

Influência do método de extração de café no perfil químico e atividade antioxidante “*in vitro*” e “*in vivo*” nas bebidas

RESUMO

Daniel Mansur Rabelodm.rabelo@yahoo.com.br

Faculdade de Farmácia, Departamento de Alimentos Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais
<http://orcid.org/0000-0002-5550-4068>

Bárbara Oliveira Henriquesbo.henriques@yahoo.com.br

Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais
<http://orcid.org/0000-0002-5417-3076>

Rachel Oliveira Castilhorocastilho40@gmail.com

Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais
<http://orcid.org/0000-0003-4882-4992>

Renata Adriana Labancarenatalabanca@gmail.com

Faculdade de Farmácia, Departamento de Alimentos Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais
<http://orcid.org/0000-0002-2120-0082>

O café, fruto do cafeeiro (gênero *Coffea*), contém sementes que, quando torradas e moídas, geram uma das bebidas mais consumidas do mundo. Ao consumo do café são atribuídos muitos benefícios à saúde, a maioria deles ligados às suas propriedades antioxidantes. Os componentes do café ligados a essa atividade são, principalmente, os polifenóis, a cafeína e as melanoidinas. Assim, esse trabalho objetivou avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de bebidas de café obtidas a partir de diferentes tipos de extração. Para isso, foram preparadas a partir de uma mesma amostra de café torrado e moído bebidas a 10 g/L nas formas de filtrado (infusão), fervido (decoção) e expresso (pressão) e foram realizados testes de atividade antioxidante *in vitro* (DPPH e ABTS) e *in vivo*, utilizando-se animais sadios submetidos a uma dosagem diária da bebida equivalente a 350 mL para um adulto de 70 kg, em cujos fígados foram determinadas as atividades das enzimas catalase e glutatona redutase e a medida da peroxidação por TBARS, além da determinação de alguns parâmetros bioquímicos no sangue. Nos ensaios *in vitro*, o café fervido obteve menor atividade que os demais, sendo que o filtrado apresentou a maior atividade no ensaio de DPPH e o expresso no ensaio de ABTS. Com relação aos parâmetros bioquímicos, houve diferenças significativas apenas para a glicemia, que foi maior nos animais controle que nos tratamentos. Em conclusão, o café reduziu a glicemia, provavelmente pela presença de seus compostos bioativos.

PALAVRAS-CHAVE: café; atividade antioxidante; método de extração.

INTRODUÇÃO

Café é a bebida obtida a partir da extração aquosa das sementes torradas e moídas do fruto de café, provenientes de uma árvore do gênero *Coffea*, família Rubiaceae, cujas principais espécies utilizadas são a *C. arabica* e *C. canephora var. robusta* (CLARK e MACRAE, 1985).

O café possui várias propriedades biológicas, a principal e mais conhecida é o efeito estimulante do sistema nervoso central, produzido pelo alcaloide purínico cafeína. Devido a isso, o café esteve por muitos anos ligados a efeitos maléficos à saúde, como elevação da pressão arterial, aumento de risco para doenças cardiovasculares, irritabilidade e insônia (HIGDON e FREI, 2006). Entretanto, recentemente, novas propriedades biológicas foram atribuídas ao café, principalmente relacionadas com sua atividade antioxidante (LIMA *et al.*, 2013; ABRAHÃO *et al.*, 2013; MOLLOY *et al.*, 2012).

A atividade antioxidante está relacionada com a prevenção da formação ou a desativação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no organismo. Sua formação é natural, consequência da respiração aeróbica, mas seu acúmulo provoca efeitos deletérios, tais como ataques a membranas biológicas e ácidos nucleicos, favorecendo o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, como diabetes, hipertensão, dislipidemia e alguns tipos de câncer (VAN DEN ENDE, PESHEV e DE GARA, 2011; SILVA, 2011). Assim, a atividade antioxidante de produtos como o café podem auxiliar a prevenção e controle dessas doenças.

No café, a atividade antioxidante está principalmente ligada à presença de polifenóis, em especial o ácido clorogênico e seus isômeros (LUDWIG *et al.*, 2012; NISETEO *et al.*, 2012). Porém, também já foram atribuídos efeitos antioxidantes, embora em menor grau, à cafeína (VIANA *et al.*, 2012) e às melanoidinas, substâncias formadas durante o processo de torração (LUDWIG, 2012; PERRONE, FARAH e DONANGELO, 2012).

A composição química, e consequentemente a atividade biológica do café pode ser influenciada por diversos fatores, como a espécie utilizada (SOUZA e BENASSI, 2012), grau de torração (DEL CASTILHO, AMES e GORDON, 2002) e as condições de extração para preparo da bebida (NISETEO *et al.*, 2012; PARRAS *et al.*, 2007; SÁNCHEZ-GONZALEZ, JIMENEZ-ESCRIG e SAURA-CALIXTO, 2005). O tipo de extração é um fator importante, pois é o único a ser determinado pelo consumidor final, que prepara a bebida a seu gosto.

A infusão e a decocção são as duas extrações aquosas mais importantes. Na decocção, em geral, a temperatura de extração e o tempo de contato tendem a ser maiores, extraíndo substâncias diferentes nos dois processos (NISETEO *et al.*, 2012). Em se tratando de café, utiliza-se também a extração por água pressurizada (café expresso), que também pode gerar uma bebida com diferentes propriedades (LIMA *et al.*, 2010).

Para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, vários métodos podem ser utilizados, dentre eles os métodos de sequestro de radicais livres ABTS e DPPH, ambos aplicáveis para café (VIGNOLI *et al.*, 2012). Já para a determinação da atividade antioxidante *in vivo*, pode-se administrar cada preparação a animais de laboratório, e posteriormente dosear a atividade das enzimas antioxidantes hepáticas e a medida da peroxidação lipídica, para verificar se houve alteração da atividade. Todos esses testes, aliados à caracterização química de cada

preparação, podem dar base para discutir qual das formas de extração favorece mais a atividade antioxidante (D'ARCHIVIO et al, 2010).

Assim, o objetivo desse trabalho é determinar a influência do tipo de extração no perfil químico e atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de preparações de café, obtidas por infusão, decocção e extração por pressão.

MATERIAIS E MÉTODOS

SOLVENTES, REAGENTES E SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Os padrões ácido gálico, ácido clorogênico, e cafeína e os reagentes DPPH, ABTS e fosfomolibdotungstênio foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Os reagentes persulfato de potássio, cetamina, xilazina, EDTA, fosfato de potássio dibásico, fosfato de potássio tribásico, fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio tribásico, reagente de Bradford, ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico, Tris, 1,1,3,3-tetrametoxipropano, peróxido de hidrogênio, NADPH e GSSG foram adquiridos da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Os kits diagnósticos utilizados para as análises bioquímicas do sangue foram gentilmente cedidos pela Bioclin (Belo Horizonte, Brasil).

AMOSTRAGEM

A amostra escolhida foi adquirida em um supermercado de Belo Horizonte, MG, no ano de 2013. As descrições presentes na embalagem do produto indicavam que se tratava de Café Bourbon Amarelo, constituído por 100% de grãos da espécie *Coffea arábica*, produzido na Fazenda Samambaia, localizada no Sul de Minas Gerais. As características sensoriais descritas eram de aroma frutado, corpo médio, acidez destacada, doçura média alta, sabor remanescente prolongado e doce. O produto apresentava a indicação da granulometria como “café moído para expresso” e torração como média e era proveniente da Safra 2010.

PREPARO DAS BEBIDAS

As bebidas de café tradicional filtrado (por infusão), fervido (por decocção) e expresso (por pressão) foram preparadas de acordo com o método recomendado pela Associação Brasileira das Indústrias de Café - ABIC (ABIC, 2017), com adaptações. Para a preparação por infusão, em papel de filtro comercial sobre porta-filtro, foram colocados para cada 1000 mL de bebida, 100 g da amostra, sendo que a água foi vertida sobre a amostra a 90 °C. O filtrado foi recolhido em béquer. Para a bebida preparada por decocção, em um béquer, foram colocados 100 g do pó de café para cada 1000 mL de água. O conjunto foi levado à ebulição e mantido por 5 minutos após seu início. O béquer foi então colocado em repouso por aproximadamente 10 minutos para proceder à decantação do pó. A bebida café expresso foi preparada utilizando a mesma quantidade inicial de amostra e o mesmo volume final, em máquina de café expresso (pressão = 9 bar). De cada vez, foram colocados 5 g de pó de café no filtro e foram recolhidos 50 mL da bebida no

bocal, após o preparo padronizado da máquina, que dura cerca de 10 segundos. O procedimento foi repetido até se atingir a quantidade final requerida de 1000 mL.

OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO LIOFILIZADO

Cem mL de cada bebida foram transferidos para um béquer, congelados a -80° C e liofilizados em liofilizador (L101, LIOTOP) até completa secagem. Os teores de cafeína e ácido clorogênico e os fenólicos totais foram determinados neste extrato.

DETERMINAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS E QUANTIFICAÇÃO DE CAFEÍNA E ÁCIDO CLOROGÊNICO POR CLAE-DAD

O perfil cromatográfico das bebidas foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras foram ressuspensas em metanol, e 1 mL de cada amostra foi submetida a centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi transferido para vials. Para o preparo da curva de calibração das substâncias de referência, foram pesados 2 mg dos padrões cafeína e ácido clorogênico, diluindo-se em metanol para 1 mL. A partir dessa solução, foram realizadas diluições. Essas soluções foram submetidas a centrifugação a 5000 g por 10 minutos, e os sobrenadantes foram transferidos para vials. A CLAE foi realizada em um cromatógrafo líquido Waters (Massachusetts, USA), equipado com injetor automático, modelo 2695, com detector de arranjos de diodo (DAD) 2996, bomba L-6200, integrador C-R4A e software Empower para processamento de dados. Foi usada uma coluna de fase reversa Coluna Spherisorb ODS-1, 4,6 x 250 mm, 5 µm. O volume injetado foi de 10,0 µL. Como sistema eluente, utilizou-se gradiente de ácido fosfórico 0,1% em água e acetonitrila, iniciando com 5% de acetonitrila, aumentando de forma linear até 40% em 20 minutos, com fluxo de 1 ml/minuto e temperatura da coluna 40° C. Foi realizada a varredura em comprimento de onda de 200 a 400 nm, sendo os cromatogramas extraídos em 220 nm.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

ABTS

Para a análise da atividade antioxidante pela captura do radical 2,20-azino-bis ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (ABTS), foi desenvolvido um método em microescala, baseado no descrito por Rufino *et al.* (2007). As amostras liofilizadas foram ressuspensas em metanol, gerando soluções com concentrações variando de 6,25 a 50,0 µg/mL. Previamente, foi preparada uma solução do reagente ABTS pela mistura de 4,912 mL de ABTS 7 mM com 88 µL de persulfato de potássio 140 mM, mantida em repouso por 16 horas, e sendo posteriormente ajustada a sua absorvância até o valor de $0,70 \pm 0,02$. Em cada poço de uma microplaca de 96 poços foi adicionada 5 µL da solução da amostra em cada uma das concentrações e 195 µL da solução de ABTS com o último poço não contendo amostra (controle). A análise foi realizada em triplicata. A absorvância foi lida em Leitor de ELISA (U-2900, HITACHI) a λ 734 nm após 6 minutos da adição de ABTS e a capacidade de

reduzir o radical ABTS (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando a Equação 1.

$$\% \text{ Atividade} = (A_{Am} / A_c) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que A_{Am} é a absorvância lida para a amostra e A_c é a absorvância lida para o ABTS sem amostra (controle).

Uma curva de porcentagem de inibição do radical ABTS *versus* concentração foi construída por regressão linear, e o valor da concentração eficaz a 50% (CE_{50}) foi obtido por interpolação.

DPPH

Para a análise da atividade antioxidante pela captura do radical DPPH foi utilizado o método desenvolvido por Henriques, Castilho e Braga (2012), em microescala. A atividade antioxidante também foi determinada através do radical livre 2,2-di(4-t-octilfenil)-1-picrilhidrazila (DPPH). Ressuspendeu-se o liofilizado em metanol (1 mg em 10 mL) ou as substâncias de referência, cafeína (4 mg em 10 mL) e ácido clorogênico (1 mg em 10 mL), e procederam-se diluições dessas soluções, obtendo-se 6 concentrações. A cada poço de uma microplaca de 96 poços, acrescentou-se 100 μ L das amostras ou padrões e 40 μ L de solução de DPPH 40 μ M, seguindo-se agitação por 1 minuto, incubação por 30 minutos e leitura da absorbância em 516 nm. O branco da amostra foi determinado adicionando-se 40 μ L de metanol aos poços (sem adição de DPPH), e a absorbância da solução de DPPH, adicionando-se 100 μ L de metanol ao invés da solução da amostra. A CE_{50} foi determinada através de regressão linear.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VIVO*

A experimentação animal foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob o protocolo de no 34/2011. Foram utilizados 32 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG, recém-desmamados e com idades ente 27 e 32 dias. Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de plástico com tampa e bebedouro de metal. Eles foram alimentados, durante todo o experimento com ração de biotério (Labina, PR, Brasil) e água *ad libitum*.

Durante 4 dias foi procedido o período de adaptação, em que os animais receberam somente a alimentação padrão. Após esse período, os animais foram divididos em 4 grupos de 8 animais, e receberam, diariamente, durante 30 dias, por gavagem, 5 μ L/g de peso de cada animal das seguintes bebidas: Grupo 1 – Água (controle); Grupo 2 – Café filtrado; Grupo 3 – Café fervido; Grupo 4 – Café expresso.

A quantidade recebida de bebida por animal, diariamente, foi calculada para simular um consumo de 350 mL de bebida café para um adulto de 70 kg. O consumo de 300 a 500 mL por dia é o recomendado para se obter efeito antioxidante (BONITA *et al.*, 2007). O peso dos animais variou de 70 a 490 g durante os experimentos. Com isso, o volume de café ministrado variou de 0,4 a

2,5 mL. A cada 3 dias, os animais eram pesados e o volume de café a ser ministrado era recalculado.

Após os 30 dias de experimentos, os animais foram submetidos a jejum de 24 horas e anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg de peso) e xilazina (16 mg/kg de peso), provenientes de uma solução 10 mg/mL de cetamina e 2 mg/mL de xilazina. Após esse procedimento, foi retirado, por punção cardíaca, cerca de 8 mL de sangue dos animais, recolhidos em tubos com e sem EDTA, para que fossem procedidos os testes bioquímicos.

Constatada a morte do animal, foi feita uma incisão na linha média do abdômen, expondo a cavidade peritoneal. Desta, o fígado foi isolado e removido. Os fígados foram então congelados em nitrogênio líquido e mantidos em ultrafreezer a -80 °C até o momento de se preparar a suspensão de hepatócitos isolados, utilizada nos testes de peroxidação lipídica e determinação de enzimas hepáticas.

Teste de parâmetros bioquímicos nos animais tratados

Utilizando-se kits diagnósticos específicos e seguindo-se as instruções do fabricante, foram realizados os seguintes testes bioquímicos no sangue dos animais: Glicose, Hemoglobina, Uréia, Magnésio, Proteínas, Albumina, Fosfatase Alcalina, Amilase e Creatinina. Os kits continham padrões de concentrações definidas e reagentes colorimétricos, sendo as leituras realizadas por espectrofotometria no UV/visível, nos comprimentos de onda específicos.

Preparo da suspensão de hepatócitos isolados

Para a obtenção da suspensão de hepatócitos isolados, foi utilizado o procedimento descrito por Lima (2008). O fígado foi pesado e homogeneizado com um volume três vezes maior que a massa pesada de tampão fosfato de potássio (0,1 M pH 7,0), utilizando-se um ultraturrax. O homogeneizado foi então centrifugado a 1010 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e novamente centrifugado, a 11200 x g, por 20 minutos a 4 °C, retirando-se novamente o sobrenadante. Desse último, cerca de 2 mL passou por ultracentrifugação e o restante foi retirado para ser utilizado no teste de TBARS. Os 2 mL retirados anteriormente passaram por ultracentrifugação a 105.000 x g por 60 minutos a 4 °C. Deste último tratamento, foi obtida a fração citosólica, utilizada na determinação das atividades das enzimas antioxidantes.

Determinação do teor de proteínas

Todas as unidades de medida dos ensaios enzimáticos utilizam como denominador a quantidade em massa de proteína, uma vez que se referem a atividades enzimáticas. Para determinação do teor de proteínas das amostras, foi utilizado o método de Bradford (1976), com adaptações. Para cada uma das amostras de suspensão de hepatócitos ultracentrifugada, 100 µL foram retirados e diluídos em 900 µL de tampão fosfato 0,1 M. Dessas amostras diluídas, 50 µL foram aliqüotados em tubos falcon e foram adicionados 950 µL de água deionizada e 1,5 mL de Reagente de Bradford. Após repouso de 5 minutos, foi realizada a

leitura em espectrofotômetro em λ 595 nm. Para interpretação dos resultados, foi feita, previamente, uma curva analítica de calibração com soro-albumina bovina, variando a concentração entre 2,0 e 18,0 $\mu\text{g/mL}$.

Avaliação da peroxidação lipídica pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para esse teste, foi utilizado método baseado no descrito por Buege e Aust (1978). Foram aliqüotados 100 μL de cada amostra de suspensão de hepatócitos não-ultracentrifugada e colocados em tubos falcon, adicionados de 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 12 %. A mistura foi agitada em vortex, e, logo após, foram adicionados 900 μL de tampão 60 mM de Tris-HCl (pH 7,4 DTPA 0,01 mM) e 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,73 %. A solução foi novamente agitada em vortex e os tubos foram levados a banho de água fervente por 1 hora, sendo então resfriados em geladeira por 20 minutos. Subsequentemente, foi feita a leitura em espectrofotômetro em λ 535 nm. Para interpretação dos resultados, foi feita, previamente, uma curva analítica de calibração com 1,1,3,3-tetrametoxipropano, que em meio ácido gera MDA, variando a concentração entre 0,5 e 2,5 $\mu\text{mol/L}$.

Avaliação da atividade das enzimas hepáticas

Catalase (CAT)

Para determinar a atividade da catalase (CAT), foi utilizado método baseado no descrito por Aebi (1984). Previamente, o meio de reação foi preparado, com uma alíquota de 60 μL de peróxido de hidrogênio 35 % sendo transferida para balão volumétrico de 100 mL e completando-se o volume com água. Em um frasco âmbar, foram misturados 90 mL dessa solução a 5 mL de tampão 1M Tris (pH 8,0 EDTA 5mM) e 4 mL de água. Em microtubos eppendorf, 20 μL da amostra foram então diluídos em 380 μL de tampão 0,1 M fosfato pH 7,0 e 100 μL desta diluição foram colocados em cubeta de quartzo. Em seguida, foram adicionados na mesma cubeta 2,90 mL do meio de reação, procedendo a leitura a λ 230 nm, imediatamente e após 3 min. A absorvância final menos a inicial gera o resultado expresso como ΔE . O resultado final foi expresso em unidades arbitrárias ($\Delta E/\text{min/g}$ de proteína).

Glutathione Redutase (GR)

Para a determinação da atividade da glutathione redutase (GR) foi utilizado método baseado no descrito por Carlberg e Mannervick (1975). Previamente, o meio de reação foi preparado, com a mistura de 0,0172 g de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH); 0,0654 g de glutathione oxidada (GSSG) e 20 mL de solução de DTPA 0,005 M, em 50 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e 30 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados em cubeta de quartzo 150 μL de amostra e 2,85 mL do meio de reação, procedendo a leitura a λ 340 nm, imediatamente e após 1 min. A absorvância final menos a inicial gera o resultado expresso como ΔE . O resultado final foi expresso em unidades arbitrárias ($\Delta E/\text{min/g}$ de proteína).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as determinações foram feitas em triplicata e os resultados correspondem à média \pm desvio padrão. As médias foram analisadas estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

CAFEÍNA E ÁCIDO CLOROGÊNICO

A Figura 1 apresenta os cromatogramas obtidos para as três bebidas e as substâncias de referência avaliadas.

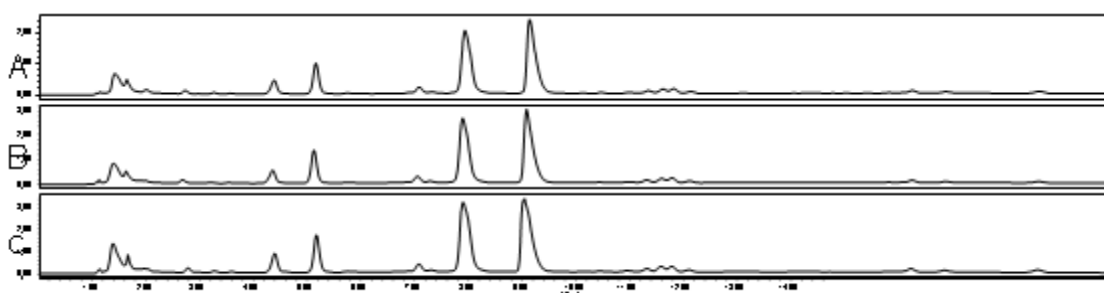


Figura 1. Cromatogramas dos extratos de amostra de café arábica (A) – Café filtrado, (B) – Café fervido, (C) – Café expresso. Picos: ácido clorogênico (8,0 min) e cafeína (9,5 min). Condições: coluna de fase reversa Coluna Spherisorb ODS-1, 4,6 x 250 mm, 5 μ m. O volume injetado foi de 10,0 μ L. Como sistema eluente, utilizou-se gradiente de ácido fosfórico 0,1%/H₂O (A) e acetonitrila (B), 0 a 5' – 5% B; 20' – 40% B, vazão: 1,0 mL/min. 40° C. Detecção: Foi realizada a varredura em comprimento de onda de 200 a 400 nm, sendo os cromatogramas extraídos em 220 nm.

Os perfis cromatográficos mostraram-se semelhantes entre as três bebidas, com picos majoritários com tempo de retenção e máximos de absorção bastante semelhantes. Os teores de cafeína e ácido clorogênico nas bebidas foram determinados por a partir da área dos picos, através de curvas de calibração traçadas para essas substâncias (Tabela 1).

Tabela 1. Teores de cafeína e ácido clorogênico para as bebidas de cafés arábica em diferentes formas de preparo

(mg/100 g em base seca)	Café filtrado	Café fervido	Café expresso
Cafeína	1379,78 \pm 194,66 ^a	1513,54 \pm 53,61 ^a	1831,82 \pm 160,89 ^a
Ácido clorogênico	18557,1 \pm 2124,39 ^a	22952,4 \pm 918,43 ^b	28435,7 \pm 1586,97 ^c

NOTA: Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Os resultados indicam que o café apresenta uma quantidade menor de cafeína independentemente da forma de extração. Comparando-se a média das concentrações das três formas de extração, a diferença não foi significativa ($p <$

0,05). Isso indica que houve pouca influência da forma de extração em relação ao teor de cafeína. Com relação ao ácido clorogênico, verificou-se maior teor no café expresso, o que pode indicar que condições mais intensas (alta pressão) favorecem a extração deste. O ácido clorogênico é bastante degradado durante a torração, contribuindo amplamente para o aroma e sabor finais da bebida (LIMA et al., 2010). É importante, porém, constatar a presença de outros ácidos fenólicos no café, como outros isômeros do ácido clorogênico e outros derivados do ácido cinâmico, que, embora em menor teor em geral no café, também podem contribuir para a atividade antioxidante (FUJIOKA e SHIBAMOTO, 2008).

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Na tabela 2 estão representadas as CE_{50} encontradas para os três tipos de extração no teste de DPPH e ABTS e também para o ácido clorogênico no teste de DPPH. O CE_{50} da cafeína no teste de DPPH foi maior que 200 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 2. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e ABTS para as bebidas de cafés arábica em diferentes formas de preparo

	Café filtrado	Café fervido	Café expresso	Ácido clorogênico
DPPH	36,96 \pm 1,20 ^c	63,00 \pm 2,02 ^d	30,53 \pm 1,72 ^b	5,55 \pm 0,18 ^a
ABTS	23,35 \pm 1,69 ^b	36,87 \pm 3,15 ^d	27,12 \pm 0,67 ^c	12,23 \pm 0,68 ^a

NOTA: Médias seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

De acordo com os resultados, há diferenças estatisticamente significativas entre os valores de atividade antioxidante obtidos, tanto no ensaio de captura do radical livre DPPH quanto no ensaio de captura do radical ABTS, para os três tipos de preparo da bebida, embora a ordem obtida seja diferente nos dois testes.

Para efeito de comparação, os dois testes tiveram seus resultados expressos em termos de CE_{50} , em que quanto menor o valor, maior a atividade. No caso do radical DPPH, o café expresso apresentou a maior atividade, seguido pelo café filtrado, e por último o fervido. No caso do radical ABTS, verificou-se uma menor atividade para o café fervido, sendo que para os cafés filtrado e expresso não ocorreu variação significativa.

Embora os resultados diferentes obtidos impeçam uma melhor avaliação sobre a diferença entre as atividades antioxidantes dos cafés filtrado e expresso, comprovou-se que o café fervido possui atividade antioxidante menor. Esse fato pode ser explicado por uma condição mais intensa utilizada na extração, pelo menos com relação ao café filtrado, pois na decocção a água em ebulição permanece mais tempo em contato com o pó do café. Entretanto, de acordo com esse resultado, pode-se inferir que essa condição não favoreceu a extração de compostos com atividade antioxidante, mas, provavelmente, acelerou sua degradação.

O café expresso, extraído por pressão, apresenta condições de extração também mais drásticas. Embora o tempo de extração seja menor, a pressão da água sobre o pó é maior, possibilitando a utilização de uma temperatura mais alta.

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 resultados divergentes com relação a esse tema: no estudo de Parras *et al.* (2007), preparações de café filtrado, expresso e italiano (que também usa como princípio a infusão) foram preparados utilizando-se em geral 7 g de pó de café para 40 mL de bebida. Nesse estudo, comparando-se os tipos de extração realizados, constatou-se que o café filtrado teve maior atividade antioxidante que o expresso. Igualmente, no estudo 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. Nesse estudo, porém as concentrações de pó de café utilizadas diferiram entre os métodos. Entretanto, no estudo de Niseteo *et al.* (2012), utilizando-se uma concentração de 5 g de pó de café para cada 50 g da bebida foi encontrada maior atividade para o expresso, e inclusive o café turco, um tipo de café fervido, apresentou maior atividade que o filtrado. É importante, porém ressaltar que nesses estudos foram utilizados sempre equipamentos eletrônicos para o preparo do café, sendo que nenhum deles utilizou o preparo manual, como no presente estudo.

A concentração utilizada no presente estudo foi a recomendada pela Associação Brasileira de Indústrias de Café (BRASIL, 2017) e sendo assim corresponde aos hábitos da população brasileira, o que pode explicar as diferenças entre as concentrações utilizadas neste e em outros estudos.

A determinação do CE_{50} , no teste de DPPH, para ácido clorogênico e cafeína puros objetivou avaliar a influência desses compostos na atividade antioxidante *in vitro*. Com um valor de CE_{50} bem menor que o encontrado nos três cafés, o ácido clorogênico demonstrou ter grande influência na atividade. Já a cafeína possui um CE_{50} muito maior, o que indica que, provavelmente, a cafeína exerce pouca ou nenhuma influência sobre a atividade antioxidante das amostras.

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

As ações do café no organismo, sendo elas relacionadas ou não à atividade antioxidante, podem alterar parâmetros fisiológicos e bioquímicos (Tabela 3). Assim, a realização de ensaios bioquímicos no sangue dos animais tratados pôde subsidiar discussões sobre as alterações que a atividade antioxidante promove no organismo, além de outros efeitos do café relacionados à saúde.

Ao se fazer a leitura dos testes para a avaliação dos parâmetros bioquímicos realizados, é possível observar que somente para a quantificação da glicemia houve diferença significativa. Os animais controle apresentaram maior glicemia que os tratados com as bebidas de café obtidas pelos diferentes métodos extrativos. A glicemia de ratos com livre acesso a alimentação e água varia de 70 a 135 mg/dL (CAMPOS-FLORÍAN *et al.*, 2013), faixa que abrange os valores encontrados. O efeito hipoglicemiante, foi, portanto, comprovado por esse teste e pode ser devido à presença de ácido clorogênico, uma vez que, além da ação antioxidante, sabe-se que ele inibe transportadores de glicose dependentes de sódio, podendo interferir na secreção de peptídeos gastrointestinais com efeito

hiperglicêmico (ABRAHÃO *et al.*, 2013) e ainda inibe a enzima glicose-6-fosfato, o que interfere diretamente no metabolismo da glicose (MAHER, 2010).

Tabela 3. Resultados dos ensaios bioquímicos realizados nas amostras de sangue dos animais tratados

Ensaio	Controle	Café filtrado	Café fervido	Café expresso
Glicose (mg/dL)	133,63 ± 57,24 ^a	88,89 ± 33,47 ^b	75,60 ± 18,24 ^b	73,22 ± 12,12 ^b
Hemoglobina (g/dL)	14,62 ± 12,27 ^a	15,02 ± 2,22 ^a	15,42 ± 0,93 ^a	15,69 ± 1,83 ^a
Uréia (mg/dL)	52,73 ± 12,04 ^a	54,37 ± 14,12 ^a	54,03 ± 23,73 ^a	59,67 ± 10,02 ^a
Magnésio (mg/dL)	0,28 ± 0,13 ^a	0,26 ± 0,11 ^a	0,27 ± 0,18 ^a	0,30 ± 0,12 ^a
Proteínas Totais (g/dL)	3,58 ± 0,56 ^a	3,53 ± 0,40 ^a	4,06 ± 0,20 ^a	4,09 ± 0,20 ^a
Albumina (g/dL)	1,65 ± 0,33 ^a	1,74 ± 0,21 ^a	1,56 ± 0,18 ^a	1,61 ± 0,15 ^a
Fosfatase Alcalina (U/L)	32,29 ± 3,51 ^a	38,73 ± 7,55 ^a	33,27 ± 4,30 ^a	37,01 ± 4,56 ^a
Amilase (U/dL)	0,012 ± 0,004 ^a	0,010 ± 0,001 ^a	0,010 ± 0,002 ^a	0,011 ± 0,001 ^a
Creatinina (mg/dL)	0,60 ± 0,02 ^a	0,55 ± 0,06 ^a	0,56 ± 0,13 ^a	0,53 ± 0,08 ^a

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

Outros estudos também avaliaram o efeito hipoglicêmico do café, gerando, porém, resultados um pouco diferentes. No estudo de Abrahão *et al.* (2013), verificou-se que a ingestão de café por 30 dias foi capaz de reduzir a glicemia de ratos diabéticos, porém, não de ratos saudáveis. Já Rebello *et al.* (2011) conduziram um estudo com humanos asiáticos, com população multiétnica, aplicando questionário de hábitos e realizando testes bioquímicos, e não encontrou redução de glicemia com o consumo de café, mas alterações em outros marcadores do metabolismo glicêmico. A mesma ausência de interação foi obtida nos estudos de Wedick *et al.* (2011) e Van Djik *et al.* (2010). Assim, pouca evidência sobre a relação entre o consumo de café e a redução da glicemia em indivíduos saudáveis é encontrada, mas vários outros fatores de risco do desenvolvimento de diabetes tipo II têm sua expressão modificada com o consumo de café (SMITH *et al.*, 2006). A relação inversa entre o consumo de café e o risco para a diabetes tipo II é comprovada por metanálise nos trabalhos de Ding e colaboradores (2014).

Já em relação a outros parâmetros bioquímicos, Duarte *et al.* (2009) conduziram um estudo semelhante ao presente, avaliando colesterol e triglicérides, ácido úrico e parâmetros hematológicos em ratos saudáveis. No citado estudo também não ocorreu diferença significativa entre os grupos controle e tratado para ingestão crônica (30 dias), e houve similaridade entre os valores obtidos no teste de hemoglobina, único ensaio em comum realizado.

Lima *et al.* (2013) avaliaram a albumina sérica, encontrando diferença significativa entre as concentrações desse componente em ratos tratados com bebida filtrada de café em relação ao controle. Mas nesse estudo, o estresse oxidativo foi induzido pela administração de CCl₄, ou seja, não foram utilizados animais saudáveis, como no presente estudo.

Já a uréia no sangue foi avaliada no estudo de Abrahão *et al.* (2013), no qual não foi encontrada diferença significativa entre os valores determinados para ratos, tanto normais quanto diabéticos, tratados ou não com bebida de café.

A não influência do consumo do café na maioria dos parâmetros bioquímicos, no entanto, se não comprova novas propriedades benéficas, também indica a ausência de uma toxicidade elevada do café, como era anteriormente difundido. Assim, reforça-se a utilização do café como um alimento com potencial atividade biológica benéfica e reduzido risco.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VIVO

Os valores expressos na Tabela 4 se referem aos testes de atividade antioxidante *in vivo* realizados. Na avaliação dos resultados obtidos, não houve diferenças estatisticamente significativas entre o controle e os tratamentos, nem entre os tratamentos comparados entre si, para os testes de atividade antioxidante *in vivo* em extratos hepáticos dos animais tratados. Esse resultado contraria os ensaios *in vitro* realizados, que apontam em geral diferença significativa entre as atividades das três amostras. A não correspondência entre os resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* pode ser explicada pela ação do metabolismo dos animais tratados.

Tabela 4. Resultados dos ensaios de atividade antioxidante *in vivo* realizados nas amostras de fígado dos animais tratados

Amostra	TBARS (μmol de MDA/g de fígado \pm DP)	CAT ($\Delta\text{E}/\text{min}/\text{g}$ de proteína \pm DP)	GR ($\Delta\text{E}/\text{min}/\text{g}$ de proteína \pm DP)
Controle	4,44 \pm 1,31 ^a	349,44 \pm 299,11 ^a	378,39 \pm 143,01 ^a
Café filtrado	4,34 \pm 0,46 ^a	413,30 \pm 89,56 ^a	480,97 \pm 86,72 ^a
Café fervido	5,52 \pm 0,91 ^a	413,52 \pm 237,50 ^a	442,59 \pm 129,65 ^a
Café expresso	5,14 \pm 1,11 ^a	318,98 \pm 70,89 ^a	349,22 \pm 62,22 ^a

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

Macedo *et al.* (2013) desenvolveu um estudo em que foram feitas análises *in vivo* em três amostras de vinho tinto das quais já tinha sido feita a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* previamente. Comparando os resultados, também não foi observada correlação: para a concentração de MDA, não houve diferença significativa entre controle e amostras nem entre as amostras, com exceção daquela que tinha maior atividade *in vitro*. Já no teste da catalase, foi encontrada, inclusive, uma atividade maior na amostra que tinha menor atividade *in vitro*, mostrando, assim, uma não correspondência entre os resultados obtidos nos ensaios antioxidantes *in vitro* e *in vivo*, assim como no presente estudo. Foi discutido nesse trabalho que a correspondência entre estudos de atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* depende dos marcadores de estresse oxidativo escolhidos, ocorrendo menor correlação quando se avaliam as atividades e expressões de enzimas antioxidantes.

Segundo os resultados encontrados no estudo de Vicente *et al.* (2011), existe um pico de atividade das enzimas antioxidantes hepáticas 1 hora após o consumo de café, mas essa atividade diminui após esse tempo, voltando ao nível basal até 4 horas após o consumo. No presente estudo, os animais passam por um jejum de 12 horas até o sacrifício, o que diminuiria essa atividade. Entretanto, o consumo diário tende a aumentar os níveis basais e a atividade das enzimas

antioxidantes no fígado, como observado no estudo de Carvalho *et al.* (2011). Nesse estudo, porém, o tempo, em dias, a que os animais foram expostos ao tratamento foi maior – 90 dias –, sendo assim encontrada diferença entre controle e tratamentos.

Em outros estudos em que foram realizados testes de atividade antioxidante *in vivo*, quando considerados somente ratos saudáveis utilizando tratamentos com bebidas de café filtrado, também não foi encontrada diferença significativa entre controle e tratamentos no teste de TBARS (ABRAHÃO *et al.*, 2012; VIANA *et al.*, 2012). Os mesmos estudos, entretanto, encontraram diferença quando compararam ratos com alguma indução de estresse oxidativo – diabetes no primeiro e exercício físico extremo, no segundo, o que faz inferir que a diferença das atividades antioxidantes de controle e tratamentos se faz sentir em maior escala quando o estresse oxidativo é induzido.

Com outras amostras que não o café, também se observa que a atividade antioxidante se dá em maior grau quando há indução do estresse. Sarkhail *et al.* (2007) testou a espécie vegetal *Phlomis anisodonta* em experimento com ratos diabéticos, encontrando diferença significativa para TBARS e para a catalase. Já ROESLER (2011), testou a atividade antioxidante *in vivo* do araticum (*Annona crassiflora*), induzindo o estresse oxidativo nos animais previamente com tetracloreto de carbono (CCl₄). Em relação ao teste de TBARS, para os animais em que houve a indução do estresse, houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos, mas para aqueles em que não foi feita essa indução, não houve. Em relação às enzimas antioxidantes, porém diferenças foram encontradas mesmo entre controle saudável e tratamentos, porém, com diminuição da atividade, o que não é esperado.

É importante discutir que não foram encontrados estudos que avaliassem, *in vivo*, diferentes formas de extração para o preparo do café, ou seja, os estudos discutidos são referentes ao estudo de outros fatores que influenciam a atividade antioxidante. Tomando-se por base as discussões relativas a esses experimentos e os resultados obtidos no presente estudo, embora não tenha ocorrido diferença significativa entre as atividades antioxidantes *in vivo* dos grupos controle, café filtrado, café fervido e café expresso, outros estudos podem ser realizados para refinar esse resultado, modificando algumas das condições experimentais, como a modificação da relação entre a massa de café utilizada e o solvente utilizado, o aumento do tempo de tratamento ou tempo de análise após a ingestão do café e a indução do estresse oxidativo previamente nos animais.

CONCLUSÃO

Na avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, o café fervido apresentou menor atividade nos dois ensaios de atividade antioxidante realizados (DPPH e ABTS), o que pode indicar que esse método não favorece a extração, mas provavelmente acelera a degradação, de compostos antioxidantes. Com relação aos demais métodos extrativos, foi encontrada maior atividade antioxidante para o café expresso, no ensaio de DPPH, e não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no ensaio de ABTS, assim não sendo possível afirmar com precisão qual deles possui a maior atividade antioxidante.

A utilização diária de café, em um período de 30 dias, nos ensaios de atividade antioxidante *in vivo* reduziu a glicemia dos animais em todos os diferentes métodos extrativos utilizados. Essa redução pode ser consequência da atividade antioxidante do café, como também ser devida a mecanismos de ação específicos do ácido clorogênico. Com realização aos outros parâmetros bioquímicos estudados, verificou-se que a ingestão diária de café não os influenciou, o que afasta o risco de toxicidade elevada no consumo de café.

Assim, conclui-se, com a realização desse trabalho, que o consumo da bebida de café possui importantes benefícios fisiológicos, e que existe diferenças entre as atividades antioxidantes *in vitro* dos diferentes métodos extrativos, mas que, nas condições utilizadas no estudo, houve diferença significativa para redução de glicemia entre os métodos extrativos na atividade antioxidante *in vivo*.

Influence of the extraction method on chemical profile and “*in vitro*” and “*in vivo*” antioxidant activity of coffee beverages

ABSTRACT

Coffee, fruit of the coffee tree (genus *Coffea*), contains seeds that when roasted and ground generate one of the most consumed beverages in the world. To coffee consumption are attributed many health effects, most of them linked to their antioxidant properties. The components of coffee linked to this activity are mainly polyphenols, caffeine and melanoidins. Thus, this study aimed to measure the antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of coffee beverages obtained from different types of preparation (extraction). For this, were prepared from the same sample of roasted and ground coffee drinks at concentration of 10 g/L in the forms of filtered (infusion), boiled (decoction) and espresso (pressure) and were performed antioxidant activity assays *in vitro* (DPPH and ABTS) and *in vivo* using healthy animals subjected to a daily dosage equivalent to drink 350 mL for an adult of 70 kg, in whose livers were determined the activities of catalase and glutathione reductase and the extent of peroxidation by TBARS, beyond the determination of some biochemical parameters in blood. *In vitro*, boiled coffee had lower activity than the others, and the filtered coffee showed the highest activity in the DPPH assay and espresso in the ABTS assay. About the biochemical parameters, there were significant differences only for blood glucose, which was greater in control animals than in treatments with coffee. In conclusion, coffee reduced blood glucose, probably due to the presence of its bioactive compounds.

KEYWORDS: coffee; antioxidant activity; extraction method.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; SOUSA, R. V.; LIMA, A. R., CREMA, G. P., BARROS, B. S. Influence of Coffee Brew in Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, p. 184– 189, 2013.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, Florida, v. 105, p. 121-126, 1984.

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.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. **Associação Brasileira das Indústrias de Café (ABIC)**. [acesso em set/2017]. Disponível em: <http://www.abic.com.br>

BUEGE, J. A., AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**; v. 52: 302-10, 1978.

CAMPOS-FLORIÁN, J., BARDALES-VALDIVIA, J., CARUAJULCA-GUEVARA, L., CUEVALLANOS, D. Anti-diabetic effect of *Coffea arabica*, in alloxan-induced diabetic rats. **Emirates Journal of Food and Agriculture**. v. 25, n. 10, p. 772-777, 2013

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 5475-5480, 1975.

CARVALHO, D. C.; BRIGAGÃO, M. R. P. L.; SANTOS, M. H.; DE PAULA, F. B. A.; GIUSTIPAIVA, A.; AZEVEDO, L. Organic and Conventional *Coffea arabica* L.: A Comparative Study of the Chemical Composition and Physiological, Biochemical and Toxicological Effects in Wistar Rats. **Plant Foods Human Nutrition**, vol. 66, p.114–121, 2011.

CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee: Chemistry**. Cap 1: Chemistry. Vol. 1. Elsevier science publishers LTD, 1985.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; VARÌ, R.; SCAZZOCCHIO, B.; MASELLA, R.; Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. **International Journal of. Molecular Sciences**, vol. 11, p.1321-1342, 2010.

DEL CASTILLO, M.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. Effect of Roasting on the Antioxidant Activity of Coffee Brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 50, n.13, p. 3698-3703, 2002.

DING M., BHUPATHIRAJU S.N., CHEN M., VAN DAM R. M., HU F. B. Caffeinated and Decaffeinated Coffee Consumption and Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review and a Dose-Response Meta-analysis. **Diabetes Care**. v. 37, n.2, p. 569-586, 2014.

DUARTE, S. T. S., ABREU, C. M. p., MENEZES, H. C., PAULA, F. B. A., PEREIRA, R. G. F. A., GOUVÊA, C. M. C. P. Efeito da bebida de café descascados sobre a atividade antioxidante, os parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 703-708, 2009.

HENRIQUES, B.O.; CASTILHO, R. O.; BRAGA, F. C. Avaliação da atividade antioxidante em modelo de DPPH de produtos naturais em micro-escala. Trabalho apresentado no 22. Simpósio de Plantas Mediciniais 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, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)** . 2008. 178p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) -Universidade de São Paulo, São Paulo.

LIMA, A. R.; PEREIRA, R. G. F. A.; ABRAHÃO, S. A.; DUARTE, S. M. S.; PAULA, F. B. A. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante *in vitro* do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Química Nova**, vol. 33, no. 1, p. 20-24, 2010.

LIMA, A. R., PEREIRA, R. G. F. A., ABRAHÃO, S. A., ZANGERONIMO, M. G., PAULA, F. B. A., DUARTE, S. M. S. Effect of decaffeination of green and roasted coffees on the *in vivo* antioxidant activity and prevention of liver injury in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 506-512, 2013.

LUDWIG, I. A., SANCHEZ, L., CAEMMERER, B., KROH, L. W., DE PEÑA, M. P., CID, C. Extraction of coffee antioxidants: Impact of brewing time and method. **Food Research International**, v. 48, p. 57–64, 2012.

MACEDO, L. F. L., ROGERO, M. M., GUIMARÃES, J. P., GRANATO, D., LOBATO, L. P., CASTRO, I. A. Effect of red wines with different *in vitro* antioxidant activity on oxidative stress of high-fat diet rats. **Food Chemistry**, v. 137, p. 122–129, 2013

MAHER, J. Coffee is berry, berry good for you. **Dynamic Chiropractic**, v.28, n.10, 2010.

MOLLOY, J. W., CALCAGNO, C. J., WILLIAMS, C. D., JONES, F. J. TORRES, D. M., HARRISON, S. A. Association of Coffee and Caffeine Consumption With Fatty Liver Disease, Nonalcoholic Steatohepatitis, and Degree of Hepatic Fibrosis . **Hepatology**, vol. 55, n. 2, p. 429-436, 2012.

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.

PERRONE, D.; FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Influence of Coffee Roasting on the Incorporation of Phenolic Compounds into Melanoidins and Their Relationship with Antioxidant Activity of the Brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 4265–4275, 2012.

REBELLO, S. A., CHEN, C. H., NAIDOO, N., XU, W., LEE, J., CHIA, K. S., TAI, S., DAM, R. M. V. Coffee and tea consumption in relation to inflammation and basal glucose metabolism in a multi-ethnic Asian population: a cross-sectional study. **Nutrition Journal**, v. 10, p. 61-70, 2011

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.

SARKHAIL, P., RAHMANIPOUR, S., FADYEVATAN, S., MOHAMMADIRAD, A., DEGHAN, G., AMIN, G., SHAFIEE, A., ABDOLLAHI, M. Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: Effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. **Pharmacological Research**, vol. 56, p. 261–266, 2007.

SMITH, B., WINGARD, D. L., SMITH, T. C., KRITZ-SILVERSTEIN, D., BARRETT-CONNOR, e. Does Coffee Consumption Reduce the Risk of Type 2 Diabetes in Individuals With Impaired Glucose? **Diabetes Care**, v. 29, n. 11, p. 2385-2390, 2006

SILVA, A. M. O.; ANDRADE-WARTH, E. R. S.; CARVALHO, E. B. T.; LIMA, A.; NOVOA, A. V.; MANCINI-FILHO, J. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Revista de Nutrição**, vol. 24, n.1, p. 12-130, 2011.

SOUZA, R. M. N.; BENASSI, M. T. Discrimination of Commercial Roasted and Ground Coffees According to Chemical Composition. **Journal of Brazilian Chemical Society**, vol. 23, n. 7, p. 1347-1354, 2012.

WEDICK, N. M., BRENNAN, A. M., SUN, Q., HU, F. B., MANTZOROS, C. S., DAM, R. M. V. Effects of caffeinated and decaffeinated coffee on biological risk factors for type 2 diabetes: a randomized controlled trial. **Nutrition Journal**, v. 10, p. 93-101, 2011

VAN DER ENDE, W.; PESHEV, 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.

VAN DIJK, A. E., OLTHOF, M. R., MEEUSE, J. C., SEEBUS, E., HEINE, R. J., DAM, R. M. V. Acute Effects of Decaffeinated Coffee and the Major Coffee Components Chlorogenic Acid and Trigonelline on Glucose Tolerance. **Diabetes Care**, v. 32, n. 6, p. 1023-1025, 2009

VIANA, A. L. M.; FONSECA, M. D. M.; MEIRELES, E. L. J.; DUARTE, S. M. S.; RODRIGUES, M. R.; PAULA, F. B. A. Effects of the Consumption of Caffeinated and Decaffeinated Instant Coffee Beverages on Oxidative Stress Induced by Strenuous Exercise in Rats. **Plant Foods Human Nutrition**, vol. 67, p. 82-87, 2012.

VICENTE, S. J. V., ISHIMOTO, E. Y., CRUZ, R. J., PEREIRA, C. D. S., TORRES, E. A. F. S. Increase of the Activity of Phase II Antioxidant Enzymes in Rats after a Single Dose of Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 59, p. 10887-10892, 2011.

VIGNOLI, J. A., BASSOLI, D. G., BENASSI, M. T. Atividade Antioxidante De Cafés Torrado e Solúvel: Padronização e Validação de Métodos. **Coffee Science**, v. 7, n. 1, p. 68-75, 2012.

Recebido: 04 jan. 2017.

Aprovado: 12 mar. 2019.

DOI: 10.3895/rebrapa.v9n2.5270

Como citar:

RABELO, D. M. **et al.** Influência do método de extração de café no perfil químico e atividade antioxidante “in vitro” e “in vivo” nas bebidas. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 9, n. 2, p. 150-169, abr./jun. 2018. Disponível em: <https://periodicos.utfpr.edu.br/rebrapa>

Correspondência:

Renata Adriana Labanca. Faculdade de Farmácia. Departamento de Alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais, CEP: 31270-010, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Direito autoral: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

