, of beverages produced from the same sample of coffee, prepared by these three different ways. For this, we used a sample of gourmet coffee and coffee drinks were prepared with the same concentration using the three ways. The antioxidant activity assay was performed by two methods: scavenging of DPPH free radicals and scavenging of ABTS free radicals (Trolox equivalent antioxidant activity - TEAC). The activity found for the boiled coffee was lower in both tests, indicating that their extraction conditions was unfavorable to the activity. However, greater activity was found to espresso in DPPH assay and to the filtered in TEAC, generating inconclusive results about the difference of them.

KEYWORDS: Coffee, antioxidant activity, brewing method, extraction form

INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas do mundo. Seu consumo ocorre devido ao sensorial agradável e aos efeitos estimulantes da cafeína (LIMA *et al*, 2010). Muito se tem falado, porém, da influência do consumo de café na saúde humana. Estudos mais antigos relacionavam o consumo de café a muitos efeitos maléficos, principalmente cardiovasculares. Entretanto, estudos mais recentes têm encontrado muitos efeitos benéficos do café, ligados, principalmente, à sua atividade antioxidante (HIGDON e FREI, 2006).

Durante o processo de respiração aeróbica é inerente a formação de radicais livres, como os radicais superóxido, hidroxil e a substância fortemente oxidante peróxido de hidrogênio. Essas substâncias provocam danos celulares, que culminam em processos degenerativos, como diabetes, hipertensão, inflamações, envelhecimento e outros. Quando as defesas endógenas do organismo não são capazes de eliminar os radicais livres, instala-se o processo de estresse oxidativo (BARBOSA *et al*, 2008). A atividade antioxidante dos alimentos auxilia, portanto, o organismo a promover a remoção desses agentes, evitando o processo de estresse oxidativo, e consequentemente, diminuindo a ocorrência e agravamento dos processos degenerativos (VAN DER ENDE, PESHEV e DE GARA, 2011).

No café, a atividade antioxidante está relacionada, principalmente, às substâncias fenólicas classificadas como ácido clorogênico e seus derivados. São ácidos fenólicos, presentes naturalmente nos grãos de café que, sendo hidrossolúveis,

passam quase integralmente para a bebida. Outras substâncias, como a própria cafeína e as melanoidinas, esta última, formada durante o processo de torração, também contribuem para a atividade antioxidante (BONITA *et al.*, 2007).

Vários fatores influenciam na quantidade dessas substâncias, e conseqüentemente na atividade antioxidante, como a forma de cultivo, o tipo de solo, a espécie de café utilizada, as condições edafo-climáticas, o grau de torração, dentre outros. Em relação à bebida, um outro fator que influencia é o modo de preparo. Embora a bebida possa ser preparada de diversas formas, pode-se classificá-las em três: infusão, decocção e pressão. Na infusão, a água a alta temperatura entra em contato com o pó, extraíndo as substâncias, e concomitantemente é feita a filtração (é o preparo mais utilizado no Brasil). Já na decocção, a água é fervida juntamente com o pó, e geralmente não ocorrendo filtração, somente a decantação do pó antes do consumo. Já a extração por pressão é normalmente feita em máquinas de café expresso (LIMA *et al.*, 2010).

O objetivo desse trabalho foi comparar as atividades antioxidantes, medidas *in vitro* de bebidas produzidas a partir de uma mesma amostra de café, preparadas de três formas diferentes: infusão (café filtrado), decocção (café fervido) e pressão (café expresso).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi selecionada, no comércio de Belo Horizonte-MG, uma amostra de pó de café gourmet torrado e moído para expresso, marca Verdemar, 100% arábica e proveniente da Safra 2010. A partir dessa amostra foram preparados 50 mL, na concentração de 100 g/L, conforme recomenda a associação Brasileira de Indústrias de Café (ABIC, 2013) de cada uma das bebidas – filtrado, fervido e expresso – como se segue: para o café filtrado, 5 g do pó foram colocados em filtro de papel Melita 102, sobre porta-filtro, e foram vertidos sobre ele 50 mL de água a 90°C e o filtrado foi recolhido. Para o café fervido, 5 g do pó, adicionado a 50 mL de água foram aquecidos simultaneamente em bquer até 5 minutos após a ebulição. Após decantação, o sobrenadante foi recolhido. Para o café expresso, foi utilizada máquina de café expresso, em que 5 g do pó foram colocados sobre o filtro, e, após a máquina ser ligada, 50 mL do líquido final foi recolhido pelo bocal de saída.

Em seguida, as três bebidas foram liofilizadas e, a partir dos pós obtidos após esse processo, foram feitos dois ensaios de atividade antioxidante *in vitro*.

No ensaio de DPPH, foi utilizado o método descrito por HENRIQUES, CASTILHO e CASTRO (2012). Soluções dos pós liofilizados ressuspensos em etanol foram colocadas, de forma decrescente, em cada poço de uma microplaca de 96 poços. As concentrações decrescentes das soluções variaram de 71,4 a 4,3 µg/mL, com uma solução sem amostra (controle). Em cada poço foram colocados 100 µL da solução da amostra e 40 µL da solução de DPPH, gerando três curvas. Uma curva-branco também foi gerada substituindo-se a amostra por etanol. A placa foi incubada por 30 minutos a 37°C e em seguida foi lida a absorvância em leitor de ELISA a 516 nm. Após a leitura, foi calculada a porcentagem de atividade pela fórmula:

$$\% \text{ ativ.} = \frac{\text{Abs (Controle)} - \text{Abs (amostra)}}{\text{Abs (Controle)}} \times 100$$

em que % ativ. é a porcentagem de atividade e Abs é a absorvância lida, no controle e amostra. Com esses dados, foram construídas curvas atividade x concentração, e por interpolação, foi obtido o valor de CE_{50%}, a concentração de amostra capaz de eliminar 50% do radical livre DPPH. O resultado final foi a média das CE_{50%} obtidas nas três curvas de amostra, descontando-se o branco.

Para o ensaio de ABTS foi desenvolvido um método, também em microescala, a partir da metodologia proposta por Rufino *et al.* (2007). Em microplaca de 96 poços, foram feitas quatro curvas (um branco e três replicatas), com concentrações decrescentes, de 50,00 a 6,25 µg/mL, além do controle sem amostra, das amostras liofilizadas e ressuspensas em metanol. Nas replicatas, foram adicionados 5 µL de amostra e 195 µL de reagente ABTS previamente preparado, e no branco, etanol ao invés do reagente. As absorvâncias foram lidas a um comprimento de onda de 734 nm. Também foi feita uma placa para o Trolox, análogo sintético da Vitamina E, com concentrações entre 9,375 e 0,625 µg/mL além do controle sem a substância. A porcentagem de atividade foi calculada conforme já descrito e as curvas atividade x concentração foram construídas, tanto para amostra quanto para o Trolox. A atividade antioxidante total da amostra foi calculada em relação à do Trolox, pela razão entre suas CE_{50%}, com os resultados sendo expressos em µmol TEAC/g de amostra. O valor de CE_{50%} para o Trolox foi obtido através da média entre os obtidos para as três curvas. E cada valor de TEAC foi obtido a partir da razão do CE_{50%} de uma curva da amostra com a média do Trolox. Por fim, o valor médio de TEAC foi obtido pela média do valor TEAC para as três curvas, de cada amostra.

As médias calculadas foram testadas estatisticamente pelo método de análise de variância (ANOVA) com 5% de significância. Havendo diferença estatisticamente significativa, as médias foram comparadas individualmente pelo teste de Tukey, também a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão expressos nas tabelas 1e 2:

Tabela 1. Valores das amostras obtidos no teste de atividade antioxidante por captura do radical DPPH

Amostra	CE ₅₀ (µg/mL)
Café filtrado	36,96 ± 1,20 ^b
Café fervido	66,00 ± 2,02 ^c
Café expresso	30,53 ± 1,72 ^a

Médias seguidas por letra minúscula nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Valores das amostras obtidos no teste de atividade antioxidante por captura do radical ABTS, expresso em TEAC

Amostra	Valor de TEAC (µmol de Trolox/g de amostra ± DP)
Café filtrado	733,98 ± 54,64 ^a
Café fervido	465,39 ± 40,18 ^c
Café expresso	629,89 ± 15,43 ^b

Médias seguidas por letra minúscula nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Conforme os resultados, percebe-se que há diferença estatisticamente significativa entre os valores de atividade antioxidante obtidos, tanto no teste de captura do radical livre DPPH quanto ABTS, para os três tipos de preparo da bebida, embora a ordem obtida seja diferente nos dois testes.

No caso do radical DPPH, quanto menor o valor de CE_{50%}, maior a atividade. Assim, o café expresso apresentou a maior atividade, seguido pelo café filtrado, e por último o fervido. No caso do radical ABTS, quanto maior o valor TEAC, maior a atividade. Assim, encontrou-se uma maior atividade para o café filtrado, seguida pelo expresso e por último o fervido.

Embora os resultados diferentes obtidos impeça uma melhor conclusão sobre a diferença entre as atividades dos cafés filtrado e expresso, comprovou-se que o café fervido possui atividade muito menor. O café fervido é extraído sob condições mais drásticas, pois na decocção, a água em ebulição permanece mais tempo em contato com o pó. Entretanto, de acordo com esse resultado, pode-se inferir que essas condições não favorecem a extração de compostos com atividade antioxidante mas, provavelmente, acelera sua degradação.

O café expresso, extraído por pressão, também tem condições de extração mais drásticas que o filtrado. Entretanto, o fato de os dois testes terem obtido atividades diferentes faz que com que não se possa ter uma conclusão definitiva, por esse estudo, se essas condições favorecem a extração ou a degradação de compostos com atividade antioxidante.

Outros estudos também mostraram controvérsia sobre esse ponto de vista: nos estudos de Parras *et al.* (2007) e de Sanchez-Gonzalez, Jimenez-Escrig e Saura-Calixto (2005), em que foi avaliada a atividade antioxidante por várias metodologias, inclusive ABTS, o café filtrado apresentou maior atividade que o expresso. Entretanto, no estudo de Niseteo *et al.* (2012), foi encontrada maior atividade para o expresso, e inclusive o café turco, um tipo de café fervido, apresentou maior atividade que o filtrado.

Assim, percebe-se que são necessários mais estudos, sugere-se outros testes de atividade antioxidante, como o sistema-modelo do β-caroteno/ ácido linoleico, o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e ou o método de Redução de Ferro (FRAP). Inclusive, estudos *in vivo* são interessantes, para, além de verificar as diferenças inerentes à presença de substâncias químicas em cada tipo de preparo, também avaliar a ação do metabolismo sobre esses compostos, gerando ou não uma resposta antioxidante no organismo.

CONCLUSÃO

Com a realização desse estudo, conclui-se que o café fervido apresenta uma menor atividade antioxidante *in vitro* em relação aos cafés filtrado e expresso, ou seja, suas condições de extração desfavorecem a extração ou favorecem a degradação de compostos com atividade antioxidante. Resultados controversos foram encontrados em relação à diferença de atividade entre o café filtrado e o expresso, necessitando-se mais estudos, incluindo estudos *in vivo*, para se obter um resultado mais conclusivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC – Associação Brasileira das indústrias de café. Website oficial, em: www.abic.com.br. Acesso em 09 de setembro de 2013
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, v. 33, n. 2, p. 111-128, 2008.

- BONITA, J. S.; MANDARANO, M.; SHUTA, D.; VINSON, J. Coffee and cardiovascular disease: *In vitro*, cellular, animal, and human studies. *Pharmacological Research*, vol. 55, p 187–198, 2007.
- HENRIQUES, B.O.; CASTILHO, R. O.; BRAGA, F. C. Avaliação da atividade antioxidante em modelo DPPH de produtos naturais em micro-escala. Trabalho apresentado no 22. Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Bento Gonçalves, 2012.
- HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and Health: A Review of Recent Human Research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 46, p.101–123, 2006.
- LIMA, F.A.; SANT’ANA, A. E. G.; ATAÍDE, T. R.; OMENA, C. M. B.; MENEZES, M. E. S.; VASCONCELOS, S. M. L. Café e saúde humana: um enfoque nas substâncias presentes na bebida relacionadas às doenças cardiovasculares. *Revista de Nutrição*, vol. 23, n.6, p.1063-1073, 2010b
- NISETEO, T.; KOMES, D.; BELSCAK-CVITANOVIC, A.; HORZIC, D; BUDE, M. Bioactive composition and antioxidant potential of different commonly consumed coffee brews affected by their preparation technique and milk addition. *Food Chemistry*, vol. 134, p. 1870-1877, 2012.
- PARRAS, P.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; JIMÉNEZ, A.M.; MURCIA, M. A.; Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. *Food Chemistry*, vol. 102, p.582–592, 2007.
- RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS⁺. Comunicado técnico 18. MAPA, 2007
- SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, vol. 90, p. 133–139, 2005.
- VAN DER ENDE, W.; PASCHEV, D.; DE GARA, L. Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 22, p. 689-697, 2011.