

DANIEL MANSUR RABELO

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE *in vitro* e *in vivo* EM BEBIDAS
DE CAFÉ: INFLUÊNCIA DO TIPO DE
EXTRAÇÃO**

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2014

DANIEL MANSUR RABELO

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE *in vitro* e *in vivo* EM BEBIDAS
DE CAFÉ: INFLUÊNCIA DO TIPO DE
EXTRAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Orientador: Renata Adriana Labanca

Co-orientador: Rachel Oliveira Castilho

Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2014

Rabelo, Daniel Mansur.
R114d Determinação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* em
bebidas de café: influência do tipo de extração / Daniel Mansur
Rabelo. – 2014.
69 f. : il.

Orientadora: Dr^a Renata Adriana Labanca.
Co-orientadora: Dr^a Rachel Oliveira Castilho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência
de Alimentos.

1. Café – Teses. 2. Café – Análises – Teses. 3. Antioxidantes –
Teses. 4. Extração (Química) – Teses. I. Labanca, Renata Adriana.
II. Castilho, Rachel Oliveira. III. Universidade Federal de Minas
Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD 663.93

DANIEL MANSUR RABELO

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E *IN VIVO*
EM BEBIDAS DE CAFÉ: INFLUÊNCIA DO TIPO DE EXTRAÇÃO**

APROVADA EM 28 DE ABRIL DE 2014

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. LEANDRO SOARES DE OLIVEIRA



**Profa. Dra. ROSEMARY GUALBERTO FONSECA ALVARENGA
PEREIRA**



**Profa. Dra. RACHEL OLIVEIRA CASTILHO
(Coorientadora)**



**Profa. Dra. RENATA ADRIANA LABANCA
(Orientadora e Presidente da Comissão)**

Dedico este trabalho a Deus, a meus amados pais e irmãos, e à Bárbara, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao PPGCA, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional, e pelo contínuo investimento na minha formação.

À CAPES, pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida.

À minha orientadora, Professora Renata Adriana Labanca, pela oportunidade, direcionamento e apoio.

À minha co-orientadora, Professora Rachel Oliveira Castilho, por todo o conhecimento ensinado, pela atenção, dedicação e paciência.

A todos os meus professores, que tanto contribuíram para a minha formação pessoal e profissional, por me mostrarem caminhos e dividirem comigo suas experiências.

Aos meus pais, por serem os responsáveis pela minha educação, o meu crescimento como pessoa e por toda a minha trajetória até aqui.

Aos meus irmãos, pelo apoio.

À minha esposa, Bárbara Oliveira Henriques, muito mais que uma companheira, que participou ativamente desse projeto, e foi sempre meu porto seguro nas horas de dúvida.

A minha família, por entender a minha ausência e me apoiar em todos os momentos da minha vida.

Aos grandes amigos, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todos os momentos dos meus percursos.

Às colegas de laboratório e colaboradores, pelos conhecimentos divididos e apoio prestado durante a realização desse trabalho, em especial Anne Danielli, Geraldina Zawal, Marina Ferrara, Mariana Mirelle e Manuelle Natividade, pela ajuda indispensável durante o processo de sacrifício dos animais

À aluna de iniciação científica, Letícia Barroso, pela colaboração a esse trabalho, sobretudo durante os experimentos *in vivo*.

Aos colegas de curso, por compartilharem comigo experiências e momentos.

Á Bioclin/Quibasa, por ter gentilmente cedido os kits diagnósticos utilizados nos testes bioquímicos.

A todos os que, de alguma forma, possibilitaram a realização desse trabalho.

*“Um pouco de ciência nos afasta de
Deus. Muito, nos aproxima.”*

Louis Pasteur

RESUMO

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. Vários fatores como a espécie utilizada, o grau de torração e o modo de preparo da bebida (a forma de extração) exercem influência sobre a composição química e atividade biológica do café. Como formas de extração, pode-se utilizar infusão seguida de filtração, decocção sem filtração ou pressão, utilizando-se máquinas de café expresso. A ação antioxidante consiste basicamente em reverter o processo de estresse oxidativo, que ocorre quando mais radicais livres são gerados que eliminados do organismo. 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 (decocção) 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 glutathione redutase e a medida da peroxidação por TBARS, além da determinação de alguns parâmetros bioquímicos no sangue. Nos ensaios *in vitro*, para o café fervido encontrou-se menor atividade que os demais, sendo que o expresso apresentou a maior atividade no ensaio de DPPH (valores encontrados de CE_{50%}, em µg/mL: 30,53 ± 1,72 para o expresso, 36,96 ± 1,20 para o filtrado e 66,00 ± 2,02 para o fervido), mas expresso e filtrado não apresentaram diferença (p<0,05) no ensaio de ABTS (valores encontrados em µmol de Trolox/g de amostra: 611,90 ± 52,67 para o filtrado, 556,05 ± 42,67 para o expresso e 428,39 ± 35,62 para o fervido). Com relação aos parâmetros bioquímicos, houve diferenças significativas apenas para a glicemia (p<0,05), que foi maior nos animais controle que nos tratamentos (valores em mg/dL: 133,63 ± 57,24 para o controle; 88,89 ± 33,47 para o filtrado, 75,60 ± 18,24 para o fervido e 73,22 ± 12,12 para o expresso). Já nos ensaios de atividade antioxidante *in vivo* não foram encontradas diferenças significativas (p<0,05) entre o controle e os tratamentos, nem entre os tratamentos. Como houve diferença significativa na atividade antioxidante *in vitro* e encontra-se atividade antioxidante *in vivo* em outros estudos, suspeita-se que o tempo de exposição pode ter sido insuficiente ou poderia ser induzido o estresse oxidativo nos animais, a fim de se obter uma melhor resposta. Assim, outros estudos serão desenvolvidos para confirmar o resultado obtido neste trabalho.

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 benefits, most of them linked to their antioxidant properties. The components of coffee linked to this activity are mainly polyphenols, caffeine and melanoidins. Several factors such as the type of crop, the species of coffee used, the degree of roasting and brewing method (the extraction form) influence on the chemical composition and biological activity of coffee. As extraction form, it can be used infusion followed by filtration, decoction without filtration or pressure, using espresso machines. The antioxidant activity basically consists in reversing the process of oxidative stress, which occurs when more free radicals are generated than eliminated from the body. Thus, this study aimed to evaluate the antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* of coffee beverages obtained from different types of 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 espresso coffee showed the highest activity in the DPPH assay (obtained values to CE_{50%}, expressed in µg/mL: 30,53 ± 1,72 for espresso, 36,96 ± 1,20 for filtered and 66,00 ± 2,02 for the boiled coffee), but espresso and filtered showed no significant difference (p<0,05) in ABTS assay (obtained values expressed in µmol of Trolox/g of the sample: 611,90 ± 52,66 for filtered, 556,05 ± 42,07 for espresso and 428,39 ± 35,62 for the boiled coffee). About the biochemical parameters, there were significant differences (p<0,05) only for blood glucose, which was greater in control animals than in treatments with coffee (obtained values to glycemia in mg/dL: 133,63 ± 57,24 for control; 88,89 ± 33,47 for filtered; 75,60 ± 18,24 for boiled and 73,22 ± 12,12 for the espresso coffee). Already in the antioxidant activity *in vivo*, no significant differences (p<0,05) were found between control and treatments and between the treatments each other. As there was significant difference of *in vitro* antioxidant activities and there is antioxidant activity *in vivo* assigned to the coffee in other studies, it is suspected that the exposure time may have been insufficient or could be induced oxidative stress in the animals, in order to get a better response. Therefore, further studies will be carried out to confirm the results obtained in this work.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ΔE – Unidades arbitrárias de atividade enzimática
AAPH - 2,2-azobis (2-amidino-propano) dihidrocloro
ABTS - 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
CAT - Catalase,
CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal
CE_{50%} - Concentração eficaz a 50%
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CUPRAC - Método de Redução do Cobre
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DMH - 1,2-dimetilhidrazina
DTPA - Ácido dietilenotriaminopentaacético
EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético
EROs – espécies reativas de oxigênio
FRAP - Método de Redução do Ferro
FOS - Fruto-oligossacarídeos
GPx – Glutathione peroxidase
GR – Glutathione reductase
GSSG - Glutathione oxidada
HAT - Transferência de átomos de hidrogênio
LDL - Lipoproteína de baixa densidade
MDA - Malondialdeído
NADP - Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH - Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (forma oxidada)
ORAC - capacidade de Absorvância do radical Oxigênio
SET - Transferência simples de elétrons
SOD - Superóxido desmutase
TBA - Ácido tiobarbitúrico
TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA - Ácido tricloroacético
TEAC - Capacidade Antioxidante Equivalente do Trolox
TRAP - Parâmetro antioxidante de retenção de radicais totais
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1.	O CAFÉ	4
2.1.1.	Aspectos Gerais	4
2.1.2.	O café e a Saúde	5
2.1.3.	Composição Química e Atividade Biológica	6
2.1.3.1.	Cafeína	7
2.1.3.2.	Diterpenos	8
2.1.3.3.	Polifenóis	9
2.1.3.4.	Melanoidinas	11
2.1.4.	Fatores que interferem na composição química e atividades biológica das bebidas de café	12
2.1.5.	Influência do café nos Parâmetros Bioquímicos do Sangue	14
2.2.	OS PROCESSOS OXIDATIVOS NOS ORGANISMOS VIVOS	15
2.2.1.	O Processo de Estresse Oxidativo	15
2.2.2.	Peroxidação Lipídica	17
2.2.3.	A Defesa Endógena: Enzimas Antioxidantes	19
2.2.3.1.	Catalase (CAT)	20
2.2.3.2.	Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione Redutase (GR)	21
2.3.	Os estudos <i>in vitro</i>	23
2.3.1.	Método de captura do Radical ABTS – Capacidade antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC)	23
2.3.2.	Método de Captura do radical DPPH	25
2.4.	Os estudos <i>in vivo</i>	26
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1.	DESCRIÇÃO DA AMOSTRA	29
3.2.	PREPARO DAS AMOSTRAS	30
3.2.1.	Preparo das Bebidas	30
3.2.3.	Liofilização das Amostras	30
3.3.	ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i>	31
3.3.1.	Método de Captura do radical DPPH	31
3.3.2.	Método de captura do Radical ABTS – Capacidade antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC)	32
3.4.	ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vivo</i>	33
3.4.1.	Testes de parâmetros bioquímicos nos animais tratados	34
3.4.2.	Preparo da suspensão de hepatócitos isolados	34
3.4.3.	Determinação do teor de proteínas	35
3.4.4.	Avaliação da peroxidação lipídica pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	35
3.4.5.	Avaliação da atividade das enzimas hepáticas	36
3.4.5.1.	Catalase (CAT)	36

3.4.5.2	Glutathione Redutase (GR)	36
3.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4.	RESULTADOS	37
4.1.	ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i>	37
4.2.	ENSAIOS BIOQUÍMICOS	38
4.3.	ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i>	39
5.	DISCUSSÃO	40
5.1.	ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i>	40
5.2.	ENSAIOS BIOQUÍMICOS	42
5.3.	ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i>	44
6.	CONCLUSÕES	46
7.	TRABALHOS PUBLICADOS	47
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE FIGURAS

01	Estrutura Química da Cafeína	7
02	Estruturas Químicas do cafestol e Kawheol	8
03	Estruturas Químicas dos isômeros do ácido clorogênico e outros derivados do ácido cinâmico encontrados no café	10
04	Redução univalente do oxigênio a água nas mitocôndrias	16
05	Cascata de reações da peroxidação lipídica	18
06	Mecanismo coordenado de defesa enzimática	20
07	Reações de inativação do peróxido de hidrogênio, catalisadas pela catalase	21
08	Ciclo catalítico da glutatona	22
09	Reação de geração do radical ABTS ⁺ com persulfato de potássio	24
10	Reação do radical DPPH com um antioxidante	25

LISTA DE TABELAS

01	Características de alguns estudos de atividade antioxidante (AA) <i>in vivo</i>	28
02	Valores de CE ₅₀ obtidos no método de captura do radical DPPH nos diferentes métodos extrativos de café Bourbon Amarelo	38
03	Valores de CE ₅₀ obtidos no método de captura do radical ABTS, expresso em TEAC nos diferentes métodos extrativos de café Bourbon Amarelo	38
04	Resultados dos ensaios bioquímicos realizados nas amostras de sangue dos animais tratados com diferentes extratos de café Bourbon amarelo, expressos em média ± desvio-padrão	38
05	Valores de teor de proteínas obtidos nas amostras hepáticas dos animais tratados com os diferentes extratos de café Bourbon Amarelo	39
06	Valores de teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) obtidos nas amostras hepáticas de animais tratados com diferentes extratos de café Bourbon Amarelo	39
07	Valores de atividade da enzima catalase obtidos nas amostras hepáticas de animais tratados com diferentes extratos de café Bourbon Amarelo	40
08	Valores de atividade da enzima glutaciona redutase obtidos nas amostras hepáticas de animais tratados com diferentes extratos de Café Bourbon Amarelo	40

1. INTRODUÇÃO

O café é o fruto do cafeeiro, uma planta pertencente ao gênero *Coffea*, família Rubiaceae. O Brasil é o maior produtor de café do mundo, sendo o estado de Minas Gerais responsável por mais da metade dessa produção. Embora haja um consumo expressivo dentro do Brasil, a maior parte do café produzido é exportado (ABIC, 2014).

A bebida do café é largamente consumida no Brasil e no mundo, em especial em nações desenvolvidas, e, devido às suas propriedades farmacológicas, funcionais e toxicológicas, é objeto de muitos estudos, (CLARKE e MACRAE, 1985; GRIGG, 2002; BORRELLI et al., 2002; ENCARNAÇÃO e LIMA, 2003; YANAGIMOTO et al., 2004). Durante algum tempo o café foi considerado um vilão da alimentação, devido principalmente aos efeitos da cafeína, como a elevação da pressão arterial (HIGDON e FREI, 2006). Porém, em muitos estudos foram comprovadas várias propriedades funcionais importantes, ligadas principalmente à sua atividade como antioxidante (LIMA et al., 2013; ABRAHÃO et al., 2013; MOLLOY et al., 2012)

O estresse oxidativo é o resultado de um balanço negativo entre a formação espontânea de espécies reativas pelo organismo, provenientes do processo de respiração aeróbica e a sua eliminação por antioxidantes, sejam intrínsecos ou advindos da dieta (VICENTE et al., 2011). Dos processos oxidativos são derivadas várias doenças crônico-degenerativas, tais como diabetes, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (ALVES et al., 2009; VAN DEN ENDE, PESHEV e DE GARA, 2011).

Reverter, portanto, a situação de estresse oxidativo é fundamental para a manutenção da saúde humana. Isso se dá por meio do fortalecimento das defesas antioxidantes do organismo ou da ingestão de substâncias antioxidantes na dieta (VAN DEN ENDE, PESHEV e DE GARA, 2011). Dentre os principais compostos antioxidantes, largamente encontrados em alimentos destacam-se os polifenóis, presentes em muitas frutas, hortaliças e no café (LIMA et al., 2010b). Outras substâncias presentes nos grãos de café também exercem essa função, mesmo que em menor grau, como a cafeína e as melanoidinas, provenientes do processo de torração. (LIMA et al., 2010a).

Vários fatores interferem na composição química da bebida café, tais como a espécie e cultivar do grão; a forma e local de cultivo; processamento pós-colheita; beneficiamento; métodos de industrialização e preparo da bebida, ou seja, o método de extração (BONITA *et al.*, 2007). No caso desse último, fatores como o tempo de contato, a temperatura da água e a presença ou não de filtração influenciarão na quantidade e tipo de compostos extraídos, o que interferirá na respectiva atividade biológica (LUDWIG *et al.*, 2012).

O preparo da bebida de café consiste em uma extração de componentes solúveis pela água. Formas de extração diferentes podem ser utilizadas, como a infusão, onde a água a alta temperatura apenas passa pelo pó; a decocção, onde a água e o pó ficam em contato até a ebulição da água e a extração por pressão, onde os componentes são extraídos com água pressurizada. Também pode-se filtrar ou não o café para a retirada da borra. No caso da infusão, geralmente filtra-se. No caso da decocção, porém, é comum não se filtrar, deixando-se somente o pó decantar. (SANCHEZ-GONZALEZ, JIMENEZ-ESCRIG e SAURA-CALIXTO, 2005; ABIC, 2012; NISETEO *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2010b).

Existem vários métodos descritos na literatura para se medir a capacidade antioxidante. A maioria deles foi desenvolvida *in vitro*, utilizando moléculas-alvo para testar a ação das amostras. Ao reagir com estas moléculas, os antioxidantes provocam mudanças na sua estrutura, que podem ser detectadas como mudança de cor, que é o princípio básico de ensaios como os da captura do radical ABTS (2,20-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) e da captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)(GÜLÇİN, 2012).

Embora os testes *in vitro* sejam ferramentas úteis para a avaliação da atividade antioxidante, estes muitas vezes não fornecem resultados correlatos aos testes *in vivo*, pois não consideram a ação do organismo sobre a amostra, ou seja, o quanto aquela substância a ser testada estará biodisponível para realizar sua ação. Sendo assim, os testes *in vivo* apresentam resultados mais condizentes com o objetivo de se estudar o efeitos dos antioxidantes no organismo (D'ARCHIVIO *et al.*, 2010).

Assim, o objetivo geral desse trabalho foi avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de bebidas de café obtidas a partir de diferentes tipos de extração.

Os objetivos específicos são determinar a atividade antioxidante *in vitro* das preparações pelos métodos de captura do radical ABTS e de captura do radical DPPH; determinar a atividade antioxidante *in vivo* pelos métodos enzimáticos da atividade da catalase e glutatona redutase, pelo método da lipoperoxidação pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, a partir de extratos hepáticos de animais experimentais saudáveis; verificar a influência do tipo de extração na atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*; e verificar a influência do tipo de extração na expressão de alguns parâmetros bioquímicos do sangue em animais experimentais saudáveis.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O CAFÉ

2.1.1. Aspectos Gerais

O café é o fruto do cafeeiro, do gênero *Coffea*, família Rubiaceae. Suas sementes, conhecidas como grãos, são a parte utilizada para se preparar a bebida, que pode ser obtida por infusão, decocção ou extração por pressão. As espécies mais utilizadas no preparo da bebida de café são a *Coffea arabica* e *Coffeacanechoravar.robusta* (CLARK e MACRAE, 1985; LIMA *et al.*, 2010b). No Brasil, 80 % do café consumido é resultado da mistura das duas espécies (SOUZA e BENASSI, 2012).

Os produtores de café, em sua quase totalidade, localizam-se em regiões tropicais, uma vez que o cultivo do café requer altas temperaturas, com pluviosidade entre 1500 a 1800 mm/ano e períodos secos de 4 a 5 meses, que contribuem para a maturação dos frutos e também para a secagem no processo produtivo. Os maiores consumidores são em sua maioria, no entanto, as nações desenvolvidas da Europa e América do Norte, em especial os Estados Unidos. O Brasil é o maior produtor e o único dentre os produtores que tem também um consumo expressivo (GRIGG, 2002). Os países escandinavos, como Finlândia, Suécia e Noruega, apresentam, entretanto, o maior consumo *per capita* (BONITA *et al.*, 2007).

Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de café (ABIC), a produção agrícola de café brasileira, em 2013, foi de quase 50 milhões de sacas de 60 kg, valor que representa quase o dobro do segundo maior produtor, o Vietnã (25 milhões de sacas). Só o estado de Minas Gerais foi responsável por 56% dessa produção, configurando-se, sozinho, como o maior produtor de café do mundo. Já o consumo de café pelos brasileiros, que apresentava uma tendência de crescimento nos últimos anos, estabilizou-se entre 2012 e 2013 em 20 milhões de sacas, o que corresponde a um consumo *per capita* de 4,97 Kg de café torrado e moído por ano. Assim, fica claro que a

maior parte do café produzido no Brasil é exportada. Entretanto, das mais de 31 milhões de sacas exportadas em 2013, mais de 28 milhões (ou seja, mais que 90%) foram de café cru, ou seja, as exportações brasileiras são quase na sua totalidade de café colhido na produção agrícola e não beneficiado, que tem um valor de mercado bem menor (ABIC, 2014).

Para consumo, o grão de café passa por um processo de torrefação e moagem. A torrefação é responsável por seu sabor e cor característicos e pode ser realizada em diferentes temperaturas; normalmente variando entre 200 e 250°C; e tempos, variando de 0,5 a 25 minutos, assim produzindo as torras clara, média ou escura (DEL CASTILLO, AIMES e GORDON, 2002).

2.1.2. O Café e a Saúde

Os efeitos do café na saúde humana são bastante controversos. As pesquisas com café tendiam, antigamente, a relacionar o consumo de café com enfermidades, principalmente cardiovasculares. Entretanto, pesquisas recentes o têm apontado como fator de proteção para algumas doenças crônicas, como diabetes, doenças hepáticas, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (LIMA *et al.*, 2013; ABRAHÃO *et al.*, 2013; MOLLOY *et al.*, 2012; HIGHDON e FREI, 2006). Embora classificado pela OMS (Organização Mundial de Saúde) como um carcinógeno 2B - a mesma classificação dada aos telefones celulares - e alguns estudos o relacionarem a maior ocorrência de câncer de estômago e bexiga, há outros estudos que correlacionam o consumo de café com a redução do risco de câncer de endométrio, mama, esôfago, intestino, próstata e fígado (KRELL e STEBBING, 2012). Estudos comparativos com café cafeinado e descafeinado em geral mostram que a cafeína não influencia nesses processos, e são as substâncias antioxidantes do café que são então sugestivamente as ativas para esse tipo de efeito (KRELL e STEBBING, 2012). Estudos com animais utilizando polifenóis isolados do café mostraram uma baixa recuperação desses compostos na urina, porém grande presença de metabólitos de origem microbiana, o que mostra que seu metabolismo é dependente da microbiota intestinal. Sua ingestão diminuiu o desenvolvimento de hipertensão arterial e aumentou a atividade das enzimas

antioxidantes do fígado. A administração do café preparado também demonstrou elevada capacidade antioxidante *in vivo* (BONITA *et al.*, 2007).

Atualmente muitas pesquisas têm sido desenvolvidas objetivando conhecer e elucidar as propriedades benéficas do café para a saúde. Estudos mostraram que existe uma correlação positiva entre o consumo de mais de duas xícaras de café por dia e menor risco de desenvolvimento de esteatose hepática, sobretudo em consumidores de álcool. Essa ação tem sido relacionada, principalmente às atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e prebióticas dos polifenóis e melanoidinas (VITAGLIONE *et al.*, 2010; LUDWIG *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2013). Outros estudos também demonstraram que o café possui efeito hipoglicemiante, este relacionado à atividade antioxidante de seus polifenóis (CAMPOS-FLORÍAN *et al.*, 2013) e que o extrato de polifenóis de café melhora a função endotelial após a ingestão de glicose, sugerindo um mecanismo que ajuda a evitar o aparecimento de doenças coronárias (OCHIAI *et al.*, 2014)

O estudo recente de López-Garcia *et al.* (2014), entretanto, avaliou a relação entre o consumo de café e a qualidade de vida relacionada à saúde, parâmetro esse que é medido através da resposta de um questionário padronizado. Foi constatada uma relação nula entre essas duas variáveis, o que comprovou a inexistência de efeitos adversos para a saúde, mas também não mostrou a existência de efeitos benéficos.

2.1.3. Composição Química e Atividade Biológica

O café é uma matriz complexa que possui mais de 1000 compostos, muitos deles formados durante o processo de torrefação. Muitas substâncias biologicamente ativas estão presentes, como trigonelina, ácido nicotínico e teobromina, entre outros (RODRIGUES e BRAGAGNOLO, 2013). Os compostos mais investigados quanto a ação biológica, entretanto, são a cafeína, que tem comprovados efeitos sobre o humor, desempenho cognitivo e atividade motora; diterpenóides, como o cafestol e o kahweol, presentes principalmente em cafés preparados por decocção e não filtrados, e que podem estar relacionados com o aumento de concentrações séricas de LDL-colesterol

e polifenóis, em especial isômeros do ácido clorogênico, com comprovada ação antioxidante (BONITA *et al.*, 2007; SOUZA e BENASSI, 2012). Além desses compostos, que já estão presentes no grão cru, também são formadas durante o processo de torrefação as melanoidinas, que também contribuem para a atividade antioxidante (LUDWIG *et al.*, 2012).

2.1.3.1. Cafeína

A cafeína (Figura 01) é um alcaloide purínico que atua como um antagonista da adenosina, produzindo efeitos estimulatórios sobre o sistema nervoso central. A concentração de cafeína varia com vários fatores, tanto intrínsecos quanto extrínsecos, como as condições edafo-climáticas (de solo e temperatura) e fatores genéticos, dentre outros. (HIGHDON e FREI, 2006). A ação estimulante da cafeína é amplamente conhecida e estudada, porém efeitos antioxidantes também são documentados em alguns estudos, embora as conclusões sejam controversas (LUDWIG *et al.*, 2012).

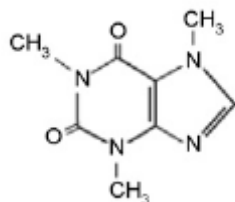


Figura 01. Estrutura química da cafeína.

Fonte : BONITA, 2007.

Em um estudo *in vitro*, Devasagayam *et al.* (1996) demonstraram que a cafeína tem alta atividade contra os principais radicais livres que atacam biomoléculas: hidroxil, peroxil e oxigênio singleto. No estudo de Viana *et al* (2012), amostras de café cafeinado e descafeinado e solução pura de cafeína foram testadas em ratos para avaliar a atividade antioxidante frente a alterações causadas por exercício físico extremo. Encontrou-se maior atividade antioxidante na bebida de café cafeinado, o que faz inferir que a cafeína possui atividade antioxidante, mas ela se torna mais pronunciada na bebida de café, devido à presença de outras substâncias antioxidantes, como polifenóis e

melanoidinas. Lima *et al* (2010a) também encontraram maior atividade antioxidante *in vitro em* café cafeinado comparado ao descafeinado, corroborando essa hipótese. Já o estudo de Ruhl e Everhart *apud* Homan e Mobarhan (2006) mostrou que o maior consumo de cafeína, proveniente do café ou outras fontes, diminui o risco de altos níveis de amino transferase (ALT) hepática, um marcador de danos hepáticos, principalmente induzidos pelo consumo de álcool. Por outro lado, Molloy *et al.* (2012), em um estudo com indivíduos com esteatose hepática não-alcoólica, concluiu que o consumo de café é fator protetor maior para a fibrose hepática que o consumo de cafeína de outras fontes. Apesar disso, a cafeína é mais estudada sob o ponto de vista farmacológico, como estimulante e vasomodulador, com menos ênfase à sua atividade antioxidante (LUDWIG *et al.*, 2012).

3.1.3.2. Diterpenos

O cafestol e kahweol (Figura 02) são diterpenos pentacíclicos de furanos que só são encontrados no café. Em sua maioria, estão presentes esterificados com ácidos graxos, principalmente palmítico e linolêico, estando, portanto, mais presentes nas frações lipídicas do grão (SOUZA e BENASSI, 2012; SILVA *et al.*, 2012). Eles têm recebido atenção nos últimos anos devido aos seus efeitos fisiológicos à saúde humana (KITZBERGER *et al.*, 2014).

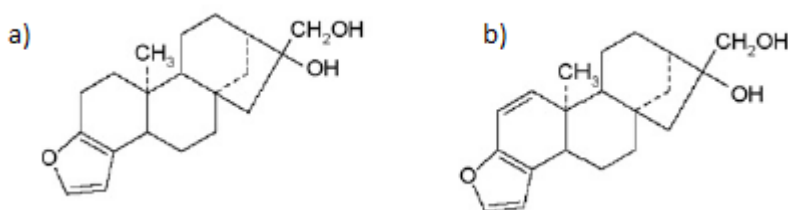


Figura 02. Estruturas químicas. a) cafestol, b) kawheol.

Fonte: BONITA, 2007.

Em geral, são retidos pelos papéis de filtro no café filtrado, mas em alguns tipos de preparo, como o expresso, em que as condições de extração são mais intensas, e o escandinavo, no qual a bebida não passa por filtração e a extração ocorre por decocção, seus teores são maiores. Eles têm sido relacionados a aumentos séricos de colesterol total e LDL-colesterol, mas os mecanismos ainda não são bem esclarecidos (HIGHDON e FREI, 2006). A despeito disso, entretanto, outros estudos também os tem relacionado com proteção a danos no DNA (SILVA *et al.*, 2012) e proteção no processo de carcinogênese hepático, através da inibição da expressão e atividade de algumas enzimas do citocromo P450, como as que ativam os compostos carcinogênicos benzopireno e aflatoxina B (MURIEL e ARAUZ, 2010).

3.1.3.3. Polifenóis

Compostos fenólicos são substâncias produzidas em resultado do metabolismo secundário de plantas. Derivam de uma de duas vias de síntese, a do ácido chiquímico ou do acetato, apresentando diversas funções na planta (CROZIER e CLIFFORD, 2009).

Assumem uma função protetora, conferindo resistência contra agentes agressores como ameaças microbianas ou insetos. A proteção contra raios UV é mais uma das potencialidades destes compostos nas plantas, bem como o envolvimento na pigmentação e crescimento das mesmas. O seu conteúdo na planta depende de fatores como o estágio de maturação, fatores ambientais, processamento e armazenamento (QUIDEAU *et al.*, 2011).

Dentre os polifenóis presentes no café, o ácido clorogênico, que corresponde a 5,5 a 8% da composição do café em base seca no grão cru, e a 1,2 a 2,3% no grão torrado, dependendo das condições, é o mais abundante (CAMPOS-FLORÍAN *et al.*, 2013). O ácido clorogênico é formado pela condensação do ácido caféico com o ácido quínico. O isômero do ácido clorogênico mais encontrado no café é o ácido 5-cafeoilquínico (NISETEO *et al.*, 2012), entretanto outros isômeros como o 3 e 4-cafeoilquínico, além de outros derivados do ácido cinâmico, como o ácido feruloilquínico e di-cafeoilquínico e seus isômeros (Figura 03) também são encontrados (FUJIOKA

e SHIBAMOTO, 2008). Durante o processo de torração, entretanto, mais de 90% desses derivados são perdidos ou incorporados a outros compostos. (LIMA *et al*, 2010a). Mesmo assim, a capacidade antioxidante da bebida preparada a partir de grãos torrados ainda é elevada (DEL CASTILLO, AIMES e GORDON, 2002).

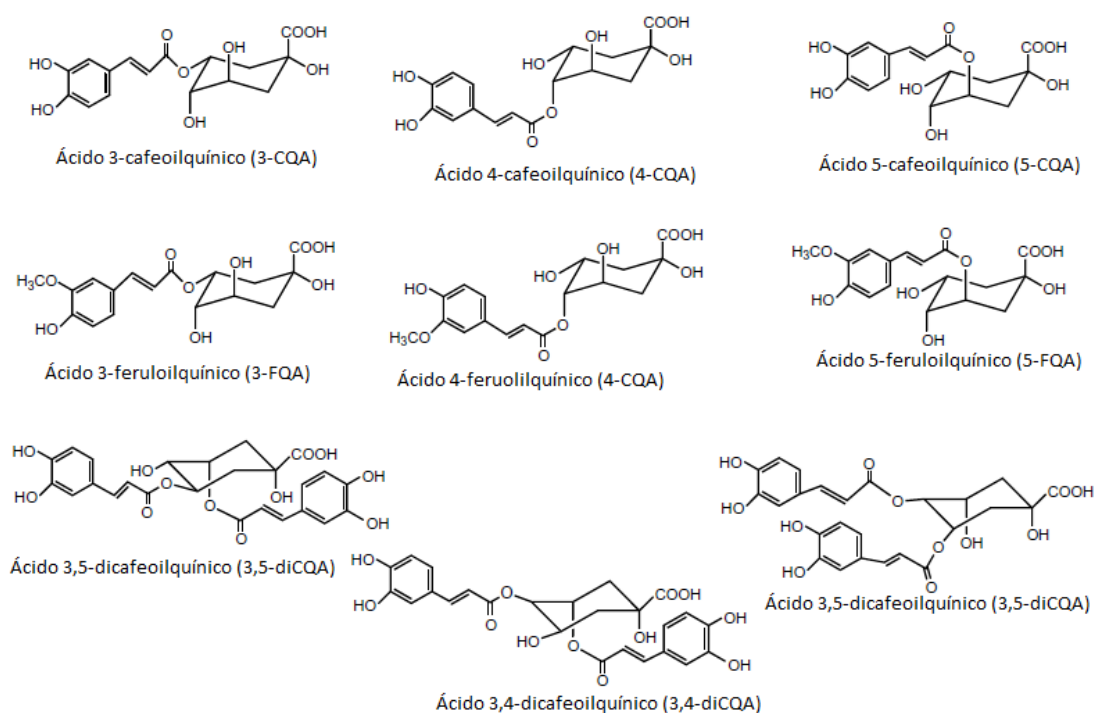


Figura 03. Estruturas químicas dos isômeros do ácido clorogênico e outros derivados do ácido cinâmico encontrados no café.

Fonte: FUJIOKA e SHIBAMOTO, 2008.

Provavelmente no trato gastrointestinal, ocorre a hidrólise do ácido clorogênico por esterases, tornando o ácido caféico, biodisponível (NARDINI *et al.*, 2002). O caminho dos compostos fenólicos no organismo, da entrada no trato gastrointestinal à excreção, é comparável ao de vários medicamentos sintéticos, porém com algumas diferenças no que diz respeito à biodisponibilidade depois dos metabolismos de fase I e fase II (VELDERRAIN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2014). Os ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico possuem comprovada e elevada capacidade antioxidante, além de serem responsáveis pela acidez, adstringência e amargor finais das preparações do café (LUDWIG *et al.*, 2012). Os estudos de Natella *et al.* (2002) comprovaram

que o café, cujo polifenol principal é o ácido clorogênico/caféico apresentou maior atividade antioxidante que o chá preto, cujos polifenóis principais são as catequinas. A adição de leite, segundo Niseteo *et al.*(2012) leva a formação de complexos proteicos entre polifenóis e proteínas como a caseína e as proteínas do soro, ocorrendo uma menor disponibilidade de polifenóis e conseqüentemente menor atividade antioxidante.

Propriedades hipoglicêmicas importantes têm sido atribuídas ao ácido clorogênico. Além da ação antioxidante, sabe-se que ele inibe transportadores de glicose dependentes de sódio, interferindo na secreção de peptídeos gastrointestinais com efeito hiperglicêmico (GAMBARONE e ROSA, 2007; ABRAHÃO *et al.*, 2013) e ainda inibe a enzima glicose-6-fosfato, o que interfere diretamente no metabolismo da glicose (MAHER, 2010).

Por outro lado, a elevada reatividade e grande diversidade em termos de estrutura e peso molecular torna os polifenóis um dos grupos mais difíceis de compostos para investigar, como evidenciado pelos resultados ambíguos e por vezes contraditórias de diversos estudos (LEWANDOWSKA *et al.*, 2013).

3.3.1.4. Melanoidinas

Várias alterações ocorrem durante o processo de torrefação do café, como perda de proteínas, açúcares, compostos fenólicos e água, e a formação de compostos derivados da Reação de Maillard, em geral melanoidinas e compostos voláteis (WANG, QIAN e YAO, 2011; LUDWIG *et al.*, 2012) As melanoidinas são produtos nitrogenados, de cor marrom e em geral de alto peso molecular. Sua estrutura é bastante heterogênea e depende dos produtos iniciais da reação (MORALES, SOMOZA e FOGLIANO, 2012).

No café, a reação entre polissacarídeos, em especial arabinogalactanas; e proteínas ou aminoácidos livres é mais frequente. Porém, a estrutura heterogênea e complexa dos produtos da reação torna difícil sua identificação e quantificação, devido à ausência de padrões (MORALES, SOMOZA e FOGLIANO, 2012).

Além da sua contribuição na cor e sabor do café torrado, as melanoidinas também contribuem na atividade antioxidante (LUDWIG *et al.*,

2012). A presença de atividade antioxidante nas melanoidinas pode ser atribuída, em parte, à incorporação de ácido clorogênico na sua estrutura durante o processo de torrefação. Essa incorporação de fenólicos se dá no início do processo, já que os mesmos são posteriormente degradados, com o aumento do tempo de torrefação. Entretanto, a contribuição de ácidos fenólicos ligados a melanoidinas na atividade antioxidante é comprovadamente menor que a do ácido clorogênico livre (PERRONE, FARAH e DONANGELO, 2012).

Além da atividade antioxidante, as melanoidinas também possuem atividade moduladora de metabolismo enzimático (fase I e II), além de atividade antimicrobiana e prebiótica no intestino, essas últimas relacionadas àquelas substâncias de maior peso molecular (WANG, QIAN e YAO, 2011).

A atividade *in vivo* depende da biodisponibilidade da substância. Por serem compostos de alto peso molecular, as melanoidinas são pouco absorvíveis. Entretanto, há evidências de que sofrem transformação no trato gastrointestinal a substâncias de baixa massa molecular, o que pode contribuir para sua absorção (MORALES, SOMOZA e FOGLIANO, 2012).

Embora a atividade antioxidante e outras atividades biológicas das melanoidinas venham sendo largamente estudadas, muito poucas estruturas diferentes destas foram descritas, não podendo ainda se estabelecer uma relação específica entre efeitos na saúde e melanoidinas quimicamente distintas (WANG, QIAN e YAO, 2011).

3.1.4. Fatores que interferem na composição química e atividade biológica das bebidas de café

Vários fatores influenciam a composição química, e conseqüentemente a atividade biológica do café. Esses fatores podem ser relacionados ao cultivo, beneficiamento, ou mesmo ao preparo final (processo de extração). Ao se analisar a espécie de café utilizada, tem-se documentado que o *Coffea arabica* possui um maior teor de lipídios, carboidratos e trigonelina, que são precursores de compostos aromáticos do café torrado durante a torração, enquanto o *Coffea canephora* possui maior teor dos compostos bioativos polifenóis e cafeína (SOUZA e BENASSI, 2012). Por possuir uma maior

qualidade sensorial, a primeira espécie citada é responsável por 80% do mercado, além de ter um preço maior (BONITA *et al.*, 2007). A diferenciação de preços abre a possibilidade para a ocorrência de fraudes (RUBAYISA e MEURENS, 2005). Nos grãos crus a diferenciação é visual, mas para café torrado em pó, essas diferenças desaparecem. Normalmente, o café arábica possui maiores quantidades de de cafestol e kawheol do que o café robusta, que por sua vez possui maiores teores de cafeína. Esses compostos são termoestáveis, podendo ser encontrados portanto no café torrado em pó (RUBAYISA e MEURENS, 2005; SOUZA e BENASSI, 2012).

O grau de torração exerce importante influência na composição químicas dos grãos e das bebidas. Em um estudo com três diferentes graus de torração, Del Castillo, Ames e Gordon (2002) demonstraram que há aumento da atividade antioxidante *in vitro*, medida pelo método de captura do radical ABTS, entre o grão natural, a torra clara e a média, porém uma diminuição quando se trata da escura, fato que pode ser explicado pela formação de outras substâncias durante os primeiros minutos de torra, e depois degradação, ao se atingir a torração escura.

Outra variável importante para a composição e concentração de substâncias no café é a forma de preparo da bebida, ou forma de extração. Este é um importante fator para determinar a quantidade e tipo de composto que foi extraído do pó de café para a preparação da bebida. Pode-se extrair os compostos solúveis por três formas diferentes: infusão, decocção ou pressão (LIMA *et al.*, 2010b). Muitas substâncias presentes no café, incluindo aquelas com propriedades antioxidantes, são extraídas de forma diferente, dependendo do processo de extração utilizado, pois a forma e o tempo de contato da água com os grãos torrados são de extrema importância (LUDWIG *et al.*, 2012).

Exemplos de cafés preparados por infusão são o café tradicional filtrado (mais consumido no Brasil) e o estilo italiano, feito no utensílio denominado moca, onde a água entra em contato por poucos segundos com o pó e a bebida é arrastada para a parte superior do recipiente. Os cafés feitos por decocção geralmente não são filtrados, e preferencialmente são preparados com pó de granulometria mais fina, como por exemplo o escandinavo e o turco. Já a bebida obtida por pressão é geralmente chamada de expresso, e é preparada numa máquina que pode ou não realizar a moagem dos grãos e

realiza a extração com água pressurizada a 8-9 bar (SANCHEZ-GONZALEZ, JIMENEZ-ESCRIG e SAURA-CALIXTO, 2005; ABIC, 2012; NISETEO *et al.*, 2012).

De acordo com os estudos de ação antioxidante realizados *in vitro* por Parras *et al.* (2007), existem diferenças significativas entre as capacidades anti-radicais livres das preparações filtrado, expresso e italiano. Os estudos mostraram que não houve diferença significativa entre as preparações no que diz respeito à reação anti-radical superóxido e hidroxil, mas o filtrado apresentou maior capacidade de reagir com o peróxido de hidrogênio que o italiano, e este que o expresso. O mesmo resultado foi encontrado no teste de atividade antioxidante frente ao radical ABTS e na avaliação da proteção à oxidação do ácido linoléico. Em compensação, o expresso e o italiano foram mais eficientes na proteção à oxidação pelo método Rancimat que o filtrado. As atividades das bebidas de café foram sempre maiores que seus compostos isolados, como ácido clorogênico e ácido caféico, mostrando que o efeito sinérgico dos vários antioxidantes é importante (PARRAS *et al.*, 2007). Sanchez-Gonzalez, Jimenez-Escrig e Saura-Calixto (2005) também encontraram maior atividade para o café filtrado, em relação ao italiano e expresso, nos testes de capacidade antioxidante para o radical ABTS e Método de Redução do Ferro (FRAP). Porém, o estudo de Niseteo *et al.* (2012) também comparou diferentes preparações e mostrou uma maior atividade antioxidante para o café expresso que para o turco, e este maior que o filtrado. Nesse estudo, também foram analisados os teores de polifenóis, encontrando-se correspondência com os dados de atividade.

3.1.5 Influência do café nos parâmetros bioquímicos do sangue

O organismo responde a situações de estresse com uma série de mudanças comportamentais, cognitivas e biológicas (AL-QUDAH *et al.*, 2012). Em decorrência disso, várias substâncias constituintes do organismo podem sofrer alterações. O mesmo pode ocorrer se substâncias antioxidantes estiverem atuando. Assim, o consumo de café pode alterar alguns parâmetros bioquímicos do sangue, devido a seus efeitos biológicos. Já é comprovado, por

exemplo, o efeito hipoglicemiante da cafeína, mas principalmente do ácido clorogênico. No estudo de Campos-Florián *et al.* (2013) houve diminuição significativa da glicemia de ratos diabéticos, quando administrada uma dose diária de 93 mg/Kg de bebida de café.

Também é comprovado por vários estudos o efeito hiperlipemiante, porém geralmente relacionado ao consumo do café não filtrado, que tem maiores concentrações de diterpenos. Em se tratando do café filtrado, como no estudo de Duarte *et al.* (2009) diferenças significativas em padrões lipídicos e hematológicos não foram encontradas. Já no estudo de Lima *et al.* (2011), realizado numa população de 182 indivíduos hipertensos e ou diabéticos e consumidores de café (média de 500 mL por dia) da cidade de Flexeiros-AL, não foi encontrada diferença significativa entre as taxas de lipídeos séricos dos indivíduos que tomam café filtrado ou fervido, sugerindo que, consumindo-se moderadamente a bebida, o efeito hiperlipemiante dos diterpenos presentes pode ser compensado pela atividade protetora antioxidante.

Outro parâmetro bioquímico que pode ser alterado é a albumina sérica. Isso porque a albumina é a mais abundante proteína presente no sangue e é sintetizada pelo fígado. Excesso de gordura no fígado pode assim diminuir a concentração de albumina sérica, porém como o café exerce um efeito hepatoprotetor, pode ocorrer a compensação da redução (LIMA *et al.*, 2013). No estudo de Onuegbuet *et al.* (2011), os níveis plasmáticos de proteína total e bilirrubina foram aumentados em indivíduos que consumiram 2 g de café por dia durante 30 dias.

3.2. OS PROCESSOS OXIDATIVOS NOS ORGANISMOS VIVOS

3.2.1. O Processo de Estresse Oxidativo

Estresse oxidativo pode ser definido como a situação em que mais radicais livres são formados que eliminados no organismo (BARBOSA *et al.*, 2008). As espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como os radicais livres hidroxil, superóxido e oxigênio singlete e a substância não radical peróxido de

hidrogênio são formadas naturalmente em sistemas vivos, devido ao processo de respiração aeróbica (Figura 04).

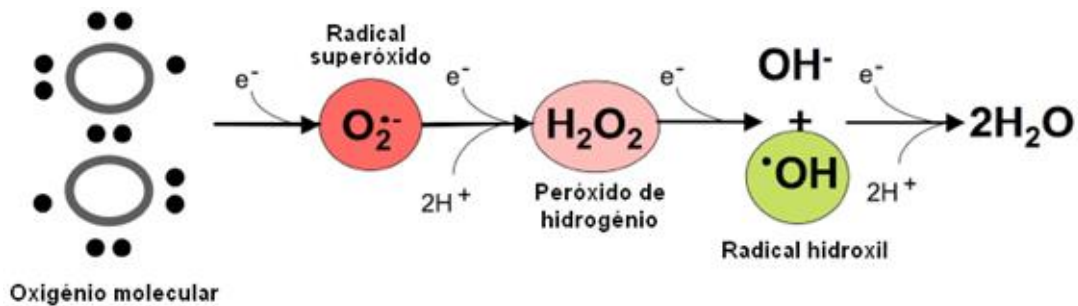


Figura04: Redução univalente do oxigênio a água nas mitocôndrias. Várias espécies reativas são formadas.

Fonte: PEREIRA, 2009.

Em quantidades baixas ou moderadas, essas espécies têm uma função biológica importante, ativando diferentes sinalizadores e fatores de transcrição nuclear, induzindo resposta mitogênica e inflamatória, protegendo o organismo de infecções microbianas e regulando inúmeras cascatas enzimáticas (VICENTE *et al.*, 2011). Elas são, entretanto, bastante reativas, e atacam biomoléculas diversas tais como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios dentre outras (VAN DEN ENDE, PESHEV e DE GARA, 2011), causando alterações metabólicas como a peroxidação de lipídios, glicação de proteínas, inativação de enzimas e alterações de estruturas celulares, levando, em consequência, a danos celulares (SILVA *et al.*, 2011). Acredita-se que várias doenças crônico-degenerativas são iniciadas pelas EROs, provocando desregulação da homeostase e um estresse oxidativo crescente nas células (VAN DEN ENDE, PESHEV e DE GARA, 2011).

A homeostase das EROs no organismo depende do balanço entre sua produção e sua eliminação por antioxidantes. Os antioxidantes reagem com os ROS formando produtos finais menos tóxicos. Muitos deles são encontrados em organismos vivos, sendo considerados naturais, como o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), glutatona, polifenóis, alcaloides e carotenoides. Já as enzimas ligadas à atividade antioxidante são a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR),

catalase (CAT), dentre outras. Também alguns carboidratos não digeríveis, já difundidos popularmente como prebióticos, por exemplo a inulina e os frutoligosacarídeos (FOS) têm demonstrado boa atividade antioxidante *in vitro* (VAN DEN ENDE, PESHEV e DE GARA, 2011).

Um estudo com modelo *in vitro* de oxidação de LDL mostrou que o ácido clorogênico, caféico e outros polifenóis apresentaram uma atividade antioxidante *in vitro* bem maior que a de antioxidantes vitamínicos, e mais ainda, o café apresentou maior atividade que os compostos isolados, fato explicado pelo sinergismo entre seus vários componentes (BONITA *et al.*, 2007). O ácido caféico apresenta uma maior atividade que o clorogênico *in vitro*, porém como o primeiro é metabólito intestinal do segundo, suas atividades *in vivo* são semelhantes (SATO *et al.*, 2011). Isso mostra que deve-se dar atenção à atividade antioxidante *in vivo*, devido ao metabolismo que cada composto pode sofrer no trato gastrointestinal, alterando sua biodisponibilidade (HIGHDON e FREI, 2006).

Em um estudo epidemiológico realizado no Japão, de outro de 2008 a julho de 2012, verificou-se que o consumo de três xícaras de café por dia diminuiu significativamente a quantidade de ROS no organismo de homens, mas não de mulheres. O motivo para essa diferença não é bem elucidado, mas esse estudo mostrou o potencial do café como antioxidante, numa pesquisa com quase 10.000 voluntários (ISHIZAKA *et al.*, 2013) .

3.2.2. Peroxidação Lipídica

As ROS, dentro dos sistemas biológicos, reagem com várias substâncias, gerando danos celulares. Particularmente importante é a cascata de peroxidação lipídica (Figura 05), reação de radicais livres com ácidos graxos insaturados, onde ocorre a abstração de um hidrogênio de grupos metileno presentes. Essa reação gera a formação de radicais peroxil, num processo de iniciação da peroxidação. A propagação ocorre com a reação dos radicais formados com as espécies iniciais, com o oxigênio e com metais de transição, gerando novas espécies radicalares. O processo é finalizado com a reação

entre radicais, dando origem a compostos não radicalares estáveis, como compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas) (PEREIRA, 2009).

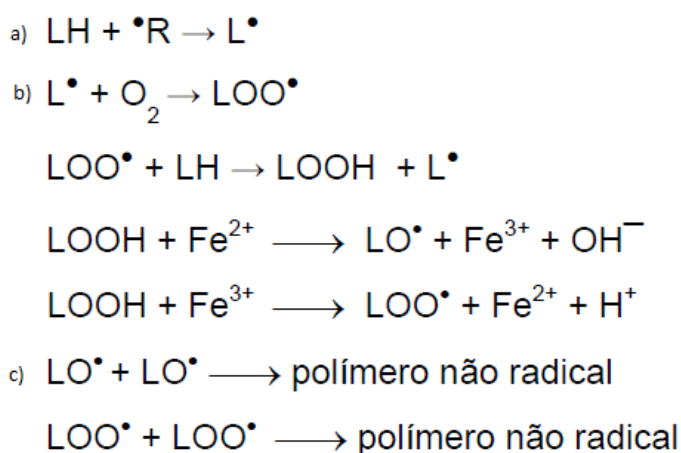


Figura 05: Cascata de reações da peroxidação lipídica: a – etapa de iniciação, b – etapa de propagação, c – etapa de finalização. L simboliza compostos lipídicos, R um composto qualquer e o círculo preto simboliza o elétron desemparelhado (estrutura radicalar)

Fonte: PEREIRA, 2009.

Um desses produtos é bem estudado: o malondialdeído (MDA), que é considerado um excelente biomarcador da peroxidação lipídica (MOON e SHIBAMOTO, 2009). As membranas biológicas, que são ricas em lipídios insaturados são especialmente susceptíveis a essa reação e há relatos de que o malondialdeído é citotóxico (ISHIMOTO, 2008).

No teste de peroxidação lipídica por formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), ocorre a reação entre o MDA e substâncias relacionadas e o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo colorido, que pode ser medido espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 532 nm. Esse doseamento é um indicador da peroxidação lipídica ocorrida em tecidos vivos, e, portanto, pode ser utilizado para medir a capacidade antioxidante *in vivo*, utilizando tecidos animais como meio de reação e produtos incorporados em sua dieta como amostras (MOON e SHIBAMOTO, 2009). O teste é inespecífico, uma vez que o ácido tiobarbitúrico não reage somente com malondialdeído, mas também com outros compostos, porém por sua facilidade de execução e baixo custo, o teste é frequentemente utilizado (BARBOSA *etal.*,

2008). Muitos trabalhos utilizam o método de TBARS para a determinação da atividade antioxidante *in vivo* (ABRAHÃO *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2013; LIMA, 2008; MACEDO *et al.*, 2013; ROESLER, 2011; SARKHAIL *et al.*, 2007; VIANA *et al.*, 2012;).

Outros biomarcadores da peroxidação lipídica também podem ser considerados: os isoprostanos e hidrocarbonetos. Estes também são produtos das reações do processo de peroxidação, entretanto, sua quantificação é bem menos simples que a dos TBARS, sendo empregadas técnicas como radioimunoensaios e cromatografia gasosa, dentre outras (BARBOSA *et al.*, 2008).

3.2.3. A Defesa Endógena: Enzimas Antioxidantes

Como mecanismo de proteção antioxidante endógeno, a presença de algumas enzimas hepáticas é muito importante. Elas são consideradas, em geral, antioxidantes secundários, pois não evitam a formação, mas eliminam radicais livres já formados antes que estes reajam em cadeia provocando modificações químicas deletérias. As principais enzimas antioxidantes são a superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) (LIMA, 2008). A cascata de reações catalisadas por essas enzimas é coordenada, de modo a eliminar os radicais livres formados, como mostrado na Figura 6.

O papel dos metais na formação das ROS é confirmado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss (Figura 6). O ferro é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas, embora o cobre possa também catalisar a reação de Haber-Weiss (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

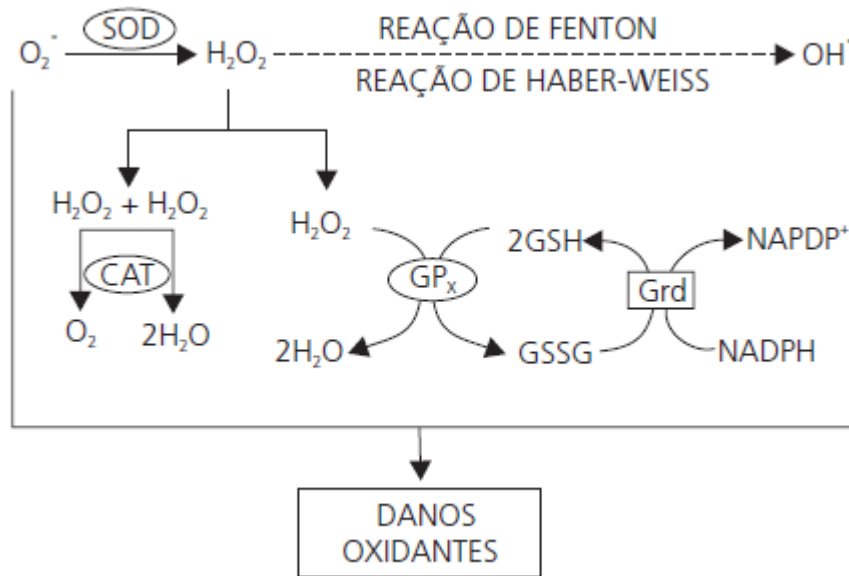


Figura 06: Mecanismo coordenado de defesa enzimática. SOD – Superóxido Desmutase, CAT – Catalase, GPx – Glutationa Peroxidase, Grd – Glutationa Redutase, $O_2^{\cdot -}$ - Radical superóxido, H_2O_2 – peróxido de hidrogênio, OH^{\cdot} - Radical hidroxil, GSH – Glutationa reduzida, GSSG – glutaciona oxidada.

Fonte: BARBOSA *et al.*, 2010.

4.2.3.1. Catalase (CAT)

A catalase é uma enzima amplamente distribuída no organismo humano. Geralmente encontrada nas mitocôndrias e peroxissomos, tem a função de catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio a água, inativando este composto muito reativo (Figuras 06 e 07). Em altas concentrações do peróxido, atua como catalisador da dismutação do oxigênio, levando à formação de água e oxigênio molecular. Em baixas concentrações do mesmo, atua como peroxidase, favorecendo a reação do peróxido de hidrogênio com co-substratos redutores, como ácido ascórbico e fenóis, que provocam sua redução e posterior neutralização, formando água (CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999). Essa enzima é inativada por radicais hidroxil (ROESLER, 2011).

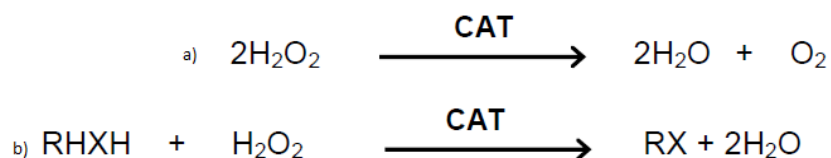


Figura 07: Reações de inativação do peróxido de hidrogênio, catalisadas pela catalase: a) em altas concentrações de H_2O_2 , b) em baixas concentrações de H_2O_2

Fonte: LIMA, 2008.

A atividade da catalase é geralmente determinada por método espectrofotométrico. Utiliza-se o peróxido de hidrogênio como marcador, com a resposta sendo lida em absorvância a um comprimento de onda de 230 nm (ISHIMOTO, 2008).

3.2.3.2. Glutaciona Peroxidase (GPx) e Glutaciona Redutase (GR)

A glutaciona peroxidase também exerce função importante na detoxificação do peróxido de hidrogênio, principalmente quando este se encontra em menores concentrações (SARKHAIL *et al.*, 2007). Presente geralmente no citosol e matriz mitocondrial, catalisa a reação de hidroperóxidos ou do peróxido de hidrogênio com a glutaciona, causando a oxidação da mesma e redução (e conseqüentemente a neutralização) do radical livre em questão. A glutaciona redutase, por sua vez, catalisa a redução da forma oxidada da glutaciona em sua forma reduzida, que, por sua vez é utilizada da redução já citada acima (WANG *et al.*, 2008). A coordenação da ação dessas duas enzimas gera o ciclo catalítico da glutaciona (Figura 08), que é um importante mecanismo de defesa do organismo frente aos ROS (BARBOSA *et al.*, 2008).

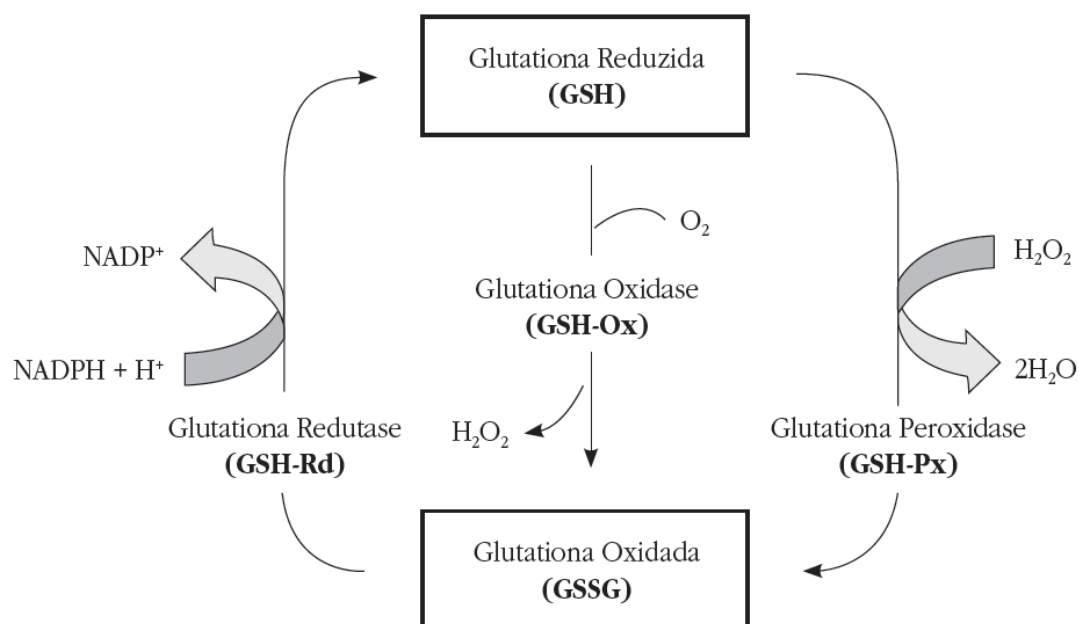


Figura 08: Ciclo catalítico da glutatona.

Fonte: BARBOSA *et al.*, 2008.

A atividade da glutatona peroxidase é geralmente determinada por método espectrofotométrico. Utiliza-se a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADP) como marcador, com a resposta sendo lida em absorvância a um comprimento de onda de 340 nm. A unidade de medida é U/min/g. (PAGLIA e VALENTINE, 1967). Já para a glutatona redutase, o mesmo marcador e comprimento de onda são utilizados, mas com mudanças em alguns reagentes (CARLBERG e MANNERVICK, 1975).

Uma maior concentração dessas enzimas confere ao organismo maior proteção contra a atuação dos ROS. Alguns estudos (WANG *et al.*, 2008; CRÉSPEDES *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2008 *apud* LIMA, 2008) já mostraram correlações positivas entre a expressão dessas enzimas e o consumo de vegetais com potencial antioxidante. Isso provavelmente ocorre porque ácidos fenólicos, como o gálico, ferúlico e p-cumárico atuam como ativadores indiretos de um fator de transcrição nuclear, capaz de promover a transcrição dessas enzimas, como demonstrado no estudo de Vicente *et al.* (2011), no qual uma dose única de 2 mL de bebida de café a 80g/L foi capaz de elevar as atividades da SOD, CAT e GPx em fígado de ratos.

3.3. OS ESTUDOS *in vitro*

A avaliação da atividade antioxidante *in vitro* é realizada utilizando reações químicas para determinar a capacidade da amostra de reagir com estruturas reativas, sendo elas radicais livres presentes ou não no organismo (MAGALHÃES *et al.*, 2008). Diversos modelos de atividade antioxidante *in vitro* estão disponíveis, e eles podem ser classificados de diversas formas. Badarinath *et al.* (2010) e Prior, Wu e Schaich (2005), por exemplo, consideram que os métodos podem ser divididos em a) métodos baseados na transferência de átomos de hidrogênio (HAT); b) métodos baseados na transferência simples de elétrons (SET) e c) outros métodos.

No mecanismo HAT, as reações de transferência de hidrogênio são geralmente rápidas, independentes de pH ou solubilidade, mas podem ser interferidas pela presença de agentes quelantes, como metais (PRIOR, WU e SCHAICH, 2005). Incluem-se nessa classificação os ensaios de Capacidade de Absorvância do Radical Oxigênio (ORAC), Parâmetro antioxidante de retenção de radicais totais (TRAP) e ensaios de peroxidação lipídica *in vitro*, entre outros (BADARINATH *et al.*, 2010). Já nos mecanismos SET incluem-se os testes de Redução do Ferro (FRAP), Redução do Cobre (CUPRAC), Capacidade Antioxidante Equivalente do Trolox (TEAC), que utiliza o radical ABTS e o ensaio de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), embora o ABTS e DPPH utilizem os dois mecanismos (PRIOR, WU e SCAICH, 2005). Nesse trabalho utilizamos os testes de TEAC e DPPH, ambos aplicáveis para a avaliação tanto qualitativa quanto quantitativa da atividade antioxidante em café, como demonstrado por Vignoli *et al.* (2012).

3.3.1. Método de Captura do Radical ABTS – Capacidade Antioxidante Equivalente do Trolox (TEAC)

Na fase preliminar desse ensaio, o ABTS é oxidado à sua forma catiônica, ABTS⁺, que é intensamente colorida, com uma coloração azul-esverdeada, e a atividade antioxidante da amostra é medida pela capacidade de reduzir essa intensidade de cor. Embora absorva em muitos comprimentos

de onda, o valor de 734 nm é preferido, pois elimina vários interferentes (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

Segundo Gülçin (2012), o primeiro método de captura do radical ABTS foi desenvolvido por Miller *et al.* (1993). Nesse método, o cátion era gerado a partir da reação com o radical ferril-mioglobina, este gerado a partir do tratamento da mioglobina com peróxido de hidrogênio. Atualmente, outros métodos podem ser utilizados, tais como AAHP (2,2-azobis (2-amidino-propano)dihidroclorato), dióxido de manganês, peroxidação de raiz-forte ou geração eletroquímica. Mas o método de escolha para gerar o cátion ABTS⁺ tem sido a reação com persulfato de potássio (K₂S₂O₈) (Figura 09).

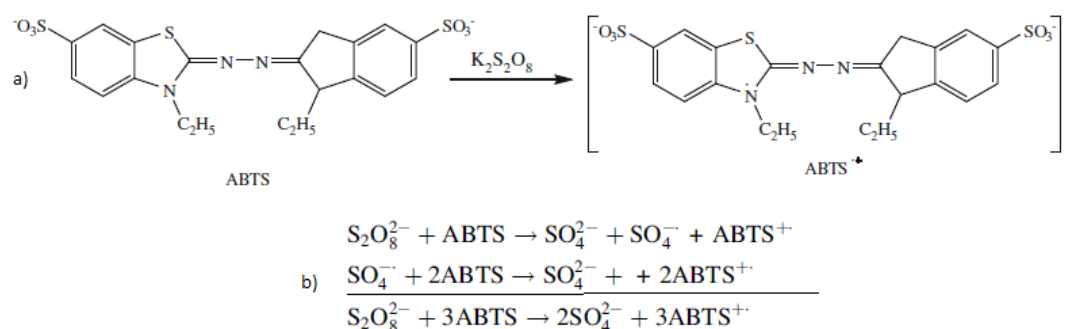


Figura 09: Reação de geração do radical ABTS⁺ com persulfato de potássio, a- estruturas químicas, b – esquematização das reações parciais e global.

Fonte: GÜLÇIN, 2012.

Esse reagente aumenta o rendimento da reação, pois os produtos também são capazes de reagir com o excesso de ABTS. Para a quantificação, deve ser determinado um tempo de reação específico. Os resultados são expressos em equivalentes de Trolox, ou seja, a concentração em mM de Trolox (análogo sintético da vitamina E) com capacidade antioxidante equivalente àquela encontrada para 1mM da amostra.

O ensaio de captura do radical ABTS é um teste simples e tem várias vantagens, como o fato de que o ABTS é solúvel tanto em solventes polares quanto apolares, sendo este método útil tanto para antioxidantes hidrofílicos quanto hidrofóbicos, além de se aplicar a uma extensa faixa de pH. Entretanto, o ensaio é bastante criticado pelo composto ABTS não ser encontrado em estruturas biológicas e nem ser representativo de biomoléculas.

Termodinamicamente, um composto que tiver um potencial redox menor que o ABTS+ pode reagir com o radical (MAGALHÃES *et al.*, 2008; GÜLÇİN, 2012).

3.3.2. Método de Captura do Radical DPPH

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical nitrogenado bastante instável, e possui uma coloração roxa. Ao reagir com substâncias redutoras, ou seja, antioxidantes, é transformado em difenil-picril-hidrazina (DPPH-H) (Figura 10), que possui cor amarela. Ou seja, há uma reação que provoca a descoloração do meio (GÜLÇİN, 2012).

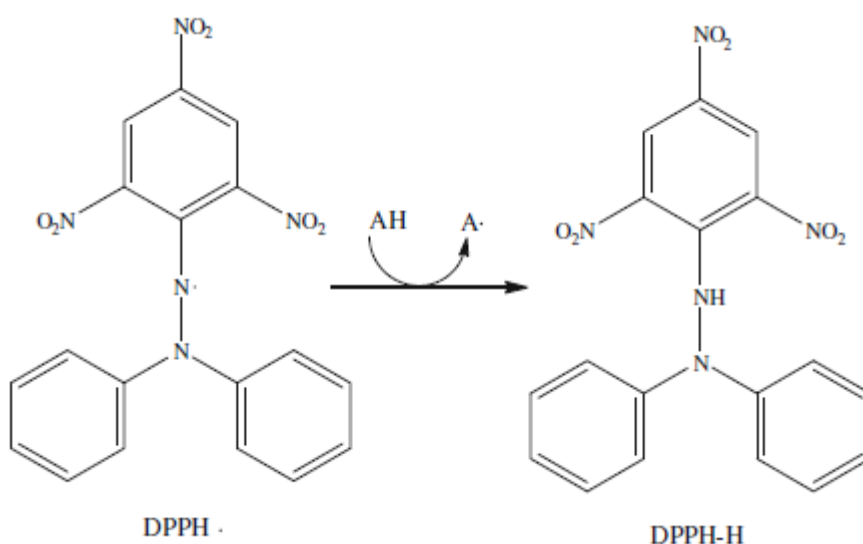


Figura 10: Reação do radical DPPH com um antioxidante (AH), formando o DPPH-H, que causa a descoloração do meio.

Fonte: Gülçin, 2012.

O mecanismo de ação do DPPH é predominantemente do tipo SET, sendo assim, a reação é fortemente influenciada pelo pH e solventes. Esse ensaio geralmente é realizado em solventes orgânicos, como metanol e etanol, pois quantidades maiores que 50% de água provocam a precipitação do DPPH. Como se trata de um ensaio que mede a descoloração do reagente, a forma de expressão mais comum do resultado é o CE_{50%}, ou seja, a concentração de amostra capaz de consumir 50% do DPPH presente. Como o percentual de

consumo de reagente é dependente de sua concentração, é mais certo calculá-lo pela razão das absorvâncias (que são proporcionais às concentrações) da amostra e do reagente (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

O ensaio de DPPH foi a primeira técnica para determinação da capacidade antioxidante, desenvolvida ainda nos anos 1950. (GÜLÇİN, 2012). É uma técnica simples e rápida, já que não é preciso gerar o reagente, como no caso do ABTS. Entretanto, a estrutura do DPPH pode provocar impedimento estérico para a ação de alguns antioxidantes, provocando equívocos. O fato do DPPH também não ser encontrado nos sistemas biológicos também é criticado. (PRIOR, WU e SCAICH, 2005)

3.4. OS ESTUDOS *in vivo*

Muitas substâncias originadas de alimentos com elevada capacidade antioxidante demonstrada *in vitro* podem não apresentar a mesma atividade *in vivo*, uma vez que no segundo caso é preciso considerar a biodisponibilidade desse agente químico, ou seja, em que extensão ele pode chegar aos tecidos-alvo e exercer sua função. Vários fatores podem influenciar, em geral, a biodisponibilidade final desses compostos, como fatores ambientais (exposição ao sol, grau de maturação); fatores relacionados à matriz alimentícia, como a presença de inibidores de absorção e interação com outros compostos; o processamento (processos químicos e físicos de fabricação), estrutura química, concentração e os fatores de variação ligados ao hospedeiro, como idade, presença de patologia, atividade enzimática, dentre outras (D'ARCHIVIO *et al.*, 2010).

Quando se fala em polifenóis, por exemplo, muitas substâncias estão incluídas. Em geral, esse tipo de substância demonstra atividade antioxidante *in vitro*, mas diferentes estruturas químicas de cada polifenol geram diferentes reações ao metabolismo, fazendo-os diferir na atividade *in vivo*. Os polifenóis do café são mais absorvidos, por exemplo, que os do chá preto (NATELLA *et al.*, 2002).

Estudos *in vitro* são menos efetivos na medida real da capacidade antioxidante por colocarem em contato compostos bioativos somente com os

tecidos ou moléculas-alvo sem considerar, porém, a ação prévia do organismo sobre ele. Outro problema são as doses utilizadas nesses ensaios, que normalmente são maiores que aquelas às quais realmente um indivíduo é exposto. Já estudos em humanos podem ser excessivamente demorados e não permitem a avaliação de gerações seguintes (D'ARCHIVIO *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos em humanos, com consumidores de café também tendem a apresentar resultados duvidosos, uma vez que nesses estudos geralmente é analisada a frequência de consumo (em copos ou xícaras), mas dificilmente é considerado o tamanho do recipiente, a forma de preparo, a concentração da bebida, dentre outros fatores importantes para se determinar o real consumo (HIGDON e FREI, 2006). Sendo assim, estudos com modelos animais podem ser muito valiosos.

Com relação à atividade antioxidante *in vivo*, alguns estudos realizados, utilizando-se como matriz o café ou outras, estão exposto na tabela 1. Não foram encontrados, porém, estudos que avaliassem a atividade antioxidante *in vivo*, comparando-se diferentes métodos de extração para preparo da bebida de café.

Tabela 1. Características de alguns estudos de atividade antioxidante (AA) *in vivo*, em ratos

Referência	Matriz	Objetivo	Número de animais	Característica dos animais	Tempo de tratamento	Dose do tratamento	Forma de sacrifício	Material biológico coletado	Ensaio de AA realizados	Resultados encontrados
MACEDO <i>et al</i> , 2013	Vinho tinto	Comparar atividade antioxidante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	5 grupos de 10 animais	Ratos Wistar – Passaram por dieta rica em gordura para induzir estresse oxidativo	4 semanas	Correspondente a 250 mL por adulto de 70 kg	Não especificada	Sangue e fígado	SOD, CAT, GPx e TBARS	Somente o vinho com maior atividade <i>in vitro</i> apresentou também maior <i>in vivo</i> . Nos outros, não foi encontrada diferença significativa
VICENTE <i>et al</i> , 2011	Café	Verificar o efeito da administração de café sobre o estresse oxidativo, com o tempo	6 grupos de 8 animais	Ratos Wistar saudáveis	Dose única	Não especificada	Não especificada	Fígado	SOD, CAT e GPx	Após 1 hora, a atividades das enzimas aumenta. Até 4 horas depois, volta ao nível basal
CARVALHO <i>et al</i> , 2011	Café	Comparar as atividades de café orgânico e tradicional, <i>in vivo</i>	14 grupos de 10 animais	Ratos Wistar – Estresse oxidativo induzido com DMH	12 semanas	Infusão incorporada na ração (100 mL/Kg) ou pó incorporado na ração (40g/Kg)	Punção cardíaca e exsanguineação	Sangue, fígado e cólon	TBARS	Houve diferença entre os valores encontrados para ratos que receberam café e para os que não receberam
ABRAHÃO <i>et al</i> , 2012	Café	Determinar a atividade antioxidante antes e depois da torração	4 grupos de 5 animais	Ratos Zucker diabéticos	30 dias	Correspondente ao consumo humano de 250 mL de café	Punção cardíaca e exsanguineação	Fígado e rim	TBARS	Houve diferença significativa entre o diabético controle e o tratado, mas não houve entre o normal controle e o tratado
VIANA <i>et al</i> , 2012	Café	Analisar o possível efeito do café cafeinado e descafeinado no estresse oxidativo induzido por atividade física	8 grupos de 8 animais	Ratos Wistar - Estresse oxidativo induzido por atividade física	21 dias	Correspondente ao consumo humano de 200 mL de café	Não especificado	Sangue e músculo	SOD, GPx, TBARS	A concentração de MDA diminuiu com o consumo de café cafeinado nos ratos com estresse induzido. Mas não mostrou influência nos ratos saudáveis. Não houve diferença na atividade das enzimas
SARKHAIL <i>et al</i> , 2007	<i>Phlomisianisodonta</i>	Avaliar o efeito antidiabético do extrato etanólico da planta, avaliando também a atividade antioxidante	6 grupos de 6 animais	Ratos Wistar diabéticos	10 dias	Diferentes concentrações	Não especificado	Fígado e sangue	TBARS, SOD, CAT, GPx	Foi encontrada diferença significativa para todos os testes entre o controle diabético e os tratamentos
ROESLER, 2011	<i>Araticum</i>	Observar o efeito protetor do extrato etanólico de araticum sobre o estresse oxidativo	6 grupos de 7 animais	Ratos Wistar - Estresse oxidativo induzido por CCl ₄	14 dias	Diferentes concentrações	Overdose de anestésico	Fígado	TBARS, SOD, CAT, GPx, GR e teor de glutatona	Para o teor de TBARS só foi encontrada diferença comparando-se o grupo com CCl ₄ tratado ou não, mas não em relação ao controle saudável. Já no caso de algumas enzimas, foi encontrada diferença, porém com diminuição da atividade

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

As amostras utilizadas nos testes foram bebidas preparadas a partir de uma única amostra de pó de café selecionada, contendo grãos torrados e moídos da espécie *Coffea arabica*, cultivados da maneira convencional.

A amostra escolhida foi adquirida em um supermercado de Belo Horizonte-MG, em 8 de junho de 2013. As descrições presentes na embalagem do produto indicavam que se tratava de Café Bourbon Amarelo, 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.

A escolha da amostra objetivou que fossem preparados os diferentes tipos de extratos a partir de uma única amostra, para que nenhuma outra variável que não o tipo de extração interferisse na atividade antioxidante. O grau de torração médio foi escolhido por apresentar maior atividade antioxidante e a granulometria “para expresso” foi escolhida porque é crítica para a preparação de café expresso, e sendo assim preparando-se o filtrado e o fervido com o pó da mesma granulometria, evita-se a interferência dessa variável.

Dessa amostra, foram preparados três tipos de extratos, utilizando diferentes tipos de extração: café preparado por infusão e filtrado (tradicional), café preparado por decocção e sem filtração (fervido) e café extraído por água pressurizada (café expresso).

4.2.PREPARO DAS AMOSTRAS

4.2.1. Preparo das bebidas

As bebidas de café tradicional filtrado, fervido e expresso foram preparadas de acordo com o método recomendado pela ABIC, com adaptações. 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 (ABIC, 2012).

A bebida café fervida foi preparada por decocção a partir da amostra de café adaptada às quantidades recomendadas pela ABIC, descritas anteriormente. 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 1000mL.

As bebidas preparadas foram utilizadas para a realização dos testes de atividade antioxidante *in vitro*, e também foram administradas, por gavagem, aos animais no ensaio *in vivo*, como será descrito posteriormente. Para a realização dos testes *in vitro* as bebidas foram previamente liofilizadas. Para os testes *in vivo*, foram utilizadas na forma de extrato aquoso.

4.2.2. Liofilização das amostras

Para a liofilização, foram utilizados 50 mL de cada uma das três amostras de bebidas. Inicialmente, as mesmas foram congeladas em ultrafreezer a -80°C e posteriormente levadas ao liofilizador. Elas permaneceram no processo de sublimação durante aproximadamente 3 dias,

até que foi observada a completa secagem. Posteriormente, o pó resultante foi transferido para frascos identificados, para que fossem realizados os testes *in vitro*.

4.3. ENSAIOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

4.3.1. Método de Captura do Radical DPPH

Para a análise da atividade antioxidante pela captura do radical DPPH foi utilizado o método desenvolvido por Henriques, Castilho & Braga (2012), em microescala. As amostras liofilizadas foram ressuspensas em etanol, gerando soluções com concentrações variando de 4,3 a 71,4 µg/mL. Foi também preparada uma solução etanólica de DPPH a 0,3 mM. Em cada poço de uma microplaca de 96 poços foi adicionada 100 µL da solução da amostra em cada uma das concentrações e 40 µL da solução de DPPH 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 516 nm após 30 minutos da adição de DPPH e a capacidade de reduzir o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando a equação:

$$\% \text{ Atividade} = (A_{Am} / A_C) \times 100$$

Em que A_{Am} é a absorvância lida para a amostra e A_C é a absorvância lida para o DPPH sem amostra (controle). Os percentuais de atividades foram levados a uma curva atividade x concentração, obtida por regressão linear, e, pela equação da reta, foi calculada a concentração capaz de inibir 50% do DPPH, ou concentração eficaz em 50% ($CE_{50\%}$).

4.4.2. Método de Captura do Radical ABTS – Capacidade Antioxidante Equivalente do Trolox (TEAC)

Para a análise da atividade antioxidante pela captura do radical ABTS, foi desenvolvido um método em microescala, baseado no descrito por Ruffino *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 7mM 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 ± 0,02. Em cada poço de uma microplaca de 96 poços foram adicionados 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:

$$\% \text{ Atividade} = (A_{Am} / A_C) \times 100$$

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

A curva de atividade antioxidante (ou de inibição do radical ABTS) *versus* concentração para o Trolox, foi construída utilizando as mesmas quantidades de amostra e do reagente, porém, variando as concentrações de 0,625 a 9,375 µg/mL, correspondentes a 0,0025 a 0,0375 µmol/mL, além do controle sem a substância. A porcentagem de atividade antioxidante foi calculada conforme já descrito para o DPPH e as curvas atividade x concentração foram construídas, tanto para amostra quanto para o Trolox. A atividade da amostra foi calculada em relação à do Trolox, pela razão entre as inclinações das curvas para amostra e para o Trolox, com os resultados sendo expressos em µmol TEAC/g de amostra. O valor de inclinação para o Trolox foi obtido pela média entre os obtidos para as três curvas. Cada valor de TEAC foi obtido a partir da razão da inclinação 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.

4.4 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vivo*

A experimentação animal foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, sob o protocolo de nº34/2011.

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 µL/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 calculado.

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 8mL de sangue dos animais, recolhidos em tubos com e sem EDTA, para que fossem procedidos os testes bioquímicos.

Constatada a morte do animal (perda de sinais vitais), foi feita uma incisão na linha média do abdômen com o auxílio de pinça e tesoura, com o cuidado de retirar primeiro os pêlos antes de expor a cavidade peritoneal. Desta, o fígado foi isolado, cortando-se todas as conexões vasculares 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.

4.4.1. Testes de parâmetros bioquímicos nos animais tratados

Utilizando-se kits diagnósticos gentilmente cedidos pela Bioclin, e utilizando-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.

4.4.2. 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 MpH 7,0), utilizando-se um ultraturrax. O homogeneizado foi então centrifugado a 1010 xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e novamente centrifugado, a 11200 xg, por 20 minutos a 4°C, retirando-se novamente o sobrenadante. Desse último, cerca de 2mL passou por

ultracentrifugação e o restante foi retirado para ser utilizado no teste de TBARS. Os 2mL retirados anteriormente passaram por ultracentrifugação a 105.000 xg por 60 minutos a 4°C. Deste último tratamento, foi obtida a fração citosólica, utilizada na determinação das atividades das enzimas antioxidantes.

4.4.3. 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), adaptado para as condições do laboratório. 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 aliqotados 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 µg/mL. .

4.4.4. 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 aliqotados 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 $\mu\text{mol/L}$.

4.4.5. Avaliação da atividade das enzimas hepáticas

4.4.5.1. 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 pH7,0 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).

4.4.5.2. 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).

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação das médias foi feita pela análise de variância (ANOVA) (MONTGOMERY, 2000). Este método se baseia em particionar a variância total de uma determinada resposta (variável dependente) em duas partes: a primeira devida ao modelo de regressão (no caso, entre grupos) e a segunda devida ao resíduo ou erro (dentro dos grupos). Quanto maior for a primeira em relação à segunda, maior é a evidência da diferença entre as médias dos grupos. Esse modelo tem como pressuposto que seus resíduos tenham distribuição normal com média 0 e variância constante (AMARAL *et al.*, 2012). Havendo diferença significativa entre as médias, foi feito o Teste de Diferença de Médias de Tukey, com 95 % de significância.

O tamanho da amostra biológica (número de animais) foi calculado considerando-se o intervalo de coeficiente da média, resultando-se em oito animais por grupo, num total de trinta e dois animais (SAMPAIO, 2010).

5. RESULTADOS

5.1. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

Nas tabelas 2 e 3 são apresentados os resultados dos ensaios *in vitro*, dos ensaios do DPPH e do ABTS, respectivamente.

Tabela 2. Valores de CE₅₀ obtidos no método de captura do radical DPPH nos diferentes métodos extrativos de café Bourbon Amarelo

Amostra	CE ₅₀ (µg/mL ± DP)
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 3. Valores de CE₅₀ obtidos no método de captura do radical ABTS, expresso em TEAC nos diferentes métodos extrativos de café Bourbon Amarelo.

Amostra	Valor de TEAC (µmol de Trolox/g de amostra ± DP)
Café filtrado	611,90 ± 52,67 ^a
Café fervido	428,39 ± 35,62 ^b
Café expresso	556,05, ± 42,67 ^a

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

5.2. ENSAIOS BIOQUÍMICOS

Os resultados dos ensaios bioquímicos realizados nas amostras de sangue dos animais tratados estão resumidos na Tabela 4. Somente para a glicose foi encontrada diferença estatisticamente significativa.

Tabela 4. Resultados dos ensaios bioquímicos realizados nas amostras de sangue dos animais tratados com diferentes extratos de café Bourbon amarelo, expressos em média ± desvio-padrão

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 mg/dL ^a	54,37 ± 14,12 mg/dL ^a	54,03 ± 23,73 mg/dL ^a	59,67 ± 10,02 mg/dL ^a
Magnésio (mg/dL)	0,28 ± 0,13 mg/dL ^a	0,26 ± 0,11 mg/dL ^a	0,27 ± 0,18 mg/dL ^a	0,30 ± 0,12 mg/dL ^a
Proteínas	3,58 ± 0,56	3,53 ± 0,40	4,06 ± 0,20	4,09 ± 0,20

Totais (g/dL)	g/dL ^a	g/dL ^a	g/dL ^a	g/dL ^a
Albumina (g/dL)	1,65 ± 0,33 g/dL ^a	1,74 ± 0,21 g/dL ^a	1,56 ± 0,18 g/dL ^a	1,61 ± 0,15 g/dL ^a
Fosfatase Alcalina (U/L)	32,29 ± 3,51 U/L ^a	38,73 ± 7,55 U/L ^a	33,27 ± 4,30 U/L ^a	37,01 ± 4,56 U/L ^a
Amilase (U/dL)	0,012 ± 0,004 U/dL ^a	0,010 ± 0,001 U/dL ^a	0,010 ± 0,002 U/dL ^a	0,011 ± 0,001 U/dL ^a
Creatinina (mg/dL)	0,60 ± 0,02 mg/dL ^a	0,55 ± 0,06 mg/dL ^a	0,56 ± 0,13 mg/dL ^a	0,53 ± 0,08 mg/dL ^a

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

5.3. ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vivo*

Nas tabelas 5, 6, 7 e 8 são apresentados os resultados dos testes realizados nas amostras de fígado coletadas dos animais tratados, respectivamente, de proteína, TBARS, catalase e glutathione redutase, acompanhados das respectivas análises estatísticas.

Tabela 5. Valores de teor de proteínas obtidos nas amostras hepáticas dos animais tratados com os diferentes extratos de café Bourbon Amarelo

Amostra	Teor de proteínas (g/100g ± DP)
Controle	24,01 ± 7,65 ^a
Café filtrado	12,72 ± 13,36 ^a
Café fervido	18,56 ± 7,44 ^a
Café expresso	13,88 ± 2,18 ^a

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

Tabela 6. Valores de teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) obtidos nas amostras hepáticas de animais tratados com diferentes extratos de café Bourbon Amarelo

Amostra	Teor de TBARS (µmol de MDA/g de fígado ± DP)
Controle	4,44 ± 1,31 ^a
Café filtrado	4,34 ± 0,46 ^a
Café fervido	5,52 ± 0,91 ^a
Café expresso	5,14 ± 1,11 ^a

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

Tabela 7. Valores de atividade da enzima catalase obtidos nas amostras hepáticas de animais tratados com diferentes extratos de café Bourbon Amarelo

Amostra	Atividade da catalase ($\Delta E/\text{min/g}$ de proteína \pm DP)
Controle	349,44 \pm 299,11 ^a
Café filtrado	413,30 \pm 89,56 ^a
Café fervido	413,52 \pm 237,50 ^a
Café expresso	318,98 \pm 70,89 ^a

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

Tabela 8. Valores de atividade da enzima glutathionaredutase obtidos nas amostras hepáticas de animais tratados com diferentes extratos de Café Bourbon Amarelo

Amostra	Atividade da glutathionaredutase ($\Delta E/\text{min/g}$ de proteína \pm DP)
Controle	378,39 \pm 143,01 ^a
Café filtrado	480,97 \pm 86,72 ^a
Café fervido	442,59 \pm 129,65 ^a
Café expresso	349,22 \pm 62,22 ^a

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

6. DISCUSSÃO

6.1. ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

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.

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, 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 apresenta 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 favoreça a extração de compostos com atividade antioxidante, mas, provavelmente, acelera sua degradação.

O café expresso, extraído por pressão, apresenta condições de extração ainda 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 Niseteoet *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 frisar 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 (ABIC) e sendo assim corresponde aos hábitos da população brasileira, o que pode explicar as diferenças entre as concentrações utilizadas nesse estudo e em outros estudos.

6.2. ENSAIOS BIOQUÍMICOS

As ações do café no organismo, sendo elas relacionadas ou não à atividade antioxidante, podem alterar parâmetros fisiológicos e bioquímicos. 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 (GAMBARONE e ROSA, 2007; ABRAHÃO *et al.*, 2013) e ainda inibe a enzima glicose-6-fosfato, o que interfere diretamente no metabolismo da glicose (MAHER, 2010).

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 também 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 Dijk *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).

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, com os do presente estudo.

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 aos 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.

6.3. ENSAIOS ANTIOXIDANTES *in vivo*

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 (Tabelas 2 e 3). A não correspondência entre os resultados dos testes *in vivo* e *in vitro* pode ser explicada pela ação do metabolismo dos animais tratados. 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. Os resultados também não apresentaram correlação entre si: 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 realizaram 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. Sarkhailat *al.* (2007) testou a espécie vegetal *Phlomis nisodonta* 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, diferenças foram encontradas mesmo entre controle saudável e tratamentos, porém, com diminuição da atividade, o que não é esperado.

Na Tabela 1 da sessão de Revisão Bibliográfica, encontram-se resumidos os dados dos experimentos aqui discutidos. É importante frisar, porém, 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 período de tratamento ou tempo de análise após a ingestão do café e a indução do estresse oxidativo previamente nos animais.

7.CONCLUSÕES

A bebida de café pode ser preparada utilizando-se diferentes métodos extrativos: por infusão e posterior filtração em filtro de papel, obtém-se o café aqui chamado de filtrado; por decocção, sem filtração, o café fervido; e por meio de extração por pressão, utilizando-se equipamento apropriado, tem-se o café expresso. Na avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, o café fervido apresentou menor atividade nos dois ensaios de atividade antioxidante realizados (captura do radical DPPH e captura do radical 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 apresenta 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, como também ser devida a mecanismos de ação específicos do ácido clorogênico. Com relação 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.

Na avaliação da atividade antioxidante *in vivo*, entretanto, não foi verificada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a medida da lipoperoxidação e expressão das enzimas antioxidantes catalase e glutathione redutase, entre controle e tratamentos e nem entre os tratamentos entre si. Esse resultado contraria diversos estudos encontrados na literatura científica, que apontam que o café possui atividade antioxidante *in vivo*. Porém, considerando-se que foram encontradas diferenças significativas nos testes de atividade antioxidante *in vitro*, pode-se sugerir que novos estudos sejam realizados para refinar os resultados encontrados, alterando-se condições do experimento, como o aumento da concentração dos extratos, um maior tempo

de exposição ao tratamento e principalmente induzindo o estresse oxidativo nos animais a serem tratados, para aumentar o limiar de ação antioxidante da amostra.

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

9. TRABALHOS APRESENTADOS

9.1. Perfil químico de amostras de café (*Coffea arabica*) de diferentes cultivos e avaliação do teor de polifenóis totais e da atividade antioxidante

Evento: XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil

Data e local: Bento Gonçalves-RS, 18 a 21 de outubro de 2012

Forma de submissão: Resumo

Forma de Apresentação: Pôster

9.2. Atividade antioxidante *in vitro* de bebidas de café: influência da forma de preparo

Evento: VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil

Data e Local: Salvador-BA, 25 a 28 de novembro e 2013

Forma de submissão: Resumo Expandido

Forma de apresentação: Pôster

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; SOUSA, R. V.; LIMA, A. R. Atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de café bebida mole. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.1, p.127-133, 2012.
- 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.
- AL-QUDAH, M. N., EL-QUDAH, J. M., AL-OMRAN, H., KHATAIBEH, M. H., . AL-GROOM, M. N., OBEIDAT, M. Biochemical Alterations Due to Overcrowding Stress Induction in Healthy Albino Rats. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, vol. 11, n. 17, p. 3059-3063, 2012.
- ALVES, R. C., CASAL, S., OLIVEIRA, B. Benefícios do Café na Saúde: Mito ou Realidade? **Quimica Nova**, v. 32, n. 8, p. 2169-2180, 2009.
- BADARINATH, A. V.; RAO, K. M.; CHETTY, C. M. S.; RAMKANTH, S.; RAJAN, T. V. S.; GNANAPRAKASH, K. A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. **International Journal of Pharm Tech Research**, vol.2, n. 2, p. 1276-1285, 2010.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: avaliação demarcadores. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 33, n. 2, p. 111-128, 2008.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- 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.
- BORRELLI, R.C.; VISCONTI, A.; MENNELLA, C.; ANESE, M.; FOGLIANO, V. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.v.50, n.22, p. 6527-6533, 2002.
- 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/2012 e abr/2014]. 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., CUEVA-LLANOS, 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.; GIUSTI-PAIVA, 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.
- CÉSPEDES, C. L.; MOHAMMED, E. H.; PAVON, N.; ALARCON, J. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts of fruits from Clilean blackberry *Aristoteliachilensis* (Elaeocarpaceae), maqui. **Food Chemistry**, v. 107, p. 820-829, 2008.
- CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 946-962, 1999.
- CROZIER, A., JAGANATH, I.B., CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nature Products Reports**, vol. 26, p. 1001-1043.
- 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.
- DEVASAGAYAM, T. P. A., KAMAT, J. P., MOHAN, H., KESAVAN, P. C. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1282, p. 63-70, 1996.
- 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 descascado sobre a atividade antioxidante, os parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p.703-708, 2009.
- ENCARNAÇÃO, R.O.; LIMA, D.R. *Café e Saúde Humana*. Brasília: Embrapa Café, 2003. 64p.
- FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Assistência Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FUJIOKA, K., SHIBAMOTO, T. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. **Food Chemistry**, v. 106, p. 217–221, 2008.
- GARAMBONE, E., ROSA, G. Possíveis Benefícios do Ácido Clorogênico à Saúde. **Alimentos e Nutrição**, vol. 18, n. 12, p. 229-235, 2007
- GRIGG, D. The worlds of tea and coffee: Patterns of consumption. **GeoJournal**, vol. 57, p. 283-292, 2002.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Archives of Toxicology**, vol. 86, p. 345–391, 2012.

- 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 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.
- HOMAN, D. J.; MOBARHAN, S. Coffee: Good, Bad, or Just Fun? A Critical Review of Coffee's Effects on Liver Enzymes. **Nutrition Reviews**, vol. 64, n. 1, p. 43–46, 2006.
- ISHIMOTO, E. Y. **Efeito hipolipemiante e antioxidante de subprodutos da uva em hamsters**. 2008. 195 p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- ISHIZAKA, Y., YAMAKADO, M., TODA, A., TANI, M., ISHIZAKA, N. Relationship between coffee consumption oxidant status and antioxidant potential in the Japanese general population. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 51, n. 10, p. 1951-1959, 2013.
- KIM, K. W.; KIM, K. S.; PARK, S. D.; KIM, J. K.; CHUNG, K. H.; KIM, D. S.; LEE, Y. C.; KIM, C. H. Effect of *Cervus Korean TEMMINCK* var. *mantichuricus Swinoeon* protease activities, antioxidant and free radical damages in rheumatics arthritis rats. **Toxicology in vitro**, v. 22, p. 80-86, 2008.
- KITZBERGER, C. S. G., SCHOLZ, M. B. S., PEREIRA, L. F. P., VIEIRA, L. G. E., SERA, T., SILVA, J. B. G. D., BENASSI, M. T. Diterpenes in green and roasted coffee of *Coffea arabica* cultivars growing in the same edaphoclimatic conditions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 30, p. 52–57, 2013.
- KRELL, J., STEBBING, J. Coffee: the science and art of moderation. **The lancet oncology**, vol. 13, p. 457-458, 2012.
- LEWANDOWSKA, U., SZEWCZYK, K., HRABEC, E., JANECKA, A., GORLACH, S. Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols (Review). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.61, n. 50, p. 12183-12199, 2013.
- 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, 2010a.
- 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.
- 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.

- LIMA, F.A., VASCONCELOS, S. M. L., SANT'ANA, A. E. G., ATAÍDE, T. R., OMENA, C. M. B., MENEZES, M. E. S., CABRAL-JÚNIOR, C. S. Consumo de café segundo métodos de preparo da bebida e associação com perfil lipídico sérico em hipertensos e diabéticos. **Revista de Nutrição**, v. 24, n.1, p. 109-119, 2011.
- LOPEZ-GARCIA, E., GUALLAR-CASTILLON, P., LEON-MUÑOZ, L., GRACIANI, A., RODRIGUEZ-ARTALEJO, F. Coffee consumption and health-related quality of life. **Clinical Nutrition**, v. 33, p. 143-149, 2014
- 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
- MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C.; Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, vol. 613, p. 1-19, 2008.
- 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.
- MONTGOMERY, D. C. Design and Analysis of Experiments. John Willey e Sons Inc. Nova Iorque, 5ª edição, 2000.
- MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 57, n. 5, p. 1655–1666, 2009.
- MORALES, F. J.; SOMOZA, V.; FOGLIANO, V. Physiological relevance of dietary melanoidins. **Amino Acids**, v. 42, p.1097–1109, 2012.
- MURIEL, P.; ARAUZ, J. Coffee and liver diseases. **Fitoterapia**, vol. 81, p. 297-305, 2010.
- NARDINI, M., CIRILLO, E., NATELLA, F., SCACCINI, C. Absorption of Phenolic Acids in Humans after Coffee Consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 50, n. 20, p. 5735-5741, 2002.
- NATELLA, F., NARDINI, GIANNETTI, I., DATTILO, C., SCACCINI, C.. Coffee Drinking Influences Plasma Antioxidant Capacity in Humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 50, n. 21, p. 6211-6216, 2002.
- 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.
- OCHIAI, R., SUGIURA, Y., SHIOYA, Y., OTSUKA, K., KATSURAGI, Y., HASHIGUCHI, T. Coffee polyphenols improve peripheral endothelial function after glucose loading in healthy male adults. **Nutrition Research**, v. 34, p. 155 – 159, 2014.
- ONUJEGBU, A. J., OLISEKODIACA, J. M., ADEBOLU, O. F., ADESIYAN, A., AYODELE, O. E. Coffee Consumption Could Affect the Activity of Some

- Liver Enzymes and Other Biochemical Parameters in Healthy Drinkers. **Medical Principles and Practice**, vol. 20, p. 514–518, 2011.
- PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, p. 158-169, 1967.
- 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.
- PEREIRA, O. C. F. **Rumex induratus: Caracterização Química e Potencial Antioxidante**. 2009. 128 p. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade – Especialização em Água e Alimentos) – Universidade do Porto, Porto, 2009.
- 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.
- PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 53, p. 4290-4302, 2005.
- QUIDEAU,S., DEFFIEUX, D., DOUAT-CASASSUS, C., POUYSÉGU L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. **Ange wandet Chemie International Edition**, v. 50, p. 586–621, 2011.
- 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 toinflammation and basal glucose metabolism in amulti-ethnic Asian population: a cross-sectionalstudy. **Nutrition Journal**, v. 10, p. 61-70, 2011.
- RODRIGUES, N. P., BRAGAGNOLO, N. Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC–DAD–MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 32, p. 105–115, 2013.
- ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl₄-induced liver damage in rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, vol. 31, n.1, p. 93-100, 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.
- RUBAYISA, A. B.; MEURENS, M. Chemical Discrimination of Arabica and Robusta Coffees by Fourier Transform Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4654-4659, 2005.
- SAKAMOTO,W, ISOMURA H, FUJIE K, TAKAHASHI K, NAKAO K, IZUMI H. Relationshipof coffee consumption with risk factors of atherosclerosis in rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**; v. 49, p.149–54, 2005.
- 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 nisodonta*: Effects on hepatic cells lipid peroxidation

- and antioxidant enzymes in experimental diabetes. **Pharmacological Research**, vol. 56, p. 261–266, 2007.
- SATO, Y., ITAGAKI, S., KUROKAWA, T., OGURA, J., KOBAYASHI, M., HIRANO, T., SUGAWARA, M., ISEKI, K. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 403, p. 136–138, 2011.
- SILVA, J. A., BORGES, N., SANTOS, A., ALVES, A. Method Validation for Cafestol and Kahweol Quantification in Coffee Brews by HPLC-DAD. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 3, p. 1404-1410, 2012.
- SILVA, A. M. O.; ANDRADE-WARTHA, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R., PALAFOX-CARLOS, H., WALL-MEDRANO, A., AYALA-ZAVALA, J. F., CHEN, C-Y. O., ROBLES-SÁNCHEZ, M., ASTIAZARAN-GARCÍA, H. ALVAREZ-PARRILLAB, E., GONZÁLEZ-AGUILARA, G. A. Phenolic compounds: their journey after intake. **Food Function**, v. 5, p. 189-187, 2014.
- 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.
- VITAGLIONE, P.; MORISCO, F.; MAZZONE, G.; AMORUSO, D. C.; RIBECCO, M. T.; ROMANO, A.; FOGLIANO, V.; CAPORASO, N.; D'ARGENIO, G. Coffee Reduces Liver Damage in a Rat Model of Steatohepatitis: The Underlying Mechanisms and the Role of Polyphenols and Melanoidins. **Hepatology**, vol. 52, n. 5, p. 1652-1661, 2010.

- WANG, H., QIAN, H., YAO, W. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. **Food Chemistry**, v. 128, p. 573–584, 2011..
- WANG, S. Y.; FENG, R. T.; LU, Y. J.; BOWMAN, L. DING, M. Inibitory effect activator protein-1 nuclear factor kappaB and cell transformation by extracts of strawberrys (*Fragaria x ananassia* Dutch). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4187-4193, 2008.
- 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.
- YANAGIMOTO, K.; OCHI, H.; LEE, K.G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities of fractions obtained from brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.**, v.52, p.592-596, 2004.