

ACÇÃO ANTIOXIDANTE DE *Coffea arabica* CULTIVAR MUNDO NOVO IAC 388-17 EM DIFERENTES GRAUS DE TORRA

Tiago Albuquerque F. P. BANDEIRA¹, E-mail: tiagobiomol@terra.com.br; Davi Loures ROSA¹; Renata Velôzo TIMBÓ¹; Cristiana GASPARI-PEZZOPANE²; Miriam Perez MALUF⁴; Alba Chiesse da SILVA⁴; Vera L P POLEZ¹; Élide G CAMPOS¹

¹Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF; ²Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”; ³Instituto Agronômico de Campinas; ⁴Embrapa Café, Brasília, DF.

Resumo:

O café é uma das bebidas mais consumidas no Brasil e no mundo, e sua produção agrícola está intimamente ligada com a economia global. Neste caso, é fundamental o conhecimento profundo da sua relação com a saúde, bem-estar e a fisiologia dos seres humanos. Dentre as várias propriedades que o café pode apresentar, este trabalho visa estudar as propriedades antioxidantes em relação ao grau de torra. Utilizamos técnicas bioquímicas para investigar a proteção de amostras de café contra o dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio às moléculas de DNA e lipídios *in vitro*. Foi investigada a ação protetora do café do cultivar Mundo Novo IAC 388-17. Os resultados de dano ao DNA e a proteção à peroxidação lipídica demonstraram que as amostras de café testadas apresentam propriedades antioxidantes semelhantes levando-se em consideração diferentes escalas de torra. Amostras de café classificadas de acordo com suas propriedades antioxidantes devem ser muito úteis para investigações sobre os possíveis benefícios à saúde dos antioxidantes presentes na bebida.

Palavras-chave: café, cultivares, *Coffea arabica*, dano oxidativo, antioxidante, estresse oxidativo, radical livre.

ANTIOXIDANT PROPERTY OF *Coffea arabica* CULTIVAR MUNDO NOVO IAC 388-17 WITH DIFFERENT DEGREES OF ROASTING

Abstract:

Coffee is one of the most consumed drinks in Brazil and around the world, and its agricultural production is intimately linked to the global economy. In this case, a deeper knowledge about its relation to human health, well-being, and physiology is fundamental. Among the various properties attributed to coffee, this work aims at studying the antioxidant properties regarding degrees of roasting. We used biochemical techniques to investigate the protection afforded by coffee samples against the oxidative damage caused by reactive oxygen species to DNA and lipid biomolecules. The protective action of seeds of *Coffea arabica* cultivar Mundo Novo IAC 388-17 was investigated. The DNA and lipid damage results showed that the coffee samples tested have similar antioxidant properties in regard to roasting scales. Coffee samples classified according to their antioxidant properties may be useful for investigations on the health benefits due to antioxidants present in the drink.

Key words: Coffee cultivars, *Coffea arabica*, oxidative damage, antioxidant, oxidative stress, free radicals.

Introdução

A vida na presença de oxigênio apresenta como desafio a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o radical superóxido $O_2^{\bullet-}$ e o peróxido de hidrogênio, H_2O_2 . A primeira reação responsável pela geração de H_2O_2 é a transferência de elétrons para o oxigênio molecular (O_2), o que produz o radical superóxido. Na ausência da enzima superóxido dismutase (SOD), o $O_2^{\bullet-}$ é consumido por uma reação de dismutação pH-dependente que gera H_2O_2 e O_2 . Nas células, no pH fisiológico de 7,4, a SOD catalisa a reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , o que representa uma vantagem cinética sobre a dismutação espontânea. O H_2O_2 é decomposto a H_2O por enzimas antioxidantes tais como catalase, glutathione peroxidase e peroxiredoxina. As células também possuem antioxidantes não-enzimáticos de baixo peso molecular tais como o ácido ascórbico, alfa-tocoferol, alfa-caroteno, e ácido úrico. As EROs, $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , reagem na presença de Fe^{2+} ou outros metais de transição, gerando uma molécula ainda mais reativa, o radical hidroxila (HO^{\bullet}). Um radical é um átomo ou molécula com elétron desemparelhado e, portanto, bastante reativa. O HO^{\bullet} pode danificar as biomoléculas levando, em último caso, a uma destruição da célula. O desbalanço entre a formação de radicais livres e os mecanismos envolvidos em eliminá-los resulta na condição de estresse oxidativo, uma condição subjacente em muitas doenças (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Alimentos que contêm grandes quantidades de antioxidantes naturais são muito importantes na manutenção da saúde e prevenção de doenças, pois seus antioxidantes podem prevenir o estresse oxidativo. Uma extensa análise dos estudos publicados sobre a eficácia e segurança do uso de suplementos multivitamínicos e minerais para prevenir o câncer e doenças crônicas na população em geral concluiu recentemente que não há evidência suficiente para provar tais efeitos (Huang et al.,

2006). Tem sido sugerido que outros fitoquímicos com ação redox sejam mais efetivos e que uma combinação de diferentes componentes com ação redox (antioxidantes e redutores) seja necessária para a proteção adequada contra o dano oxidativo.

Os resultados de pesquisas e levantamentos de 2006 realizados pela empresa InterScience e disponíveis no site da ABIC (Associação Brasileira da Indústria do Café - http://www.abic.com.br/estat_pesquisas.html) mostram que 94% da população brasileira consome café (em diferentes quantidades). Esta grande adesão ao consumo de café revela a importância de constantes pesquisas sobre as qualidades do café e seus benefícios à saúde. Sendo assim, este estudo tem como objetivo avaliar as propriedades antioxidantes de amostras de café usando ensaios que nos permitam analisar um grande número de amostras diferentes de café e distingui-los em termos dessas propriedades. Amostras de café classificadas de acordo com suas propriedades antioxidantes devem ser muito úteis para investigações sobre os possíveis benefícios à saúde dos antioxidantes presentes na bebida.

A prevenção do dano oxidativo a moléculas de DNA e lipídios, por amostras de café, foi avaliada usando ensaios *in vitro*, onde EROs são formadas a partir de Fe^{2+} e H_2O_2 ou a partir de $Fe^{2+}/EDTA$ (ácido etilenodiaminotetracético) e citrato (Hermes-Lima et al., 1994; Hermes-Lima et al., 1998). A reação radicalar em ambos os ensaios foi induzida pelo radical hidroxil (HO^\bullet) obtido a partir da Reação de Fenton (Hermes-Lima, 2004) que obedece essencialmente a seguinte reação: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO^\bullet$ (Kocha, T et al, 1997). O dano ao DNA foi quantificado determinando-se a diminuição da forma de DNA super-enovelada do plasmídeo pUC18 após o ataque oxidativo, através de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo. O dano a lipídios presentes em homogeneizado de fígado de rato foi quantificado medindo-se o produto da reação entre os produtos da peroxidação lipídica (principalmente malondialdeído) e o ácido tiobarbitúrico (TBA) a 532 nm. Os resultados revelaram que os cafés com diferentes graus de torra, provenientes do cultivar de *Coffea arabica* Mundo Novo IAC388-17, apresentam-se de forma semelhante no que diz respeito à proteção ao dano oxidativo ao DNA e aos lipídios.

Material e Métodos

Foram usadas nos experimentos, amostras de grãos de *Coffea arabica* do cultivar Mundo Novo IAC 388-17 provenientes do Estado de SP, Campinas. Foi utilizado o método convencional de torra. Frutos cereja de café recém-colhidos e despulpados foram secos ao sol até atingir umidade de 12%. Em seguida os grãos foram beneficiados para remoção do pergaminho e da película prateada (amostra de grãos verdes). A torra foi conduzida em torrador manual, até atingir os pontos de torra segundo a escala da Specialty Coffee Association of America (SCAA). As seguintes amostras de café foram utilizadas neste estudo:

Tabela 1. Descrição das amostras de café testadas.

Cultivar	Denominação da Torra	Abreviação	Escala de Torra
Mundo Novo	Verde	V	Sem torra
Mundo Novo	Fora de escala	FE	Fora da escala
Mundo Novo	Very light	VL	SCAA 95
Mundo Novo	Moderately light	ML	SCAA 75
Mundo Novo	Light Medium	LM	SCAA 65
Mundo Novo	Dark	D	SCAA 35

Preparo das amostras

As amostras foram maceradas e pesadas em seguida 1,5 g foram fervidas por cinco minutos em 25 mL de água Milli-Q. A seguir as amostras foram filtradas em papel de filtro sob pressão atmosférica e imediatamente utilizadas. Neste caso, para o ensaio de TBA-RS duas alíquotas de 1 mL do filtrado foram coletadas; uma delas foi centrifugada a 12.000 RPM por 15 min a 4 °C e a outra foi liofilizada para determinação da massa seca utilizada nos ensaios. O sobrenadante foi diluído 1:20 em H_2O Milli-Q. No ensaio de dano ao DNA, apenas uma alíquota foi coletada do filtrado obtido inicialmente foi diluído em 1:2 e 1:10. Todo o processo de preparo das amostras foi repetido a cada experimento, e em cada ensaio usavam-se amostras frescas. Os experimentos foram realizados em triplicatas em dias diferentes.

Ensaio de dano ao DNA

O plasmídeo pUC18 foi usado neste experimento e quando exposto à ação oxidativa do radical hidroxila (HO^\bullet), perde sua forma super-enovelada e assume uma forma circular aberta (Hermes-Lima et al 1998) indicando o dano gerado na biomolécula por este radical. Essas duas formas são observadas em um gel de agarose 0,9% (p/v) corado com brometo de etídeo 0,6 μ g/mL de acordo com Hermes-Lima e colaboradores (1998). Conforme a metodologia descrita, foram realizados: 1) controle com dano, o plasmídeo foi exposto à ação do radical hidroxila; 2) controle sem dano, o plasmídeo não foi exposto à ação de um agente oxidante; 3) controle sem Fe^{2+} e 4) controle sem H_2O_2 . Os resultados obtidos juntamente com os controles foram analisados em um transluminador de luz UV e fotografadas em formato .tif para depois serem quantificados por densitometria pelo software comercial ImageQuant 5.2. As análises estatísticas foram desenvolvidas pelo programa MYNOVA.

Ensaio de TBA

A fonte de lipídios usada nos ensaios de TBA-RS foi obtida a partir do homogeneizado de fígado de rato na concentração final de 62,5mg/mL. HEPES 50mM pH 7.4.

Para o ensaio de TBA-RS a reação continha: 10 mM de tampão HEPES pH 7.4; 12,5 mM de KCl, 0,4 mM citrato de sódio, 1 mM H₂O₂, 0,2 mM Fe(NH₄)₂ (SO₄)₂. 6 H₂O, homogeneizado de fígado de rato e as amostras de café diluídas 1:20 do filtrado inicial. Foram realizados quatro controles: 1) contendo 0,1 mM do antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT); 2) sem homogeneizado (Hgtto); 3) sem Fe²⁺ / H₂O₂; e 4) a reação completa parada no tempo zero pela adição de ácido fosfórico e TBA. As reações (exceto controle 4) foram incubadas por 90 min à temperatura ambiente e paradas pela adição de 100 µl de ácido fosfórico 7% (vol/vol) e 200µl de TBA 1% (p/v). Em seguida, os ensaios foram incubados a 98 °C por 15 minutos. Em seguida foram diluídas 1:2 em H₂O Milli-Q e lidas no espectrofotômetro (Hitachi 2000) nos comprimentos de onda de 532 nm e 600 nm. Para a obtenção do resultado final, as leituras a 600 nm foram subtraídas das leituras a 532 nm e a absorção final calculada usando a seguinte fórmula: AbsEnsaio – [(AbsFeSO₄ /H₂O₂ + AbsTempo zero)/2]. As análises estatísticas foram desenvolvidas pelo programa MYNOVA.

Resultados e Discussão

Os grãos de café Mundo Novo IAC 388-17 torrados em diferentes graus da escala, foram submetidos aos experimentos de dano ao DNA e TBA-RS. As concentrações das amostras utilizadas nos respectivos ensaios foram deduzidas pela liofilização de alíquotas de 1mL coletadas logo após a preparação para cada um dos respectivos ensaios. A massa seca utilizada nos ensaios foi pesada e está apresentada na tabela 2. Para os ensaios de dano ao DNA foram usadas duas diluições (1:2 e 1:10) do preparado bruto. No ensaio de TBA-RS foi usada apenas uma diluição (1:20) do extrato bruto.

Tabela 2. Média das concentrações de amostras usadas no ensaio de dano ao DNA e TBA-RS obtidas a partir da liofilização de alíquotas das mesmas, logo depois de preparadas.

Amostra	Concentração final usada na reação. (µg/mL). Diluição 1:20		
	Concentração final usada na reação (µg/mL)		
	TBA-RS	Dano ao DNA	
		1:2	1:10
Verde	49,75	722	576
Fora de escala	54,00	745	596
Very light	55,75	955	764
Moderately light	46,75	687	548
Light Medium	87,50	807	644
Dark	62,50	920	736

Os ensaios de dano ao DNA nos mostraram que mesmo variando o grau de torra, a proteção oferecida pelo café contra o dano provocado pela oxidação dessa biomolécula através do radical hidroxil, mostra-se constante. Duas concentrações diferentes foram usadas nesse ensaio, usamos 2 µl das amostras diluídas 1:2 do extrato bruto (fig 1a) e 8 µl das amostras diluídas em 1:10 do filtrado bruto (fig.1b) e ambas mostraram que não há diferenças significativas quanto à proteção ao dano em função do grau de torra do grão.

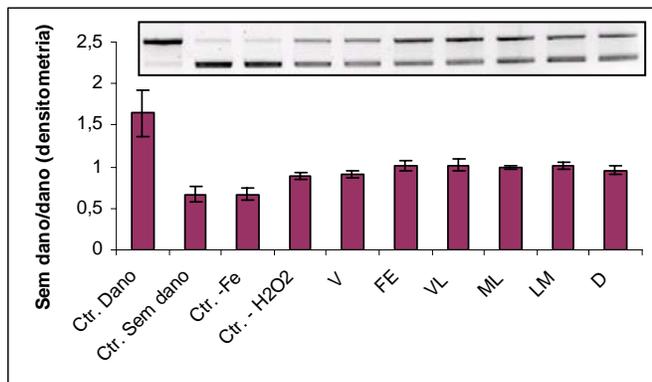


Figura 1a. Análise densitométrica do ensaio de dano ao DNA usando 2 µl de extrato 1:2 a partir do filtrado bruto.

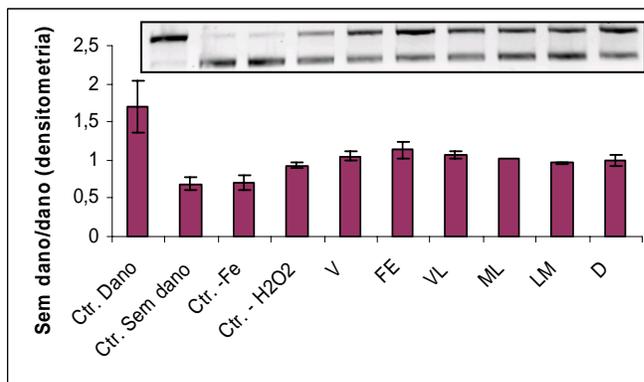


Figura 1b. Análise da densitometria do resultado do ensaio de dano ao DNA usando 8 µl de extrato diluído 1:10.

Foi realizado também um ensaio de TBA-RS no qual um sistema gerador de radicais é acionado por Fe^{2+} e H_2O_2 desencadeando a reação de Fenton, gerando como produto final o radical hidroxil, extremamente reativo que pode oxidar lipídios formando radicais lipídicos que por sua vez atacam outros lipídios até que já não hajam mais. Testamos o potencial antioxidante dos extratos de café nesse sistema, e foi observado que o aumento gradual da torra dos grãos do cultivar Mundo Novo IAC 388-17 também protege gradualmente os lipídios de sofrerem danos oxidativos (fig. 2). O extrato do grão com maior grau de torra é aquele cuja proteção contra a peroxidação lipídica é maior. O dano aos lipídios é mensurado a partir da formação de MDA, sendo que sua medida é feita por espectrofotometria a 532nm.

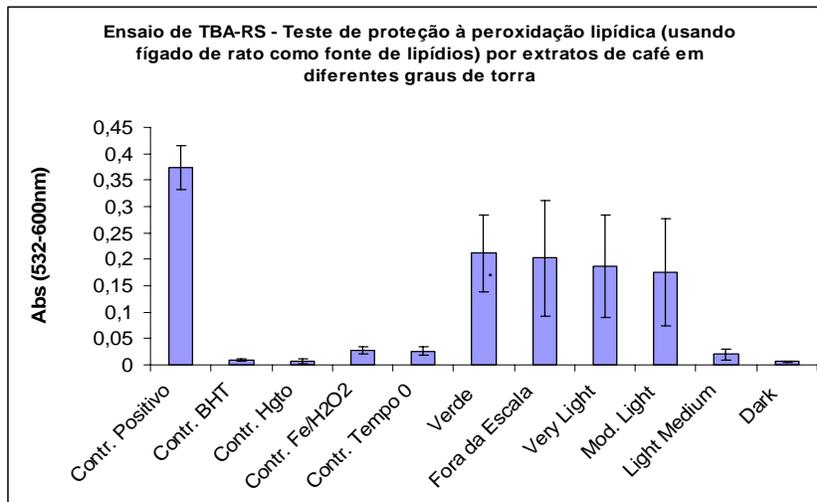


Figura 2. Ensaio de TBA-RS usando os extratos de café diluídos 1:20 do filtrado inicial para um volume de 200 µl finais.

Segundo os métodos utilizados foi mostrado que quando expostos a condições de estresse oxidativo, lipídios e DNA são protegidos quando na presença de café, independentemente do grau de torra no qual o grão se encaixe. Baseados nos resultados obtidos, pretende-se otimizar as metodologias para obtenção de diferenças estatisticamente significativas nas amostras analisadas.

Conclusão

Verificamos que as amostras de café analisadas são capazes de proteger *in vitro* biomoléculas importantes como o DNA e lipídios contra o dano oxidativo. Podemos atribuir tal ação a um componente não protéico, uma vez que as amostras de café foram torradas e fervidas e mesmo assim ainda apresentaram proteção antioxidante. A identificação e caracterização dessas moléculas com potencial antioxidante presentes em extratos brutos de café têm sido alvo de grande interesse de pesquisa ultimamente, já que o café é altamente produzido, comercializado e consumido no Brasil e em muitos outros países. O melhor entendimento de como essas moléculas atuam em sistemas biológicos é necessário para termos dados cientificamente comprovados que dêem suporte a um uso correto e eficaz desta bebida.

Referências Bibliográficas

- de Avellar, I.G.; Magalhaes, M.M.; Silva, A.B.; Souza, L.L.; Leitao, A.C.; Hermes-Lima, M. (2004) Reevaluating the role of 1,10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage. *Biochemistry and Biophysics Acta*. 16753 46-53.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, New York.
- Hermes-Lima, M. (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed), *Funcional metabolism regulation*. John & Sons, New York, pp. 319-368.
- Hermes-Lima, M.; Nagy, E.; Ponka, P.; Schulman, H.M.(1998) The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) protects plasmid pUC-18 DNA against *OH-mediated strand breaks. *Free Radical Biology and Medicine*. 25:875-880.

- Hermes-Lima, M.; Wang, E.M; Schulman, H.M., Storey, K.B.;Ponka, P. (1994) Deoxyribose degradation catalyzed by Fe(III)-EDTA: kinetic aspects and potential usefulness for submicromolar iron measurements. *Molecular and Cellular Biochemistry* 137:65-73.
- Huang, H.Y.; Caballero B.; Chang, S.; Alberg, A.J.; Semba, R.D.; Schneyer, C.R.; Wilson, R.F.; Cheng, T.Y.; Vassy, J.; Prokopowicz, G.; Barnes, G.J.^{2nd}; Bass, E.B. (2006) The efficacy and safety of multivitamin and mineral supplement use to prevent cancer and chronic disease in adults: a systematic review for a National Institutes of Health state-of-the-science conference. *Annals of Internal Medicine*. 145:372-385.
- Kocha, T.; Yamaguchi, M.; Ohtaki, H.; Fukuda, T.; Aoyagi, T. (1997) Hydrogen peroxide-mediated degradation of protein: different oxidation modes of copper- and iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin. *Biochemistry and Biophysics Acta*. 1337:319-326.