

EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DE CAFÉ (*Coffea arabica*, L.) NO TECIDO HEPÁTICO DE RATOS

Fabiana Amaral ARAUJO¹, E-mail: faraujo@usp.br; Jorge MANCINI-FILHO¹, E-mail: jmancini@usp.br

¹Departamentos de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo

Resumo:

Pesquisas recentes apontam efeitos fisiológicos benéficos do consumo de café atribuídos a diversos compostos nele presentes entre os quais se encontram os compostos fenólicos. O café (*Coffea arabica*, L.) foi submetido a uma intensidade de torra média (180°C/10 min) visando preservar o conteúdo de ácidos fenólicos. A atividade antioxidante foi analisada *in vivo* após suplementar por gavagem os ratos por 30 dias com doses de (4 mg/kg P.C., 2 mg/kg P.C., 1 mg/kg P.C., e 0,5 mg/kg P.C.). A lipoperoxidação hepática foi analisada pelo método de TBARS e foi observada redução significativa dos níveis de malonaldeído dos grupos experimentais em relação ao grupo controle. Também foi observado efeito dose-resposta entre os grupos tratados com o extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min.

Palavras-chave: café, compostos fenólicos, antioxidantes, radicais livres, TBARS, ratos Wistar.

ANTIOXIDANT EFFECTS OF AQUEOUS EXTRACT OF COFFEE (*Coffea arabica*, L.) IN LIVER HEPATIC OF RATS

Abstract:

Recent researches indicate beneficial physiological effects of coffee consumption attributed to diverse compounds on it present among that are phenolic compounds. Coffee (*Coffea arabica*, L.) was submitted to a middle roast intensity (180°C/10 min) aiming to preserve the phenolic acids content. The antioxidant activity was analyzed *in vivo* after supplement for 30 days with doses of (4 mg/kg P.C., 2 mg/kg P.C., 1 mg/kg P.C., e 0,5 mg/kg P.C.). The liver lipoperoxidation was analysed by TBARS method and was observed significant reduction of malonaldehyd levels of experimental groups in relation to control group. Besides was observed dose-response effect between supplemented groups with aqueous extract of coffee roasted to 180°C/10 min.

Key words: coffee, phenolic compounds, antioxidant, free radical, TBARS, Wistar rats.

Introdução

Os radicais livres são continuamente produzidos durante as reações fisiológicas tanto durante a homeostase quanto em quadros patológicos. Porém quando os mecanismos de defesa do organismo não são suficientes para combatê-los ocorre o estresse oxidativo podendo causar injúria tecidual em alvos celulares vulneráveis a oxidação como DNA, proteínas e lipídios (Yeum et al., 2004). Muitas evidências sugerem a ação dos radicais livres na fisiopatologia de doenças crônicas não transmissíveis como câncer, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas e aterosclerose (Krings, et al., 2006).

Por outro lado, em estudos epidemiológicos verificou-se que o consumo de alimentos com alto teor de compostos antioxidantes está correlacionado a um menor risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, doenças inflamatórias e neurodegenerativas (Nardini et al., 2002; Natella et al., 2002; Andueza, Cid e Nicoli, 2004, Yanagimoto et al., 2004; Hington e Frei, 2006; Santos et al., 2006).

O consumo de café representa um dos hábitos mais comuns no mundo (Okamura et al., 2005; Ozercan et al., 2006). Além de ser uma bebida muito apreciada por seus atributos sensoriais o café contém elevados teores de ácidos clorogênicos (Gonthier et al., 2003).

Os ácidos clorogênicos constituem um grupo de compostos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico formados principalmente pela esterificação do ácido quínico com os ácidos cinâmico, caféico, ferúlico ou pelo ácido *p*-cumárico (AZUMA al., 2000). Pesquisas recentes apontam efeitos fisiológicos benéficos do consumo de café atribuídos a diversos compostos nele presentes entre os quais se encontram os compostos fenólicos. Entre esses benefícios podem ser citadas as atividades biológicas apresentadas pelos compostos presentes no café: efeito anticarcinogênico, antiinflamatório, antiaterogênico, e antioxidante (Balasubashini et al., 2004; Santos et al., 2006).

A elevada atividade antioxidante da bebida de café é atribuída à presença dos ácidos fenólicos como o ácido 5-*O*-clorogênico, ferúlico, caféico, sinápico, *p*-cumárico entre outros (Andueza, Cid e Nicoli, 2004). A atividade antioxidante desses compostos é exercida mediante quelação de metais, seqüestro de radicais livres e doação de elétron e hidrogênio (Krings et al., 2006). Diante do exposto este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante do café no tecido hepático em ratos que receberam diferentes doses do extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min.

Material e Métodos

A amostra de café (*Coffea arabica*, L.), safra março/2003, proveniente da região sul do estado de Minas Gerais, foi gentilmente cedida pela Companhia Cacique de Café Solúvel (Londrina – PR).

Torrefação: Os grãos foram divididos em quatro lotes, dos quais três foram submetidos à torrefação nas seguintes condições: 140°C/20 min, 160°C/20 min e 180°C/20 min.

Obtenção dos extratos: A obtenção dos extratos foi feita por extração sequencial, utilizando solventes de polaridade crescente (ARAÚJO e MANCINI-FILHO, 2004). A proporção de amostra/solvente utilizada foi 1:5 para o café *in natura* e 1:20 para as amostras torradas. Inicialmente, a amostra e o éter etílico foram misturados nas proporções citadas e agitados em um homogenizador por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi filtrada a vácuo e o volume completado para o valor do volume inicial do solvente em uso. O resíduo foi seco à temperatura ambiente e usado para o cálculo da obtenção dos extratos etanólico e aquoso, seguindo as mesmas etapas para obtenção do extrato etéreo.

Araújo e Mancini, 2003 avaliaram a atividade antioxidante dos extratos de café *in natura* e café torrado em diferentes condições de tempo e temperatura pelo método do β -caroteno e ácido linoléico. Nesse estudo verificou-se que as maiores porcentagens de inibição da oxidação *in vitro* foram observadas para os extratos aquosos das amostras torradas não havendo diferença significativa entre elas ($p < 0,05$). Como a amostra torrada a 180°C/10 min está mais próxima da torra comercial do Brasil (200°C por 19-20 min) ela foi selecionada para realização do ensaio biológico.

Avaliação da atividade antioxidante *in vivo* pelo método de TBARS: O projeto de pesquisa com animais foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O experimento teve duração de 30 dias. Após o desmame foi feito um período de adaptação de 4 dias antes do início dos tratamentos. Os ratos foram divididos, aleatoriamente, em 5 grupos ($n = 8$). A suplementação dos animais foi feita diariamente, durante 30 dias e consistiu na administração, por gavagem, de extrato aquoso de café nas doses apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1 Identificação dos grupos de animais dos experimentos

Grupos experimentais	Tratamentos
Controle	Água 200 μ l/50g de peso corpóreo
Grupo 1	4 mg/g de peso corpóreo
Grupo 2	2 mg/g de peso corpóreo
Grupo 3	1 mg/g de peso corpóreo
Grupo 4	0,5 mg/g de peso corpóreo

Após 30 dias os animais foram sacrificados por decapitação e os tecidos hepáticos dos animais do grupo controle e dos grupos experimentais foram coletados e armazenados a -80°C até o momento das análises.

A análise da lipoperoxidação nos tecidos hepático dos animais do grupo controle dos grupos tratados com extrato aquoso do café torrado a 180°C/10 min através da medida das concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) segundo metodologia descrita por Winterbourn, Gutteridge e Halliwell (1985). Foram preparados homogenatos dos tecidos utilizando-se tampão fosfato de sódio 10 mM, pH = 7,4. Alíquotas de 500 μ L do sobrenadante (preparado com tampão fosfato) foram usadas em tubo de ensaio e acrescentaram-se 500 μ L de HCL a 25% (v/v), 45 μ L de BHT etanólico 2% (p/v) e 500 μ L de TBA 1% (p/v) em NaOH 0,05M. Esta mistura foi homogeneizada e colocada em banho-maria fervente por dez minutos. Durante o banho-maria se desenvolveu uma coloração avermelhada.

Após serem resfriados em banho de gelo, os tubos foram destampados e a cada um adicionaram-se 1,5 mL de n-butanol. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada a 4000 rpm, a 4°C por dez minutos. Feito isto, foram coletadas as fase superiores para realização da leitura da absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 532 nm. Todas as determinações foram feitas em triplicata e foi usado n-butanol puro utilizando-se como branco. Para os cálculos foi feita uma curva padrão com 1,1,3,3-tetrametoxipropano (6×10^{-6} mol/L). Os resultados foram expressos em μ Mol de equivalentes de MDA/mg de proteína.

A determinação do conteúdo de proteínas no homogenatos dos tecidos cerebral, cardíaco, hepático e plasmático foi realizada segundo o método de Bradford (1985). Alíquotas de 20 μ L do homogenato do tecido analisado foram completados com 1 mL com água destilada e adicionadas de 100 μ L de reagente de Bradford. A mistura foi agitada, e após dez minutos, foram realizadas as leituras das absorbâncias a um comprimento de onda de 595 nm. O controle foi preparado substituindo a amostra por igual volume de água. Foi feita uma curva padrão de proteína com solução padrão de albumina bovina sérica.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguida de um teste de comparação de médias de Turkey com 5% de significância.

Resultados e Discussão

Tabela 2 Peroxidação lipídica (umol MDA/mg de proteína) no tecido hepático dos animais do grupo controle e experimentais tratados com extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min

	Controle	4 mg/g PC	2 mg/g PC	1 mg/g PC	0,5 mg/g PC
Fígado	0,19 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,01 ^c	0,15 ± 0,02 ^b	0,16 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,03 ^a

Média ± desvio-padrão, n= 8.

Letras iguais indicam diferenças estatisticamente não significativas ao nível de 5% (p > 0,05)

Não foram registrados casos de morte nem alterações comportamentais entre os animais do grupo controle e tratados com extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min ao longo do experimento.

Pelos dados expressos na **Tabela 2** verifica-se que houve diferença estatística entre o índice de lipoperoxidação no tecido hepático. A maior proteção do extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min no tecido hepático foi observada nos animais do **Grupo 1** (0,13 μMOL MDA/mg de proteína) tratado com a maior dose (4 mg/kg de peso corporal). O **Grupo 2** (0,15 μMOL MDA/mg de proteína) tratado com a dose de 2 mg/kg de peso corporal apresentou um maior nível hepático de TBARS em relação ao **Grupo 1** mostrando haver o efeito dose resposta.

Balasubashini et al. (2004) avaliaram o efeito antioxidante do ácido ferúlico em fígado de ratas diabéticas. O experimento foi feito com dois grupos experimentais tratados com doses equivalentes a 40 mg/kg e 10 mg/kg durante 45 dias. Os pesquisadores verificaram que o tratamento com ácido ferúlico reduziu o estresse oxidativo em animais diabéticos. Esta redução se correlacionou com menores níveis de TBARS no fígado dos animais tratados (1,44 mM/100 g de tecido e 2,73 mM/100 g de tecido para a menor e a maior dose respectivamente).em relação ao grupo diabético controle (3,76 mM/100 g de tecido).

Jung et al. (2006) avaliaram a propriedade antioxidante do ácido caféico em camundongos diabéticos. A lipoperoxidação lipídica foi avaliada pela determinação de TBARS no fígado e nos eritrócitos. Os níveis de TBARS verificados no fígado dos animais tratados (2,49 nmol/g de tecido) e dos animais do grupo controle (4,88 nmol/g de tecido) diferiram estatisticamente (p < 0,01). As propriedades antioxidantes foram verificadas também entre os valores de TBARS determinados nos eritrócitos dos animais tratados (2,27 nmol/g de tecido) e dos animais do grupo controle (nmol/g de tecido) (p < 0,05).

Ozercan et al. (2006) avaliaram o efeito antioxidante do café instantâneo (IC) na prevenção de dano hepático causado pelo efeito agudo de tetracloreto de carbono (CCL4) em ratos. O café foi adicionado à água que era servida *ad libitum* diariamente numa proporção inicial de 25% (bebida pronta feita com 2 g de pó) até 100% ao final do experimento. Após setenta dias de tratamento, os animais foram sacrificados e foi feita coleta de plasma e fígado para determinação dos níveis de TBARS. Os níveis de malonaldeído no fígado diferiram significativamente entre os grupos tratado e não tratado na ordem de 110,18 nmol/g de tecido (CCL4) > 98,32 nmol/g de tecido (CCL4 + IC) > 53,56 nmol/g de tecido (IC) = 50,17 nmol/g de tecido (C). Observou-se, igualmente, que o tratamento com café instantâneo aumentou significativamente os níveis de antioxidantes totais no plasma (0,88 mmol/eq.L) do grupo (CCL4 + IC) em relação ao grupo não tratado (CCL4) (0,76 mmol/eq.L) (p < 0,05). Estes resultados tiveram correlação positiva com a redução de necrose e inflamação no grupo (CCL4 + IC) em relação ao grupo (CCL4) (p < 0,05).

Conclusões

Pelos resultados obtidos verificou-se que os compostos presentes no extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min foram capazes de inibir a oxidação no tecido hepático, destacando-se inclusive as observações do efeito dose-resposta e a propriedade antioxidante encontrada no café. A partir destes resultados abre-se a perspectiva de realização de outros ensaios visando à obtenção de compostos classificados como nutracêuticos.

Referências Bibliográficas

- Andueza, S., Cid, C., Nicoli, M.C. Comparison of antioxidant and pro-oxidant activity in coffee beverages prepared with conventional and “torrefacto” coffee. **Lebensmiste Wiss u-Technology**, v.37, p.893-897, 2004.
- Araujo, F.A., Mancini-Filho, J. Avaliação da atividade antioxidante de extratos aquosos de café (*Coffea arabica*, L.) *in natura* e torrado em diferentes níveis. XIX Seminário de Pós-Graduação, realizado no período de 18 a 22 de outubro de 2004 e promovido pela **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo**.
- Azuma, K., Ippoushi, K., Nakayama, M., Ito, H., Higashio, H., Terao, J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p.5496-5500, 2000.
- Balasubashini, M.S.; Rukkumani, R.; Viswanathan, P.; Menon, V.P. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v.18, p.310-314, 2004.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.677-685, 1985.
- Gonthier, M.; Verny, M.; Besson, C.; Rémésy, C.; Scalbert, A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **Journal of Nutrition**, v.133, p.1853-1859, 2003.
- Hington, J.V. Frei, B. Coffee and health: A review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p.101-123, 2006.
- Jung, U.J.; Lee, M.; Park, Y.B.; Jeon, S.M.; Choi, M.S. Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.318, n.2, p.476-483, 2006.
- Krings, U., Johansson, L., Zorn, H., Berger, R.G. *In vitro* DNA-protective activity of roasted wheat germ and fractions thereof. **Food Chemistry**, v.97, p.712-718, 2006.
- Nardini, M.; Cirillo, E.; Natella, F.; Mencarelli, D.; Comisso, A.; Scaccini, C. Analytical, nutritional and clinical methods detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. **Food Chemistry**, v.79, p.119-124, 2002.
- Natella, F.; Nardini, M.; Giannetti, I.; Dattilo, C.; Scaccini, C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6211-6216, 2002.
- Okamura, S.; Suzuki, K.; Yanase, M.; Koizumi, M.; Tamura, H. The effects of coffee conjugation reactions in human colon carcinoma cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.2, p.271-274, 2005.
- Ozercan, I.H.; Dagli, A.F.; Ustundag, B.; Ozercan, M.R.; Bahcecioglu, I.H.; Çelik, H.; Yalniz, M.; Poyrazoglu, O.K.; Ataseven, H. Does instant coffee prevent acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCL₄)? **Hepatology Research**, v.35, p.163-168, 2006.
- Winterbourn, C.C.; Gutteridge, J.M.; Halliwell, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. **Journal of Free Radicals in Biology & Medicine**, v.1, n.1, p.43-49, 1985.
- Yanagimoto, K., Ochi, H., Lee, K.G., Shibamoto, T. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.592-596, 2004.
- Yeum, K.J., Russell, R.M., Krinsky, N.I., Aldini, G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.430, p.97-103, 2004.