

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

MIRIELI BERNARDES XAVIER

**COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIPROLIFERATIVA DE DUAS CULTIVARES DO CAFÉ
ARÁBICA (*Coffea arabica* L.)**

VITÓRIA
2017

MIRIELI BERNARDES XAVIER

**COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIPROLIFERATIVA DE DUAS CULTIVARES DE CAFÉ
ARÁBICA (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Prof.^a. Dr.^a Maria do Carmo P. Batitucci

VITÓRIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Humanas e Naturais da
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)
Saulo de Jesus Peres – CRB-6 ES-000676/O

X3c Xavier, Mirieli Bernardes, 1989-
Compostos bioativos, atividade antioxidante e
antiproliferativa de duas cultivares do café arábica (*Coffea
arabica* L.) / Mirieli Bernardes Xavier. – Data de publicação.
100 f. : il.

Orientador: Maria do Carmo Pimentel Batitucci.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.

1. Café – Análise – Efeito fisiológico. 2. Café – Torrefação. 3.
Cromatografia a líquido de alta eficiência. 4. Linfócitos. 5.
Sarcoma. I. Batitucci, Maria do Carmo Pimentel. II. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e
Naturais. III. Título.

CDU: 57

**COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIPROLIFERATIVA DE DUAS CULTIVARES DO CAFÉ ARÁBICA
(*Coffea arabica* L.)**

MIRIELI BERNARDES XAVIER

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 20 de dezembro de 2017.

Comissão Examinadora:

Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci - UFES
Orientadora

Dr^a. Cláudia Masrouah Jamal - UFES
Examinador Externo

Dr. José Aires Ventura - INCAPER
Examinador Interno

DEDICATÓRIA

“Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e juntamente entendam que a mão do Senhor fez isto...” (Isaías 41:20)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me sustentado durante esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, que me deram e proporcionaram tudo que estava ao alcance, dando amor e educação.

Aos meus irmãos, que sem dúvida são parte de mim, e sempre estarão ao meu lado.

Ao meu esposo Thiago, que me acompanhou desde o início desta jornada, tendo que ser muito paciente e amoroso. Mais que qualquer um, ele sabe o quanto foi difícil para nós.

À minha orientadora, Professora Maria do Carmo, que sem dúvida fez com maestria seu papel. Mais que uma orientadora, foi um o maior exemplo de integridade na vida acadêmica que pude conhecer. Agradeço não apenas pela oportunidade de fazer parte de seu laboratório, mas pela grande amizade também firmada.

Aos colegas de laboratório, serei eternamente grata: Anny, Jean, Irany, Juliana, Mainã, Monique, Suiany e todos os IC's, Paula, Judá, Felipe, Sávio, Vítor e Alex, todos me ajudaram de alguma forma, seja nas discussões dos assuntos ou em experimentos.

À professora Dâmaris Silveira e a técnica Patrícia Marques Rodrigues da Universidade de Brasília que disponibilizaram a fazer a análise de CLAE e a professora Cláudia Masrouah Jamal, do departamento de Ciências Farmacêuticas da UFES, que ajudou na interpretação dos dados.

Aos colegas e professores do PPGBV, dos quais tenho grande apreço, em especial a Carol Quenupe, que estudou comigo antes da entrada no PPGBV.

À banca, prof^a Cláudia Masrouah Jamal e prof. José Aires Ventura, que aceitaram compartilhar seus conhecimentos na avaliação do presente trabalho.

À FAPES pelo financiamento através da bolsa.

À UFES, pela disponibilização de todos os insumos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estimativa da exportação de café verde, em milhões de sacas, nas safras de 2012/13 a 2016/2017.....	19
Figura 2 - Estrutura fundamental dos flavonoides.....	24
Figura 3 - Tanino hidrolisável: Ácido tânico.....	25
Figura 4 - Tanino condensado: Procianidina.....	26
Figura 5 - Ácido clorogênico (5-ACQ).	27
Figura 6 - Estrutura química da trigonelina.	28
Figura 7 - Reações de Fenton e Haber-Weiss, na geração de espécies reativas de oxigênio.	31
Figura 8 - Redução do DPPH após a doação de um átomo de hidrogênio por substância antioxidante (AH).....	32
Figura 9 - Estabilização do ABTS ⁺ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	33
Figura 10 - Redução do FeIII-TPTZ a FeII-TPTZ, por doação de elétron em meio ácido.....	33
Figura 11 - Redução do MTT à formazan.	35
Figura 12 - Linhagem celular tumoral de <i>Mus musculus</i> : Sarcoma 180.....	37
Figura 13 - Amostras de duas cultivares de café arábica provenientes de uma propriedade particular em Santa Maria de Jetibá – Espírito Santo.	40
Figura 14 - Amostras de café na condição seca e pilada.....	40
Figura 15 - Cromatograma obtido por CLAE através do padrão cloridrato de trigonelina.....	56

Figura 16 - Cromatograma obtido por CLAE através do padrão ácido clorogênico.....	56
Figura 17 - Curva de calibração do padrão trigonelina a 272 nm em análise por CLAE.....	57
Figura 18 - Curva de calibração do padrão ácido clorogênico a 280 nm em análise por CLAE.	57
Figura 19 - Cromatograma (CLAE), a 272 nm, do extrato etanólico da amostra “Catucaí amarelo 2SL torra 1” (CAT1).....	58
Figura 20 - Cromatograma (CLAE), a 280 nm, do extrato etanólico da amostra “Catucaí amarelo 2SL seco e pilado” (CASP).	58
Figura 21 - Viabilidade celular em linfócitos humanos do cultivar “Catuaí Vermelho IAC 99”, em diferentes níveis de processamento pós-colheita (Grupamento 1) à 630nm.	71
Figura 22 - Viabilidade celular em linfócitos humanos do cultivar “Catuaí Vermelho IAC 99 Bóia”, em diferentes níveis de processamento pós-colheita (Grupamento 2) à 630nm.	71
Figura 23 - Viabilidade celular em linfócitos humanos do cultivar “Catucaí amarelo 2SL”, em diferentes níveis de processamento pós-colheita (Grupamento 3) à 630nm.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais espécies reativas de oxigênio formadas no organismo.	29
Tabela 2 – Gradiente de eluição para análises por CLAE na detecção de trigonelina e ácido clorogênico.....	43
Tabela 3 – Concentração de taninos e flavonoides (mg.g^{-1}) de duas cultivares do café arábica, Catuaí Vermelho IAC 99 e Catucaí amarelo 2SL, em diferentes níveis de processamento pós-colheita.....	52
Tabela 4 – Concentração de trigonelina e ácido clorogênico ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) contidos nas amostras de café.....	59
Tabela 5 – Padrão de similaridade das amostras, com os padrões de trigonelina e ácido clorogênico, contidos nas amostras de café.....	59
Tabela 6 – Atividade antioxidante de duas cultivares do café arábica, Catuaí Vermelho IAC 99 e Catucaí amarelo 2SL, em diferentes níveis de processamento pós-colheita em quatro diferentes métodos (DPPH, ABTS, FRAP e Atividade Quelante do Fe^{2+}).....	66
Tabela 7 – Matrix de correlação de Pearson.....	67
Tabela 8 - Atividade antiproliferativa de células tumorais (Sarcoma 180) de duas cultivares do café arábica, Catuaí vermelho IAC 99 e Catucaí amarelo 2SL, em diferentes níveis de processamento pós-colheita pelo método do MTT (630 nm).....	74

RESUMO

O café é a segunda bebida mais consumida no mundo e tem o Brasil como o principal produtor e exportador em nível mundial. O Espírito Santo é o segundo maior produtor de café do país e grande parte de sua economia é voltada para o comércio deste fruto. O café arábica (*Coffea arabica* L.) é o que possui maior valor comercial e por isso, é a espécie mais exportada atualmente. Além de seu valor comercial, o café também é conhecido por possuir propriedades farmacológicas, que são reforçadas pelos relatos da presença de constituintes químicos com atividade antioxidante. Com base nisto, o presente estudo avaliou os extratos etanólicos de duas cultivares de café arábica, “Catuaí vermelho IAC 99” e “Catucaí amarelo 2SL”, em diferentes níveis de processamento pós-colheita de forma a quantificar os marcadores trigonelina e ácido clorogênico, por CLAE; verificar os teores totais de taninos e flavonoides; analisar a atividade antiproliferativa pelo método do MTT, com células saudáveis (linfócitos humanos) e tumorais (Sarcoma 180), e, também, avaliar a atividade antioxidante dos extratos por meio de quatro diferentes métodos: ABTS^{•+}, DPPH, FRAP e Atividade quelante do ferro (Fe²⁺), de maneira a identificar o extrato com melhor desempenho, a fim de orientar a melhor condição para consumo e demonstrar as possíveis influências do seu processamento sobre suas características químicas. Os resultados sugerem que a amostra do café Catucaí amarelo seco e pilado (CASP) possui a melhor atividade antioxidante entre todas as amostras avaliadas, mas de modo geral, as amostras secas e piladas apresentaram o melhor desempenho, sugerindo ser a melhor forma de consumo, no que se refere ao aproveitamento máximo de seus compostos bioativos. A classe de compostos mais correlacionada com a atividade antioxidante foi a dos taninos, entretanto, não se pode descartar a ação dos flavonoides e ácidos clorogênicos. Os processos de torra se mostraram prejudiciais para a qualidade da bebida, no que tange à disponibilidade de compostos bioativos, os dois níveis de torra determinaram perdas sucessivas de compostos bioativos e, conseqüentemente, da atividade antioxidante. Os testes do MTT em células saudáveis indicaram que as amostras atuaram como mitógenos, entretanto a amostra Catuaí vermelho cereja imaturo (CVCI) obteve o maior percentual de atividade proliferativa, não sendo possível atestar o responsável por este efeito. Em células tumorais, foi observada morte celular em todas as condições avaliadas, onde foi encontrada

correlação com a presença de ácido clorogênico e trigonelina, inferindo que a presença destes compostos dificulta a morte celular.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L. • CLAE • MTT • torra • linfócitos humanos • sarcoma 180.

ABSTRACT

Coffee is the second most consumed drink in the world and has Brazil as the main producer and exporter worldwide. Espírito Santo is the second largest producer of coffee in the country and much of its economy is focused on the trade of this fruit. The Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) is the most valuable commercially and therefore is the most exported specie nowadays. In addition to its commercial value, coffee is also known to have pharmacological properties, which are reinforced by the presence of phytochemical constituents with antioxidant activity. Based on this, the present study evaluated the ethanolic extracts of two arabica coffee cultivars, "Catuaí vermelho IAC 99" and "Catuaí amarelo 2SL", in different post-harvest levels processing in order to quantify trigonelline and chlorogenic acid by HPLC; verify the content of total tannins and flavonoids by colorimetric test; analyze the antiproliferative activity by the MTT method with healthy cells (human lymphocytes) and tumor cells (Sarcoma 180), and evaluate the antioxidant activity of the extracts through of four different colorimetric methods: ABTS^{•+}, DPPH, FRAP and Activity (Fe²⁺), in way to identify the extract with better performance, in order to guide the best condition for consumption and to demonstrate the possible influences of its processing on its phytochemical characteristics. The results suggest that the sample of "Catuaí amarelo seco e pilado" (CASP) had the best antioxidant activity among all the samples evaluated, but in general, the dry and pounded samples presented the best performance, implying that it is the best form of consumption, regarding the maximum use of its bioactive compounds. The class of compounds most correlated with the antioxidant activity was tannins, however, it is not possible to discard the action of the other compounds evaluated here. The roasting processes were detrimental to the quality of the drink, regarding the availability of bioactive compounds, the two

roasting levels determined successive losses of bioactive compounds and, consequently, of the antioxidant activity. The MTT tests on healthy cells indicated that the samples served as mitogens, however, the sample “Catuaí vermelho cereja imaturo” (CVCI) obtained the highest percentage of proliferative activity, not being able to attest the accountable for this effect. In tumor cells, was noticed cell death in all conditions evaluated, where was found a correlation with the presence of chlorogenic acid and trigonelline, inferring that the presence of these compounds hinders cell death.

Keywords: *Coffea arabica* L. • HPLC • MTT • roasting • human lymphocytes • sarcoma 180.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 CAFÉ.....	18
2.2 PRODUÇÃO E QUALIDADE DA BEBIDA.....	19
2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ	23
2.3.1 Flavonoides	23
2.3.2 Taninos	24
2.3.3 Ácido clorogênico	26
2.3.4 Trigonelina	27
2.4 RADICAIS LIVRES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	28
2.5 VIABILIDADE CELULAR.....	34
2.5.1 Linfócitos Humanos	35
2.5.2 Sarcoma 180	36
3 OBJETIVO GERAL	38
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 COLETA DOS FRUTOS E PRODUÇÃO DE EXTRATOS ETANÓLICOS	39
4.2 TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS	41
4.3 TEOR DE TANINOS TOTAIS.....	42
4.4 ANÁLISE CLAE: ÁCIDO CLOROGÊNICO E TRIGONELINA	42
4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	43
4.5.1 Ensaio DPPH	44
4.5.2 Ensaio ABTS	44
4.5.3 Ensaio FRAP	45
4.5.4 Atividade quelante do Fe²⁺	46
4.6 VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA (MTT).....	47
4.6.1 Viabilidade celular – Linfócitos humanos	47
4.6.2 Viabilidade celular – Sarcoma 180	49
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6.1 ANÁLISE COLORIMÉTRICA: Flavonoides e Taninos	52

6.2 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E TRIGONELINA ATRAVÉS DE CLAE.....	55
6.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	63
6.4 VIABILIDADE CELULAR.....	69
6.4.1 Viabilidade celular - Linfócitos humanos.....	69
6.4.2 Viabilidade celular - Sarcoma 180.....	72
7 CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICES	92
ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

O café é uma bebida reconhecida mundialmente e, apesar de não fazer parte das espécies nativas brasileiras, se adaptou facilmente as condições climáticas e diferenciadas do país, fazendo com que o Brasil se tornasse o maior produtor e exportador mundial de café, tendo o Espírito Santo como o segundo maior produtor nacional.

Investimentos para agregar valor à bebida têm sido um incentivo para produtores, uma vez que isto resulta no valor final da saca. Assim, processos ligados a tratamentos pré e pós-colheita podem garantir uma bebida de qualidade que é requerida pelo consumidor, seja no Brasil ou no exterior.

Além do potencial econômico, o café também é conhecido por possuir propriedades bioativas que estão relacionadas, principalmente, à capacidade antioxidante. A presença de ácido clorogênico, trigonelina, taninos, cafeína e outros compostos fenólicos fornecem ao café esta característica quimioprotetora e, há relatos de que as maiores concentrações destes elementos se encontram no fruto verde, entretanto, esta composição pode variar de acordo com a espécie e os processos de pré e pós-colheita aos quais o café é condicionado.

Compostos antioxidantes têm a capacidade de reduzir a atividade de radicais livres, estes por sua vez estão envolvidos em processos importantes do sistema biológico, mas, em excesso, podem determinar danos irreparáveis ao organismo, como a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao material genético. Desta forma, os radicais livres estão relacionados a diversas doenças como câncer, aterosclerose, diabetes, doenças cardiovasculares, incluindo doenças degenerativas como o Alzheimer. Pesquisas em andamento também visam avaliar se o café é capaz de reverter doenças já instaladas. Apesar da existência de divergência entre os estudos, é possível que o café tenha um efeito benéfico também para este tipo de ação, que inclui a morte de células tumorais.

No entanto, o processo de torrefação ao qual o café é condicionado, pode influenciar na composição química, de modo a degradar ou formar novos

compostos, principalmente pelas reações de Maillard, que são responsáveis pela cor e sabor dos alimentos. Assim, o aumento do nível de torra pode estar ligado à diminuição de compostos bioativos e, possivelmente, à diminuição dos efeitos protetivos.

Considerando-se a importância do café, tanto para a economia quanto para a saúde, o presente estudo avaliou, em diferentes etapas de maturação ou processamento do café, as alterações nas concentrações de alguns compostos bioativos de interesse, correlacionando os resultados às melhores condições para o aproveitamento destes elementos. Em outro ponto, avaliaram-se como o ácido clorogênico, tanino, flavonoide e trigonelina se comportam durante etapas distintas do processo de produção do café arábica em duas de suas cultivares: Catuaí vermelho IAC 99 e Catucaí amarelo 2SL.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CAFÉ

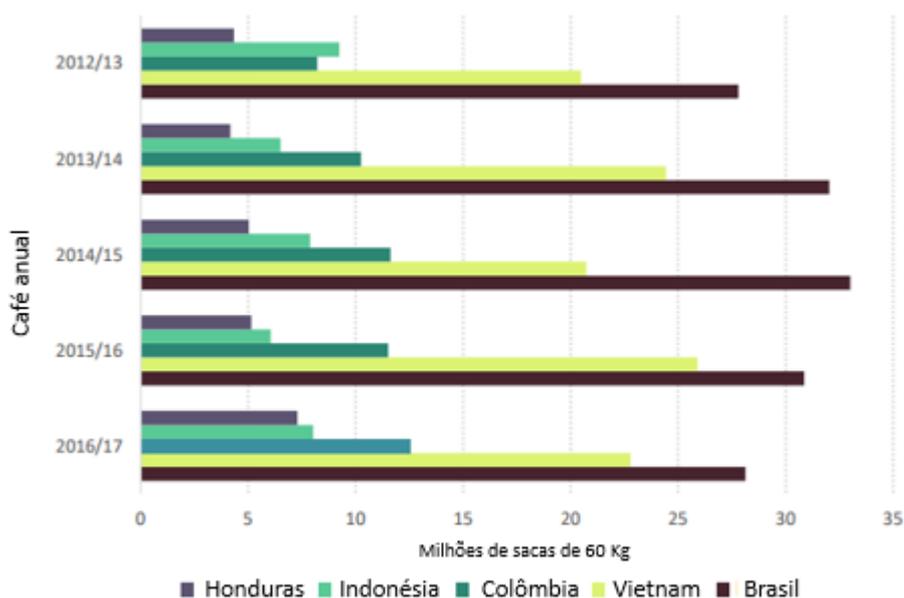
Pertencente à família Rubiaceae e originário continente Africano, o café faz parte da vegetação natural daquela região, e sua primeira referência alusiva, data do ano de 575, com chegada ao Brasil somente em 1727, no estado do Pará (ABIC, 2017a). A condição climática favorável fez com que o Brasil se tornasse um dos maiores produtores de café do mundo e, atualmente, é possível encontrar o cultivo comercial deste fruto nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Paraná, Rondônia, Mato Grosso, Rio de Janeiro e Espírito Santo, sendo este último o segundo maior produtor do país (BRAGANÇA, 2001; MARQUES, 2004; FREDERICO, 2013).

Das quase 100 espécies de café dispersas em todo o mundo, apenas duas possuem relevância econômica: o café arábica (*Coffea arabica* L.) e o café conilon (*Coffea conephora* P.), este último, genericamente, chamado de robusta. O fruto do café é formado pelo grão (endosperma e embrião), que por sua vez está envolvido pelo pergaminho (endocarpo), pela polpa ou mucilagem (mesocarpo) e, mais externamente, pela casca (exocarpo) (MATOS; MAGALHÃES; FUKUNAGA, 2006).

Estima-se que aproximadamente 80% da produção de café no Brasil é da espécie arábica, com os outros 20% voltados para a produção de conilon (CONAB, 2017), produção que pode variar de acordo com o ano.

Hoje, o café é segunda bebida mais consumida no mundo (SERBAI; OTTO. NOVELLO, 2014) e o Brasil é o maior produtor e exportador deste fruto, além de ser o segundo maior consumidor mundial da bebida (NAKAZONE; SAES, 2004; SANTOS et al., 2009; CECAFÉ, 2017). Os maiores importadores de café do Brasil são: União Européia, Estados Unidos, Japão, Canadá, Turquia e México (ABIC, 2017b). A Figura 1 mostra em um panorama geral, como foi a exportação de cafés verdes nas safras dos últimos anos.

Figura 1 - Estimativa da exportação de café verde, em milhões de sacas, nas safras de 2012/13 a 2016/2017.



Fonte: ICO (2017).

A saca de café é estimada em 60 kg e, segundo a Organização Internacional do Café (ICO, 2017), apesar da queda de 8,8% na exportação, houve o aumento de 9,2% na safra de 2016/17, sendo que o Brasil produziu 55 milhões de sacas.

A qualidade da bebida tem-se tornado uma grande aliada à valorização da saca, entretanto, o Brasil não está dentre os maiores fornecedores de café de qualidade. Segundo Nakazone e Saes (2004), o país é um forte fornecedor quando se refere à quantidade, mas no viés da qualidade, países como Guatemala, Colômbia, Costa Rica e Quênia são os maiores referenciais. Muitos produtores têm apostado na cultura de café *gourmet*, a fim de alcançar maior qualidade da bebida e por fim melhorar o rendimento final e, recentemente alcançou a marca de exportação de cafés especiais em 18%, de todo o café produzido no Brasil (CECAFÉ, 2016).

2.2 PRODUÇÃO E QUALIDADE DA BEBIDA

A produção de café no Brasil tem um forte impacto na economia do país e nos últimos anos o mercado cafeeiro tem visado um novo nicho econômico na produção deste vegetal e com rentabilidade mais atrativa: a produção de cafés

especiais ou *gourmets* (PAIVA, 2005). Este nicho visa competir com países voltados para uma produção de cafés especiais, uma vez que a demanda por este tipo de produto tem aumentado significativamente (LEME; MACHADO, 2010). Segundo Matielo et al. (2005, apud PEREIRA et al., 2015), o consumo de cafés especiais cresce de 10 a 15% ao ano, em contrapartida o consumo de cafés tradicionais cresce apenas de 1 a 1,5%.

O Brasil não era um consumidor relevante deste tipo de café, isso porque o país comumente ficava com o café residual para consumo interno e os melhores grãos eram exportados (BACCI, 2007), atualmente a demanda por estes produtos tem aumentado, e isso se deve possivelmente a alta promoção. Concursos que elegem o melhor café, certificações de lavouras, valorização de marcas, competitividade, saturação do mercado e preocupação com a satisfação do consumidor final, contribuíram para aumento de consumo destes tipos de grãos (MAFRA, 2008; LEME; MACHADO, 2010).

Vale salientar que antes de chegar à mesa do consumidor final, o café passa por um ciclo de produção, beneficiamento, processamento e prova. Assim, o processo pós-colheita é fundamental para a produção de uma bebida de qualidade, principalmente quando se busca a produção de bebidas especiais. Um fator ligado à qualidade bebida é a espécie cultivada, o café arábica é o mais comumente utilizado para a produção de cafés especiais, mas os *blends* (mistura de arábica e conilon) também podem ser utilizados desde que atendam às normas de qualidade (SEBRAE, 2008).

A cultivar Catuaí vermelho IAC 99, originado do cruzamento entre as variedades “Mundo novo” e “Caturra” é caracterizado por ter porte baixo, internódios curtos, ramificação secundária com frutos vermelhos e maturação média a tardia sendo uma das cultivares mais plantadas no Brasil (IAC, 2017). Outra cultivar é o Catucaí amarelo 2SL, que é resultado dos cruzamentos entre as variedades “Icatu” e “Catuaí”, possuindo características como porte baixo a médio, internódio curto, ramificação secundário de frutos amarelos com ciclo de maturação médio (MACEDO et al., 2015; Consórcio Pesquisa Café, 2017). Estas duas cultivares da

espécie *Coffea arabica* L. são exemplos de cafés utilizados na produção de bebidas especiais.

A composição química dos grãos crus, um dos fatores que interferem na qualidade final da bebida, é determinada por aspectos genéticos, ambientais, adubação, trato fitossanitários, ligados à maturação dos frutos, cuidados durante a colheita, secagem e, por fim, no beneficiamento, armazenagem e modo de preparo (SILVA, 2005; SIMOES; FARONI; QUEIROZ, 2008). Além disso, outros fatores podem influenciar na qualidade da bebida, como a presença de grãos imperfeitos (brocados, verdes, pretos), provenientes de uma colheita atrasada ou adiantada, e impurezas (cascas, paus e pedras), que podem diminuir a qualidade da bebida final (MORAIS, 2008; THOMAZIELLO, 2014).

Em 1989, a Associação Brasileira de Indústria de Café (ABIC) criou um selo de pureza com o objetivo de identificar os cafés que eram livres de impurezas, entretanto, este selo não diz respeito à qualidade da bebida. Assim, em 2004, foi criado, pela mesma instituição, o Programa de Qualidade do Café (PQC), com o objetivo de aumentar o consumo interno através da certificação de qualidade, que classifica o café em três níveis: Tradicional, Superior e *Gourmet*.

No estágio de processamento do café, principalmente de cafés especiais é comum à ocorrência de seleção pós-colheita, e mesmo com a retirada das impurezas, faz-se necessário, por exemplo, passar pelo separador hidráulico para que seja feita a separação dos cafés denominados “bóia” (grãos defeituosos) dos cafés cereja perfeitos, para que estes passem pelo processo de secagem separados (SILVA et al., 2017), essa técnica proporciona a separação de grãos mais homogêneos (SANTOS; CHALFOUN; PIMENTA, 2008). Segundo Reinato et al. (2002), os cafés cereja possuem uma umidade próxima dos 60% b.u e por isso necessitam de cuidados especiais durante a secagem.

No Brasil, esta etapa do processamento pode ocorrer por duas vias: via seca ou via úmida. Em via seca tem-se a secagem do mesmo em terreiro ou é promovida por secadores mecânicos (SIMOES; FARONI; QUEIROZ, 2008), já no processo por via úmida, o café é submetido às operações de descascamento lavagem e à

retirada de parte da mucilagem (SILVA et al., 2017). Segundo Filho e Silva (2005), no Brasil, a técnica mais utilizada é o processamento por via seca, comumente realizada em um terreno onde os grãos ficam expostos ao sol sendo revolvidos durante dia para que haja uniformidade na secagem, de modo a alcançar uma umidade próxima dos 11 ou 12%. Após isto, os grãos secos devem ser armazenados em locais apropriados. Reinato et al. (2002) acrescenta os benefícios do secador mecânico, que visam contornar problemas comuns da secagem via úmida, como necessidade de mão de obra, clima favorável e terreiros, entretanto, o custo deste processo para o produtor se torna elevado por conta dos gastos com energia.

A partir disso, o próximo passo é o beneficiamento do café, que trata do conjunto de operações que visam atender aos padrões de comercialização (REZENDE; ROSADO; GOMES, 2007, apud SILVA; MORELI; JOAQUIN, 2015). A retirada das cascas originando o café verde é um exemplo de beneficiamento (NASCIMENTO, 2006). Após isto, o café passa pelo processo de torra, cujo objetivo é promover o aroma e sabor da bebida, que irão depender de sua composição química (DE MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999; BAGGENSTOSS et al., 2008; NAIDU, et al., 2008; ABRAHÃO, 2010; LIMA et al., 2010). Este processo promove a expansão do volume, sem o rompimento da parede e com a formação de poros na parede celular que facilitam o processo de moagem (SCHOLZ et al., 2011).

Após a torra, o café segue para a etapa de classificação, denominado prova de xícara. A prova de xícara consiste em uma avaliação sensorial da amostra de café, feita por um profissional treinado e com anos de experiência (PAIVA, 2005). A avaliação da bebida é realizada após sua torra e segundo o MAPA (2003) a bebida de café arábica pode ser classificada como: estritamente mole, mole, apenas mole, dura (para bebidas finas) e riada, rio e rio zona (para bebidas fenicadas). Esta avaliação dá uma ideia geral da qualidade da bebida, estando assim, ligada ao valor final da saca.

2.3 COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ

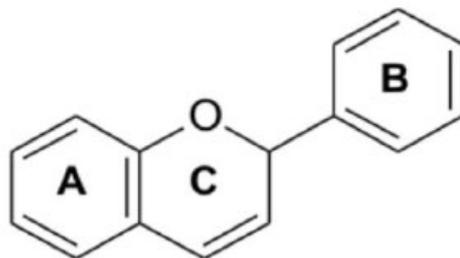
O relevante consumo de café em nível mundial, tem despertado o interesse de muitos pesquisadores no que tange a relação entre a qualidade da bebida e compostos bioativos, ligados ao café verde, mas principalmente ao torrado, que é a forma mais comumente consumida (MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999; LIMA et al., 2010). O grão cru é caracterizado por possuir constituintes voláteis como, a trigonelina e ácidos clorogênicos, e constituintes não voláteis como açúcares, proteínas, aminoácidos, compostos fenólicos, dentre outros (MOREIRA; TRUGO; MARIA, 2000; ABRAHÃO et al., 2008). Segundo Rezende (2016), a síntese de compostos bioativos em plantas, ocorre pela via do metabolismo secundário, onde a plasticidade genética somada a fatores bióticos e abióticos garantem a produção de determinados compostos para sua proteção e ou sinalização, e que podem ser utilizados na dieta humana para fins medicinais. Este englobado de substâncias é capaz de interagir com o corpo, podendo atuar como antioxidantes e ainda trazer benefícios aos sistemas orgânicos dos indivíduos (STELMACH; POHL; MADEJA, 2015).

2.3.1 Flavonoides

Os flavonoides pertencem a uma ampla classe de compostos fenólicos, sua síntese se dá pela combinação de derivados da fenilalanina (via do ácido chiquímico) e ácido acético (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Sua estrutura básica possui dois anéis fenólicos (A e B) o terceiro anel podendo ser um pirano (C), (Figura 2) (ANGELO; JORGE, 2007; SILVA et al., 2015). Segundo Aherne e O'brien (2002), a presença do terceiro anel em forma de pirano, torna possível a formação das subclasses como: leucoantocianinas e antocianidinas, já a presença de uma pirona no terceiro anel é possível originar flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas.

As diferentes estruturas dos flavonoides e suas respectivas atividades biológicas ocorrem por modificações provenientes de hidroxilações, metilações, hidrogenações, melonilações, sulfatações e glicosilações (MACHADO, 2010).

Figura 2 - Estrutura fundamental dos flavonoides.



Fonte: Angelo e Jorge (2007).

Em sua grande parte, os flavonoides são responsáveis pela cor e o sabor dos alimentos (KAAKOUSH; MORRIS, 2017), e dentre seus benefícios para a saúde, pode-se citar as atividades antioxidante, antitumoral e antiinflamatória, além de sua atuação contra doenças cardiovasculares (OLIVEIRA et al., 2010; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Alguns trabalhos têm proposto mecanismos antioxidantes provenientes dos flavonoides, como a inibição dos sistemas enzimáticos responsáveis pela formação de radicais livres (ciclooxigenase, lipoxigenase ou xantina oxidase), quelação de íons metálicos que participam das reações que formam radicais livres, sequestro de radicais livres e regulação gênica para produção de enzimas antioxidantes. (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000, PIETTA, 2000; HERNANDEZ-MONTES et al., 2006). Apesar disto, Xiao et al (2011), afirmam serem necessários mais estudos que comprovem a eficácia dos flavonoides e que visem suas relações dose-respostas, além da identificação dos flavonoides mais bioativos.

2.3.2 Taninos

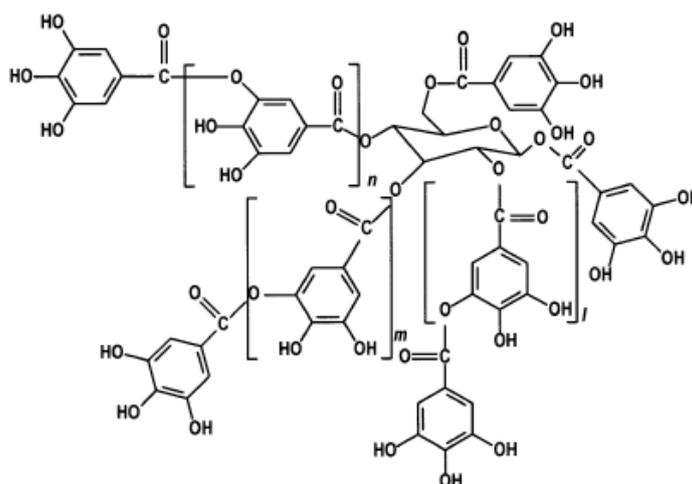
Os taninos compreendem um importante grupo de compostos fenólicos e apresentam alto peso molecular, que pode variar de 500 a 3.000 Dalton (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2008). São capazes de formar complexos com proteínas (como pontes de hidrogênio, ligações hidrofóbicas ou ligações

covalente) (COWAN, 1999), sendo responsáveis ainda pela adstringência em muitos alimentos, ao formar um complexo insolúvel com as proteínas salivares (SOARES; MATEUS; FREITAS, 2012). Eles ocorrem em uma ampla variedade nas plantas e estão ligados à proteção contra herbivoria, fungos, bactérias e vírus (SERAFIN et al., 2007).

De acordo com sua estrutura química, os taninos podem ser classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Segundo Haslam (1989, apud FALCAO; PEREIRA; ARAUJO, 2016), as plantas que comumente sintetizam taninos hidrolisáveis tendem a não sintetizar quantidades relevantes de taninos condensados, sendo que para esses autores, isto também é válido para o inverso.

Os taninos hidrolisáveis compreendem em ésteres de ácido gálico e ácidos elágicos glicosilados, tendo o ácido chiquímico como precursor, onde o ácido tânico é um exemplo (Figura 3) (PEREIRA; CARDOSO, 2012, VARGAS, 2017). Após sua hidrólise, os taninos liberam carboidratos e ácidos fenólicos (NOZELLA, 2001).

Figura 3 - Tanino hidrolisável: Ácido tânico.

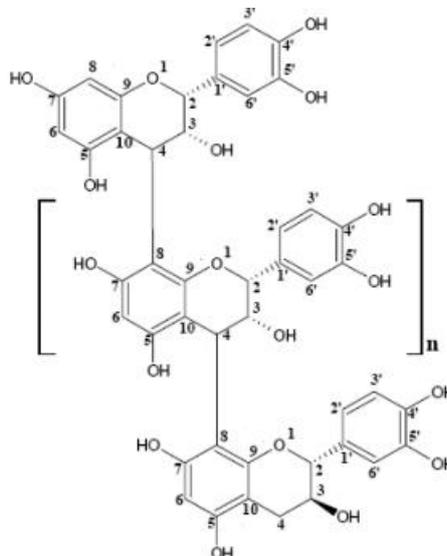


Fonte: Adaptado de Nakamura, Tsuji e Tonogai (2003).

Os taninos condensados ou proantocianidinas são constituídos de ao menos 2 unidades de flavonoides resultantes de rotas biossintéticas diferentes: do ácido chiquímico e do acetato, tendo a procianidina como exemplo (Figura 4)

(SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001; SANTOS, 2007 apud MARCHINI, 2015). Essa classe é resistente à hidrólise, mas pode ser solúvel em solventes orgânicos (NOZELLA, 2001).

Figura 4 - Tanino condensado: Procianidina.



Fonte: Adaptado de Queiroz, Morais e Nascimento (2002).

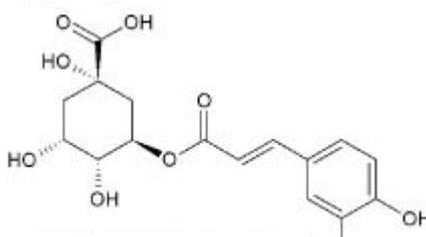
Segundo Ferrão et al., (2003), as atividades farmacológicas dos taninos são comuns às duas classes e são, em parte, devidas a algumas características existentes: sua atividade antioxidante e a complexação de íons metálicos e outras macromoléculas. Atividades industriais como tratamento de água, produção de borracha e curtimento de couro, também são citadas na literatura como ações envolvendo os taninos (MANGRICH et al., 2013; MEUNIER; FERREIRA, 2015; PASTORE JUNIOR, 2017).

2.3.3 Ácido clorogênico

Os ácidos clorogênicos (ACG's) são amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo um dos principais representantes de compostos fenólicos (ABRAHÃO et al, 2010). Estes são formados a partir da esterificação do ácido quínico, com alguns derivados do ácido cinâmico (como ácido caféico, ácido ferúlico e p-cumárico),

onde o ácido clorogênico (5-ACQ) é o composto mais presente (Figura 5) (CLIFFORD; KELLARD; BIRCH, 1989, ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

Figura 5 - Ácido clorogênico (5-ACQ).



Fonte: Oliveira e Bastos (2011).

Alimentos como maçã, alcachofra, berinjela e frutas cítricas, apresentam teores consideráveis de ácido clorogênico. Porém, o café é considerado a maior fonte deste composto (MONTEIRO; TRUGO, 2005). No café, a degradação deste composto, contribui de forma significativa para o sabor da bebida, originando inclusive compostos bioativos benéficos (FERNANDES et al., 2001; ROSSETTI, 2007). Sua função biológica está ligada não somente à atividade antioxidante, mas também às ações antimicrobianas, anticarcinogênica e hipoglicemiante (KASAI et al., 2000; ALMEIDA, 2007; PARI; KARTHIKESAN; MENON, 2010).

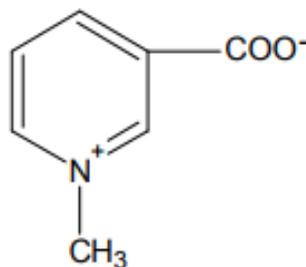
Durante o processo de torrefação, o ácido clorogênico e outros compostos bioativos do café podem ter suas subunidades incorporadas às melanoidinas (BEKEDAM, 2008). Estas estruturas são formadas após o aquecimento e são originadas pelas reações de Maillard, responsáveis por alterações características dos alimentos como cor e sabor e, provém da basicamente de reações não enzimáticas entre aminoácidos e açúcares redutores ou ainda pela desidratação de carboidratos com uma reação de polimerização (MARTINS; JONGEN; VAN BOEKEL, 2000; LEONHARDT, 2015; DURÁN et al., 2016).

2.3.4 Trigonelina

A trigonelina (Figura 6) é uma N-metil betaína com propriedades sensoriais, nutricionais e com efeitos adversos no sistema nervoso central (MONTEIRO;

TRUGO, 2005). Classificada como um alcaloide, a trigonelina tem o ácido nicotínico como precursor (JOSHI;HANDLER, 1960).

Figura 6 - Estrutura química da trigonelina.



Fonte: Andrade (2009).

No café, seus maiores benefícios são constatados após o aquecimento, uma vez que, durante a torra do café, a trigonelina forma diferentes compostos responsáveis, principalmente, pelo sabor e aroma da bebida, como é o caso das piridinas, do N-metilpirrol (ANDRADE, 2009). Outro produto de seu metabolismo é a niacina (vitamina B3) que faz com que o café seja um dos poucos alimentos que após aquecimento é capaz de formar um composto importante para o metabolismo humano. A literatura reporta os maiores teores de trigonelina recorrentes no café arábica, quando comparado ao conilon (AGUIAR, 2005; VIGNOLI et al., 2013).

2.4 RADICAIS LIVRES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Nos últimos anos houve um aumento no interesse por alimentos com atividades biológicas, principalmente com propriedades antioxidantes (NEWMAN; CRAGG, 2012). Estudos recentes têm visado avaliar os benefícios da bebida de café envolvendo este tipo análise. Sua atividade antioxidante, assim como de qualquer outro alimento, depende da presença e concentração de compostos bioativos de interesse, levando-se em consideração a cultivar, os fatores ambientais e processamento pós-colheita. A torrefação do café também se torna um fator relevante por ser capaz de degradar ou formar novos compostos, inclusive com atividade antioxidante (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

Alimentos com atividades antioxidantes são importantes por controlar a presença exacerbada de radicais livres (RL's) (CALABRESE, 2005). Esses radicais são caracterizados por serem átomos, moléculas ou íons que possuem elétrons não pareados em sua órbita mais externa, e a necessidade de doar ou retirar elétrons de outra molécula faz com que os RL's sejam substâncias instáveis e altamente reativas (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; COTINGUIBA, 2015; PERUZZI, 2015). Entretanto, a designação radical livre, não pode ser utilizada para todos os agentes reativos, pois apesar de participarem de processos de oxirredução, nem todos possuem elétrons desemparelhados em sua última camada (DE VASCONCELOS et al., 2014).

Desta forma, espécies reativas de oxigênio (ERO's) e espécies reativas de nitrogênio (ERN's) são nomenclaturas mais apropriadas para descrever estes agentes (CAVALCANTE; DEBRUIN, 2009), sendo as ERO's, os tipos mais importantes de RL's gerados em sistemas vivos, principalmente por estarem relacionados ao desenvolvimento de doenças. A Tabela 1 mostra as principais ERO's formadas.

Tabela 1 – Principais espécies reativas de oxigênio formadas no organismo.

Oxidante	Fórmula	Reação da equação
Ânion superóxido	$O_2^{\cdot -}$	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\cdot -} + H^+$ $2O_2^{\cdot -} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	$Hipoxantina + H_2O + O_2 \leftrightarrow xantina + H_2O_2$ $Xantina + H_2O + O_2 \leftrightarrow \text{ácido urico} + H_2O_2$
Radical hidroxila	OH^{\cdot}	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{\cdot}$
Radical peroxila	ROO^{\cdot}	$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$
Radical hidroperoxil	HOO^{\cdot}	$O_2^{\cdot -} + H_2O \leftrightarrow HOO^{\cdot} + OH^{\cdot}$
Ácido hipocloroso	$HOCl$	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$

Fonte: Adaptado de Birben et al. (2012).

Em organismos aeróbicos, os RL's se encontram envolvidos em processos de oxidação, isto porque participam em atividades essenciais como sinalização celular, produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, e síntese de substâncias importantes como hormônios e enzimas, e complementar a isto, também podem ser produzidos por disfunções biológicas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; CORNELLI, 2009). Mesmo se tratando de um processo

essencial e natural, o aumento da produção de RL's pode levar a um desequilíbrio entre os sistemas pro-oxidante e antioxidante, ou seja, os antioxidantes presentes não são mais capazes de neutralizar a ação dos RL's em excesso formados, e estes passam a causar danos irreparáveis como a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, carboidratos e danos ao material genético, processo este, denominado estresse oxidativo (HIRATA; SATO; SANTOS, 2004; RAHMAN; BISWAS; KODE, 2006; ZENGIN et al., 2014).

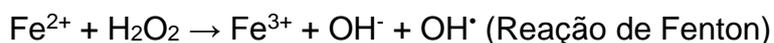
Assim, estes RL's, estão relacionados a diversas doenças como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, incluindo doenças degenerativas como aterosclerose e Alzheimer (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; WINTERBOURN, 2008; MARTINS, 2015). Um dos fatores que levam ao processo de estresse oxidativo é o envelhecimento, mas fatores ambientais também estão relacionados (ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2013).

As ERO's de maior importância fisiológica são: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (BIRBEN, 2012). O ânion superóxido tem uma ação irrelevante como agente oxidante, pois diferente da maioria dos RL's, ele é inativo. Sua principal ação é a produção de peróxido de hidrogênio através de uma reação de dismutação (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006), assim, sua principal importância está no favorecimento da produção de espécies radicais (CONTINGUIBA, 2015).

O peróxido de hidrogênio, por sua vez, não é considerado um agente oxidante, entretanto, possui facilidade em se difundir por membranas e é capaz de induzir danos às moléculas de DNA, através de reações enzimáticas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; LIOCHEV, 2013). O radical hidroxila (OH^{\cdot}) é o mais reativo e, de natureza não seletiva, assim, pode-se considerá-lo o mais deletério dos RL's (ASGHAR; RAMAN. DAUD, 2015; BIRBEN et al., 2012). Sendo produzido nas proximidades do DNA, pode levar a inativação ou mutação do mesmo, além de ter capacidade para inativar inúmeras proteínas, inclusive as das membranas, estando também relacionado ao processo de peroxidação lipídica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A produção de ERO's também está muito ligada à presença de metais com capacidade redutora. É sabido que o estresse oxidativo é um fator culminante para desencadear a formação de ERO's, este dano, acumulado ao excesso de ânions superóxidos pode ocasionar, através da reação de Haber-Weiss, a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Estes por sua vez, podem participar da reação de Fenton, reagindo com H_2O_2 , dando origem ao radical OH^\bullet . E pela reação de Haber Weiss, com o ânion $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , também é possível originar o radical OH^\bullet (HARB, et al., 2016), conforme equações apresentadas na Figura 7.

Figura 7 - Reações de Fenton e Haber-Weiss, na geração de espécies reativas de oxigênio.



Fonte: Adaptado de Birben et al. (2012) e Jomova et al. (2010).

O cobre também é um metal capaz de catalisar a reação de Haber-Weiss, mas como o ferro é o metal pesado mais abundante presente em sistemas vivos, este se torna o mais utilizado para catalisar reações de oxidação em biomoléculas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

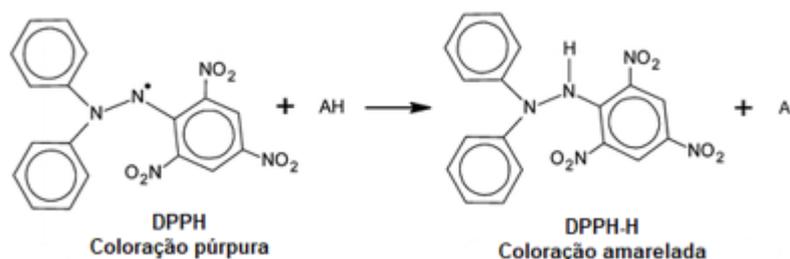
Para balancear as atividades destas moléculas, existem as substâncias antioxidantes, que segundo Bianchini e Antunes (1999), são caracterizados por serem agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos RL's nas células. Estes antioxidantes são divididos em duas classes, podendo ser enzimáticos, produzidos pelo próprio organismo e não enzimáticos, proveniente da dieta. Como antioxidantes enzimáticos têm-se o superóxido-dismutase (SOD), glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e catalase, e não enzimáticos destacam-se minerais (cobre, manganês, zinco e ferro), vitaminas (vitamina A, vitamina C e vitamina E), carotenóides (beta-caroteno e luteína), bioflavonoides (quercetina) e taninos (catequinas) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997, SHIMI; MOREIRA, 2004). Segundo Vasconcelos (2007), a localização de agentes antioxidantes também é diferenciada, pois antioxidantes enzimáticos estão predominantemente no meio intracelular e os não enzimáticos no meio extracelular.

Muitos estudos são voltados para a avaliação de produtos naturais com atividades antioxidantes, uma vez que estes estão relacionados à prevenção de inúmeras doenças. Na literatura é possível determinar a atividade antioxidante por inúmeros métodos, avaliando sua capacidade de doação de elétron ou átomos de hidrogênio a RL's para sua remoção ou inativação (DPPH, ABTS e FRAP) e a atividade quelante do Fe^{2+} , não permitindo que estes sejam capazes de agir como reagentes ou catalizadores em reações que levam a formação de ERO's.

Comumente estes métodos são simples, rápidos, baratos e eficazes, podendo ser feitos *in vitro*. Um dos testes mais conhecidos para avaliar atividade antioxidante é o do DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, que é um radical livre parcialmente estável, que pode ser obtido por dissolução do reagente em meio orgânico (RUFINO et al., 2007), muito utilizado em ensaios colorimétricos para avaliação de atividade antioxidante. Neste teste, têm-se uma reação de oxi-redução, na qual ocorre a doação de um átomo de hidrogênio, de modo a tornar este radical livre uma substância estável (DUARTE-ALMEIDA, et al., 2006).

Durante este processo o DPPH, que possui coloração púrpura, é reduzido a difenil-picril-hidrazina, e passa a apresentar uma tonalidade amarelada (Figura 8), esta mudança está ligada a um decréscimo na absorbância e caracteriza uma resposta positiva à atividade antioxidante da amostra (BORGES, et al., 2011).

Figura 8 - Redução do DPPH após a doação de um átomo de hidrogênio por substância antioxidante (AH).

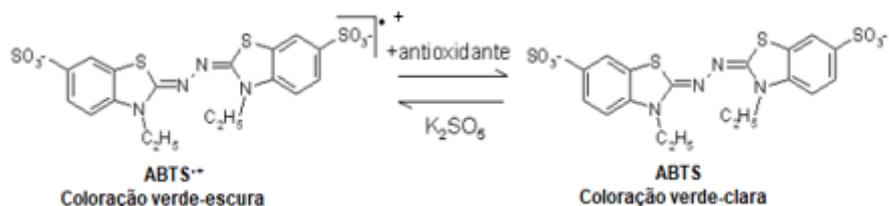


Fonte: Adaptado de Pyrzynska e Pekal (2013).

Um segundo teste também muito utilizado para avaliação de atividade antioxidante é o ABTS. O 2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico) (ABTS) é um radical livre que pode ser obtido a partir de uma reação química,

eletroquímica ou enzimática (KUSKOSKI, 2005). Este teste é baseado na geração do $ABTS^{•+}$, de cor verde-escura, através da reação do ABTS com persulfato de potássio. Na presença de um antioxidante o $ABTS^{•+}$ é reduzido a ABTS, substância estável de coloração verde-clara, que caracteriza a ocorrência de atividade antioxidante por decréscimo de absorbância a 734nm (Figura 9).

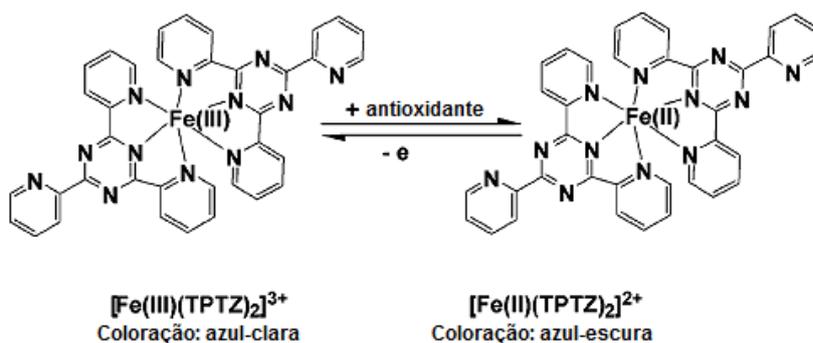
Figura 9 - Estabilização do $ABTS^{•+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: Adaptado de Rufino (et al., 2007).

O ensaio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), por sua vez, avalia a atividade antioxidante da amostra através da redução do complexo Fe^{3+} a Fe^{2+} , por meio de doação de elétron (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Esta reação ocorre na presença de TPTZ (2,4,6-Tri(2-piridil)1,3,5-triazina) em meio ácido (pH = 3,6) (VASCONCELOS et al., 2007). Assim o complexo Fe^{III} -TPTZ, de coloração azul-clara, é reduzido a Fe^{II} -TPTZ, de coloração azul-escura, na presença de um antioxidante, de modo que sua resposta está ligado ao aumento da absorbância à 595nm (Figura 10) (TIVERON, 2010; SUCUPIRA, 2012).

Figura 10 - Redução do Fe^{III} -TPTZ a Fe^{II} -TPTZ, por doação de elétron em meio ácido.



Fonte: Adaptado de Rufino (et. al., 2006).

Por último, o ensaio de Atividade Quelante do Fe^{2+} , considerado um dos maiores pró-oxidantes dentre as espécies de íons metálicos. Este teste é considerado uma avaliação secundária de atividade antioxidante, uma vez que não se liga ao radical livre, mas sim “quela” metais em transição que participam da catalisação nas reações de Fenton e Haber-Weiss, responsáveis pela formação destes RL's e consequentemente a promoção dos danos oxidativos (BARREIROS, DAVID; DAVID, 2006; ALVES; KUBOTA, 2013).

A ferrozina, reagente utilizado neste ensaio, forma uma coloração roxa na presença de íons metálicos, originando um complexo (Ferrozina-Fel). Os agentes quelantes presentes na amostra não permitem a formação deste complexo, resultando na diminuição da absorbância com uma coloração rósea a 562 nm (BARROS, 2012).

2.5 VIABILIDADE CELULAR

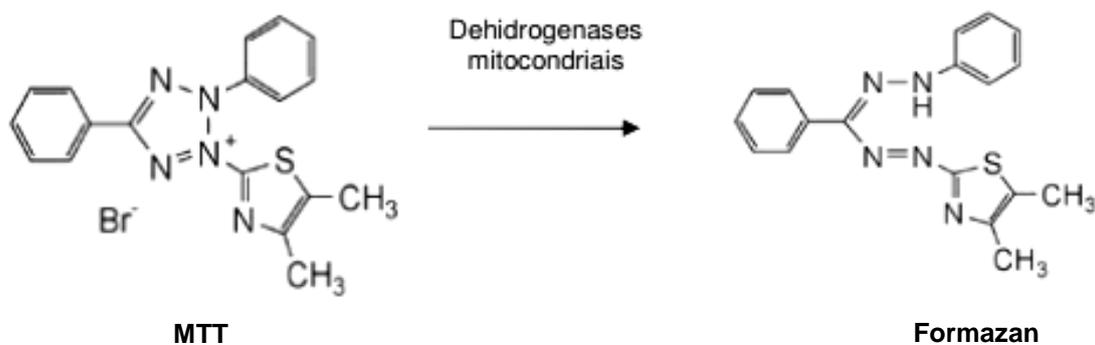
A viabilidade celular é um método muito utilizado para avaliar a citotoxicidade de amostras (BEDNARCZUK, 2010). Existem muitos tipos de células que podem ser utilizadas, dentre elas pode-se citar as linhagens saudáveis como os linfócitos humanos e linhagens tumorais, como o sarcoma 180 (*Mus musculus*). Segundo Rogero et al. (2003) estudos com culturas celulares podem ser utilizados devido a sua reprodutibilidade, rapidez e sensibilidade, além de ser financeiramente acessível.

Um dos testes mais difundidos na avaliação in vitro de citotoxicidade é o MTT (brometo de 3-(4,5- dimetil-2- tiazolil)-2,5- difenil-2H- tetrazólio), onde o princípio do teste descrito por Mosmann (1983) é inferir de forma indireta a viabilidade celular pela atividade mitocondrial de células vivas.

O método consiste na redução do MTT, principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase, dando origem ao composto formazan, de tonalidade azul escura (Figura 11). Este método avalia células sobreviventes, uma vez que

somente células viáveis são capazes de reduzir o MTT à formazan (MOURA, 2012).

Figura 11 - Redução do MTT à formazan.



Fonte: Adaptado de Moura (2008).

2.5.1 Linfócitos Humanos

Os linfócitos humanos são responsáveis pelas respostas imune adaptativas do nosso organismo, sua função é produzir anticorpos contra os antígenos que se instalam. A produção de Linfócitos T e B ocorre na medula óssea, mas o amadurecimento destas ocorre em locais diferentes. Os linfócitos T migram para o timo para o processo de seleção e maturação, já os linfócitos B permanecem na medula óssea para o processo de maturação. Após a maturação, os dois linfócitos entram na circulação sanguínea e se direcionam aos locais de ação (MESQUITA JUNIOR, 2010).

Muitos estudos de citotoxicidade *in vitro* têm sido realizados com estes tipos celulares, isto porque este tipo de avaliação fornece informações primárias sobre o potencial citotóxico da amostra. Como vantagens têm-se a fácil obtenção do material (punção venosa) e a facilidade de isolamento, o que possibilita um material praticamente livre de impurezas (CORREA, 2011).

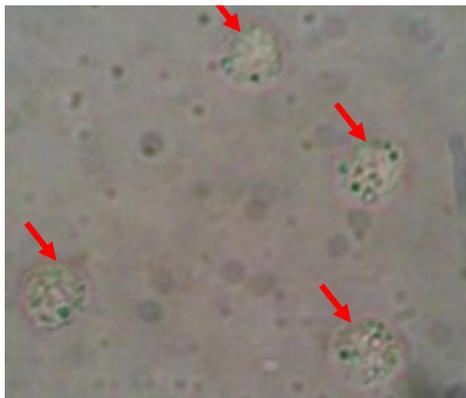
2.5.2 Sarcoma 180

O tratamento do câncer por terapias convencionais é o método mais conhecido e utilizado atualmente, entretanto, podem causar efeitos colaterais adversos, além da resistência aos fármacos por parte dos pacientes (BATISTA; MATTOS; SILVA, 2015; FERREIRA; NARDIM, 2017). Estes medicamentos podem prolongar a vida do indivíduo em muitos anos, mas não necessariamente estarão ligados a uma boa qualidade de vida pós-tratamento. Assim, torna-se importante o estudo dos produtos naturais de forma multidisciplinar, para produção de novas drogas que visem os benefícios do tratamento sem efeitos colaterais exacerbados (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009).

Uma das estratégias adotadas para o tratamento é a morte de células tumorais, denominado apoptose. A apoptose é um fenômeno bastante rápido onde se percebe dentre outros pontos: a condensação da cromatina, perda de aderência a matriz extra celular, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos (ANAZETTI; MELO, 2007; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Assim, na descoberta de novos agentes para o combate de células cancerosas, é comum a utilização modelos celulares através de testes *in vitro* e *in vivo*. Um dos modelos utilizados para este tipo de avaliação preliminar é o sarcoma 180, também conhecido como tumor de Crocker, que foi descoberto em ratos albinos machos em 1914 (FIGURA 12). Surgiu inicialmente na região axilar e por isso acreditava-se ser um tumor mamário, e por meio de transplantes sucessivos (subcutâneo, intramuscular ou intraperitoneal) permanece inalterado até os dias de hoje (FERREIRA, 2006).

Figura 12 - Linhagem celular tumoral de *Mus musculus*: Sarcoma 180.



Fonte: Adaptado de Pita (2010).

Esta linhagem celular pode ser adquirida pelo Banco de células do Rio de Janeiro sendo muito utilizada em testes *in vitro* ou *in vivo*, onde a manutenção desta variedade pode ser feita por cultura celular ou por inoculação em animais (MOURA, 2012). Os testes *in vitro* podem direcionar a utilização de produtos naturais para o tratamento de câncer e a facilidade do teste, torna possível avaliar inúmeras amostras em pouco tempo, apresentando resultados preliminares quando a citotoxicidade.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de diferentes condições de processamento na composição química, atividade antioxidante e ação antiproliferativa de extratos etanólicos de duas cultivares de *Coffea arabica* L..

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar por testes colorimétricos, os teores totais de taninos e flavonoides de amostras de café arábica submetido a diferentes condições de processamento;
- Quantificar, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a concentração de trigonelina e ácido clorogênico das amostras de café arábica submetido a diferentes condições de processamento;
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos de frutos de café arábica submetido a diferentes condições de processamento, por meio de quatro métodos colorimétricos: DPPH, ABTS, FRAP e Atividade quelante do Fe²⁺.
- Avaliar a capacidade antiproliferativa dos extratos etanólicos de frutos de café arábica submetido a diferentes condições de processamento, por meio do método do MTT, em linfócitos humanos e em células tumorais de Sarcoma 180;
- Correlacionar as respostas observadas em cada uma das análises e, inferir sobre a utilização do café, a fim de usufruir da melhor forma, de suas propriedades que beneficiam a saúde.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DOS FRUTOS E PRODUÇÃO DE EXTRATOS ETANÓLICOS

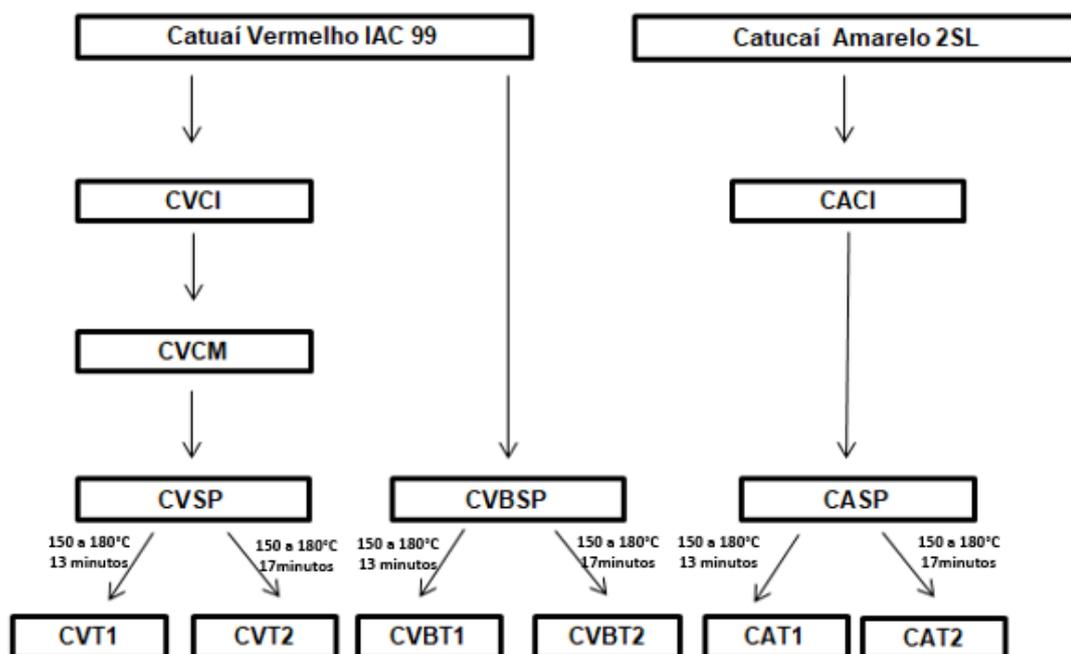
As amostras de frutos de café *gourmet* foram gentilmente cedidas pelo Sr. Elivelton de Oliveira, produtor de café do município de Santa Maria de Jetibá, no Espírito Santo (19°58'53.0"S 40°43'24.5"W). O proprietário é membro da Cooperativa Agropecuária Centro Serrana (COOPEAVI) e realizou a coleta e o processamento das duas cultivares de café arábica (*Coffea arabica* L.): Catuaí vermelho IAC 99 e Catucaí amarelo 2SL, que foram avaliados após serem submetidos às diferentes condições de processamento pós-colheita, totalizando 12 amostras que foram divididas em 3 grupamentos. Como se trata de um café *gourmet* é importante ressaltar que os processos de produção, processamento e armazenamento são extremamente controlados.

As amostras de café cereja foram retiradas ainda na planta. As amostras de café seco foram coletadas do local de armazenamento (tulha), passando posteriormente pelo descascador, dando origem as amostras secas e piladas (3 amostras). E por fim, as torras foram feitas a partir de amostras secas e piladas em torrador manual (6 amostras), submetidas a uma temperatura que variou de 150 a 180 °C, durante 13 e 17 minutos para as torras leves (torra 1) e médias (torras 2), respectivamente.

Todas as amostras foram armazenadas em sacos plásticos e devidamente identificadas. Como dito, as amostras foram organizadas em três grupamentos, sendo a cultivar Catuaí vermelho IAC 99 dividido em dois subgrupos: Catuaí vermelho IAC 99 *gourmet* e Catuaí vermelho IAC 99 Bóia, este por sua vez, é separado do café *gourmet* por possuir características que diminuem a qualidade da bebida, são cafés brocados e/ou atacados por fungos, por exemplo. Durante a separação destes dois grupamentos, que se dá por meio de um processo hidráulico, o café considerado bóia, irá boiar literalmente na água, sendo levado a um compartimento diferente do café *gourmet*, como este último é mais denso, tende a ficar no fundo da esteira, sendo carregado para outro compartimento. O terceiro grupamento foi constituído pelas amostras da cultivar Catucaí amarelo

2SL, conforme ilustrado na Figura 13. A Figura 14 mostra o aspecto das amostras secas e piladas dos três grupamentos de café, antes do processo de torra. Os cafés aqui avaliados são considerados de produção especial, com exceção do Catuaí vermelho IAC 99 Bóia, que é uma seleção pós-colheita do Catuaí Vermelho IAC 99, mas que também é utilizado para consumo.

Figura 13 - Amostras de duas cultivares de café arábica provenientes de uma propriedade particular em Santa Maria de Jetibá – Espírito Santo.



CVCI: Catuaí vermelho cereja imaturo; CVCM: Catuaí Vermelho cereja maturo; CVSP: Catuaí vermelho seco e pilado; CVT1: Catuaí vermelho torra 1; CVT2: Catuaí vermelho torra 2; CVBSP: Catuaí vermelho bóia seco e pilado; CVBT1: Catuaí vermelho bóia torra 1; CVBT2: Catuaí vermelho bóia torra 2; CACI: Catuaí amarelo cereja imaturo; CASP: Catuaí amarelo seco e pilado; CAT1: Catuaí amarelo torra 1; CAT2: Catuaí amarelo torra 2. Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 14 - Amostras de café na condição seca e pilada.



A

B

C

Catuaí vermelho IAC 99 (A); Catuaí vermelho IAC 99 bóia (B); Catuaí amarelo 2SL (C).

Fonte: Arquivo pessoal

Para a produção dos extratos etanólicos foi utilizado etanol absoluto (P.A), na proporção de 300 ml de etanol (P.A), para cada 100 g de café (3:1). Os frutos do café, nas diferentes condições de processamento pós colheita, foram triturados em liquidificador industrial e submetidos em processo de maceração em etanol, por 5 dias, sendo revolvido ao menos uma vez por dia, durante este processo. Posteriormente, os extratos foram filtrados e submetidos à rotaevaporação para obtenção dos extratos brutos, que foram utilizados para as análises posteriores.

4.2 TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

Para análise dos teores de flavonoides, seguiu-se o protocolo de Dewanto et al. (2002), com modificações. Para o nitrito de sódio (NaNO_2) a 5%, foram diluídos 5g em 100 mL de água deionizada; para o cloreto de alumínio (AlCl_3) a 10%, foram diluídos 5g em 50 mL de água deionizada e para solução de NaOH 1mol.L^{-1} (Sigma-Aldrich), foram diluídos 4g da substância em 100 mL de água deionizada.

As amostras de café foram previamente diluídas em água deionizada em concentração única de $500\ \mu\text{g.mL}^{-1}$. A rutina (Sigma-Aldrich) foi utilizada como padrão e diluída em metanol nas concentrações sucessivas de 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6 e 7,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Em um tubo Falcon de 15 mL foram adicionados 1,5 mL da amostra, acrescentando-se 6 mL de água deionizada e 450 μl de NaNO_2 e aguardou-se por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 450 μl de AlCl_3 , mantido em repouso por mais um minuto. Após isto, foram acrescentados 3 mL de NaOH e 3,6 mL de água deionizada.

O material foi submetido à agitação em vortex e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Biospectro) à 420 nm, com lâmpada de tungstênio, adicionando-se três mililitros da solução em uma cubeta de vidro, sendo todo o processo realizado em triplicata. Os “brancos” das amostras também foram preparados, e o metanol foi utilizado para a calibração do aparelho. O cálculo para análise do teor de flavonoides foi feito por equivalência ao padrão rutina, a partir da curva de calibração do mesmo, por grama de massa seca da amostra em mg.g^{-1} com o auxílio do programa Microsoft Office Excel 2010.

4.3 TEOR DE TANINOS TOTAIS

Para análise dos teores de taninos totais, seguiu-se o protocolo de Pansera et al. (2003), com modificações. Para carbonato de sódio (Na_2CO_3) 8%, diluíram-se 8g em 100 mL de água destilada. As amostras de café foram previamente diluídas em álcool etílico a fim de obter uma concentração final de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O Ácido tânico foi utilizado como padrão, nas concentrações sucessivas de 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e $7,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Cada microtubo, com 500 μl de amostra, recebeu 500 μl do reagente Folin-Denis e, em seguida, a mistura foi agitada e mantida em descanso por 3 minutos. Posteriormente foram acrescentados 500 μl de carbonato de sódio a 8%, agitou-se e, após descansar por 2 horas, as amostras e o padrão foram centrifugados a 2.000 rpm por 5 minutos. 200 μl do sobrenadante foram retirados, sendo esta alíquota colocada em microplaca para cultivo de células, em triplicata, com posterior leitura em espectrofotômetro para microplaca ELISA (EPOCH) a 725 nm.

Os “brancos” das amostras, para eliminar a interferência da cor dos extratos, também foram preparados, e o álcool etílico foi utilizado para a calibração do aparelho. O cálculo para análise do teor de taninos foi feito por equivalência ao padrão ácido tânico a partir da curva de calibração do mesmo, por grama de massa seca da amostra em mg.g^{-1} com o auxílio do programa Microsoft Office Excel 2010.

4.4 ANÁLISE CLAE: ÁCIDO CLOROGÊNICO E TRIGONELINA

A quantificação de trigonelina e ácido clorogênico foi realizada, gentilmente, pela Prof^a Dr^a Dâmaris Silveira, com auxílio da bióloga Patrícia Marques Rodrigues, do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade de Brasília – UnB. As doze amostras de café, de duas cultivares de café arábica em diferentes níveis de processamento, foram diluídas em acetonitrila para alcançar a concentração final de $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com exceção da amostra CVSP (grupo 1) que foi diluída na concentração de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As análises foram realizadas em CLAE-DAD em

equipamento (Hitach) com coluna (LichroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18 e – 5 μ m) mantidas a 25°C com fluxo de 0,6 mL por minuto e tempo de análise de 55 minutos.

Os comprimentos de onda foram 280nm e 272nm para ácido clorogênico e trigonelina respectivamente. Os eluentes utilizados para análise estão apresentados na Tabela 2, sendo estes: solução a 1% de ácido fosfórico na bomba A e acetonitrila na bomba B em sistema de eluição por gradiente. Para tal foi seguido o protocolo de Fonseca (et al., 2014), com modificações.

Tabela 2 – Gradiente de eluição para análises por CLAE na detecção de trigonelina e ácido clorogênico.

Tempo em minutos	Solução de ácido	
	fosfórico a 1%	Acetonitrila
0	90	10
40	70	30
50	50	50
51	90	10
55	90	10

Fonte: Dados da pesquisa.

Os compostos presentes no extrato foram identificados através de comparações com seus espectros UV-Vis e do tempo de retenção com os padrões comerciais: cloridrato de trigonelina (Sigma-Aldrich) e ácido clorogênico (Sigma-Aldrich). Para o cálculo da concentração em μ g.mL⁻¹ foi utilizada a curva de calibração de cada padrão, através da regressão linear dos valores, operados no programa Microsoft Office Excel 2010.

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os ensaios antioxidantes foram avaliados por quatro diferentes métodos colorimétricos bastante conhecidos na literatura (DPPH, ABTS, FRAP e Atividade quelante do Fe²⁺), sendo realizados de modo inteiramente casualizado no próprio laboratório.

4.5.1 Ensaio DPPH

Para a realização do Ensaio DPPH, seguiu-se o protocolo de Rufino et al. (2007a), com modificações. Dissolveram-se 120 mg do reagente DPPH 0,3mM (Sigma-Aldrich) em 100 mL de álcool metílico. Em uma placa para leitora Elisa, foram adicionados 100 µl das amostras de café, previamente dissolvidas em metanol e nas concentrações sucessivas de 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 µg.mL⁻¹, em triplicata. Adicionaram-se 200 µl do reagente DPPH 0,3mM e após 30 minutos, com o material coberto e em ausência de luz, foi feita a leitura em espectrofotômetro para microplaca Elisa (EPOCH), para a avaliação da absorbância a 517nm. O ácido ascórbico diluído em diferentes concentrações (1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 mL⁻¹) foi utilizado como padrão para comparação da atividade. O controle da reação e os “brancos” das amostras, para eliminar a interferência da cor dos extratos, também foram preparados e o álcool metílico foi utilizado para a calibração do aparelho. Os cálculos para avaliação da atividade antioxidante (AA%) foi baseada na seguinte equação (1):

$$\%AA = \{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100\} / Abs_{controle}$$

Onde: Abs_{controle} = absorbância da solução metanólica do DPPH; Abs_{amostra} = absorbância da amostra; Abs_{branco} = absorbância do branco da amostra. Os valores foram expressos em EC₅₀ (µg.ml⁻¹), através da regressão linear dos valores operados no programa Microsoft Office Excel 2010.

4.5.2 Ensaio ABTS

Para a realização deste teste, seguiu-se o protocolo de Rufino et al. (2007b), como modificações. Para tanto, dissolveram-se 96 mg de ABTS 7mM (Sigma-Aldrich) em 25ml de água destilada e 189,2 mg de persulfato de potássio 140mM (Sigma-Aldrich) em 5ml de água destilada. O preparo do radical ABTS^{•+} originou-

se da mistura de 5ml da solução de ABTS 7mM e 88 μl da solução de persulfato de potássio 140mM. Após 16 horas, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz, foi adicionado álcool etílico à solução, a fim de obter uma absorbância de 0,70nm \pm 0,05nm a 734nm.

Em uma placa para leitora Elisa, foram adicionados 40 μl das amostras de café, previamente dissolvidos em álcool etílico nas concentrações sucessivas de 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em triplicata. Adicionaram-se 200 μl do reagente ABTS+ e após 6 minutos, foi feita a leitura em espectrofotômetro para microplaca Elisa (EPOCH) para avaliar a absorbância a 734 nm. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Sigma-Aldrich), diluído na concentração de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em álcool etílico, foi utilizado como padrão para comparação da atividade. O controle da reação e os “brancos” das amostras, para eliminar a interferência da cor dos extratos, também foram preparados e o álcool etílico foi utilizado para a calibração do aparelho. Os cálculos para avaliação da atividade antioxidante (AA%) foi baseada na equação 1. Os valores foram expressos em EC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), através da regressão linear dos valores operados no programa Microsoft Office Excel 2010.

4.5.3 Ensaio FRAP

Para o teste, seguiu-se o protocolo de Rufino (et al., 2006) com modificações. O reagente FRAP foi obtido a partir da combinação de 25 ml de tampão acetato 0,3mM, 2,5 ml de solução de TPTZ 10mM (Sigma-Aldrich) e 2,5 ml de solução aquosa de cloreto férrico 20mM (Sigma-Aldrich). Em microtubos de 2 mL foram adicionados 30 μl das amostras de café, previamente diluídas em álcool metílico nas concentrações sucessivas de 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em triplicata. Junto aos microtubos foram adicionados 90 μl de água destilada e 900 μl do reagente FRAP.

Esta solução ficou incubada por 30 minutos à 37°C, e após isto foi adicionado 250 μl desta solução em microplaca para leitora Elisa. A leitura foi realizada em

espectrofotômetro para microplaca Elisa (EPOCH) a 595 nm onde o aumento da absorbância indica poder redutor presente na amostra (OU et al., 2002). FeSO_4 , diluído na concentração de 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em álcool metílico, foi utilizado como padrão para comparação da atividade.

O controle da reação e os “brancos” das amostras, para eliminar a interferência da cor dos extratos, também foram preparados e o álcool etílico foi utilizado para a calibração do aparelho. Os cálculos para avaliação da atividade antioxidante (AA%) foi baseada na seguinte equação (2).

$$\%AA = \{[(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) - \text{Abs}_{\text{controle}}] \times 100\} / \text{Abs}_{\text{controle}}$$

Onde: $\text{Abs}_{\text{controle}}$ = absorbância da solução metanólica do DPPH; $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ = absorbância da amostra; $\text{Abs}_{\text{branco}}$ = absorbância do branco da amostra. Os valores foram expressos em EC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), através da regressão linear dos valores operados no programa Microsoft Office Excel 2010.

4.5.4 Atividade quelante do Fe^{2+}

Para o teste, seguiu-se o protocolo de Tang (et al., 2002), com modificações. Dissolveram-se 2,5 mg de FeSO_4 2mM e 24,6 mg de Ferrozina 5mM (Sigma-Aldrich), ambos em 10 ml de água destilada, separadamente. Em microtubos de 2 ml foram adicionados 250 μl das amostras de café, previamente diluídas em álcool etílico nas concentrações sucessivas de 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Aos microtubos foram adicionados 900 μl de água deionizada, 25 μl de FeSO_4 2mM e 50 μl de Ferrozina 5mM. A solução foi submetida à agitação em vortex e, após 10 minutos foram adicionados 250 μl desta solução em microplaca para cultivo de células, sendo feita leitura em espectrofotômetro para microplaca ELISA (EPOCH) a 595 nm, em triplicata. EDTA (Sigma-Aldrich), diluído em água

destilada, foi utilizado como padrão para comparação da atividade, também em diluições sucessivas de 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em álcool etílico.

O controle da reação e os “brancos” das amostras, para eliminar a interferência da cor dos extratos, também foram preparados e o álcool etílico, foi utilizado para a calibração do aparelho. Os cálculos para avaliação da atividade quelante (AQ%) foi baseada na equação 1. Os valores foram expressos em EC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$), através da regressão linear dos valores, operados no programa Microsoft Office Excel 2010.

4.6 VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA (MTT)

4.6.1 Viabilidade celular – Linfócitos humanos

Antes do início do ensaio de viabilidade celular das amostras, se fez necessário o isolamento dos linfócitos humanos de sangue periférico. A coleta foi realizada com consentimento prévio e preenchimento de formulário próprio (APÊNDICE A). O voluntário possuía 28 anos, sendo saudável, sem exposição à radiação recente, não usuário de entorpecentes, e sem ingestão de álcool nos últimos 30 dias. O isolamento de linfócitos se deu pelo método tradicional no gradiente Ficoll® Paque Plus (GE-Healthcare), segundo o próprio fabricante, com modificações e, com autorização do Comitê de Ética Humano da Universidade Federal do Espírito Santo pelo Processo de Nº CAAE 71093016.6.0000.5542 (ANEXO A).

Após a coleta de 10 ml de sangue periférico humano com o auxílio de uma seringa estéril, o sangue foi colocado em um tubo de ensaio com heparina (anticoagulante e diluído em solução salina (NaCl 0,9%) estéril na proporção de volume 1:1. Em novos tubos de ensaio foram adicionados 3 ml de Ficoll® Paque Plus e 4 ml do sangue diluído, tomando cuidado para não misturar. Os tubos foram centrifugados (Hemrlé Z-326) a 200 rcf por 30 minutos e o halo de linfócitos foi retirado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril. Em um novo tubo de ensaio foram adicionados os linfócitos isolados com solução salina

na proporção de volume 1:1 e homogeneizado gentilmente. O tubo foi então centrifugado a 500 rcf por 30 minutos e o sobrenadante foi retirado com cuidado.

Foi avaliada a concentração das células viáveis pelo método de exclusão com Azul de Tripán, onde diluíram-se 30 µl das células em 20 µl de Azul de Tripán. A contagem das células foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer. Após isto, diluíram-se as células com meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado a 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab) a fim de alcançar a concentração final de 2×10^5 .

Para avaliação da atividade antiproliferativa das amostras, foram adicionadas a microplaca para cultivo de células, 100 µl das células viáveis de linfócitos humanos diluídas, sendo em seguida incubadas em estufa de CO₂ para cultivo de células por 24 horas a 37°C e a 5% de CO₂. Após este período, as células foram tratadas com as amostras de café diluídas em água deionizada estéril nas concentrações de 1.000; 500; 100; 50 e 25 µg.ml⁻¹, com 2% de DMSO (Dimetilsulfóxido), sendo incubadas por mais 48h horas nas mesmas condições.

Ao término da incubação as placas foram centrifugadas a 860 rcf por 10 minutos, sendo posteriormente invertidas para retirada do sobrenadante. Foi adicionado 40 µl de MTT a 0,25 mg.ml⁻¹ (Sigma-Aldrich), diluído em PBS, em cada poço. As placas foram novamente incubadas a 37°C e a 5% de CO₂ por 4 horas. No término desta incubação as placas foram centrifugadas a 860 rcf por 5 minutos tendo o sobrenadante descartado. Foram adicionados 100 µl de DMSO, sendo gentilmente agitado para solubilização dos cristais de formazan formados, para posterior leitura em espectrofotômetro para microplaca ELISA (EPOCH) a 630 nm, em triplicata. O controle também foi preparado, de modo a auxiliar na avaliação da atividade das amostras. Os cálculos para avaliação da viabilidade celular (VC%) foi calculada pela seguinte equação (3):

$$VC\% = (Abs_{amostra} / Abs_{controle}) \times 100$$

Onde: Abs_{controle} = absorbância das células não tratadas; Abs_{amostra} = absorbância

da amostra. Os dados foram expressos em gráficos através da regressão linear dos valores, operados no programa Microsoft Office Excel 2010.

4.6.2 Viabilidade celular – Sarcoma 180

A Linhagem Sarcoma 180 (S-180), foi adquirida junto ao banco de células do Rio de Janeiro. As células foram incubadas em camundongos da espécie *Mus musculus* com autorização do Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA/UFES) pelo processo de número 89/2015 (ANEXO B). Com a retirada das células, a viabilidade celular foi estimada com o auxílio do Azul de Tripán, onde diluíram-se 30 µl de células em 20 µl de Azul de Tripán. A contagem das células foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer. Após isto, dilui-se a células com meio RPMI-1640 (Cultilab) suplementado a 10% de Soro Fetal Bovino a fim de alcançar a concentração final de 1×10^6 .

Para avaliação da atividade antiproliferativa das amostras, foram adicionadas a microplaca para cultivo de células 100 µl das células viáveis de S-180 diluídas, sendo em seguida incubadas em estufa de CO₂ para cultivo de células por 24 horas a 37°C e a 5% de CO₂. Após este período as células foram tratadas com as amostras de café diluídas em água deionizada estéril nas concentrações de 1.000; 500; 100; 50 e 25 µg.ml⁻¹, em triplicata, sendo incubadas por mais 48h horas nas mesmas condições. Ao término da incubação as placas foram centrifugadas a 860 rcf por 10 minutos, sendo as placas invertidas para retirada do sobrenadante. Foi adicionado em cada poço 40 µl de MTT a 0,25 mg.ml⁻¹ (Sigma-Aldrich), diluído em PBS estéril, sendo as placas novamente incubadas a 37°C e a 5% de CO₂ por 4 horas.

Ao término da incubação, as placas foram novamente centrifugadas a 860 rcf por 5 minutos tendo o sobrenadante descartado. Foram adicionados 100 µl de DMSO, sendo gentilmente agitado para solubilização dos cristais de formazan formados, para posterior leitura em espectrofotômetro para microplaca ELISA (EPOCH) a 630 nm. O controle negativo também foi preparado, de modo a auxiliar na avaliação da atividade das amostras. Os cálculos para avaliação da viabilidade

celular (VC%) foi baseado na equação 3. Os dados foram expressos em gráficos através da regressão linear dos valores, operados no programa Microsoft Office Excel 2010.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram feitas pelo programa ASSISTAT 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2016) através da análise de variância (ANOVA), seguida da comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$) para avaliar se havia diferença entre os tratamentos. A correlação de Pearson foi realizada com o auxílio do programa XLSTAT (Software adicional do Programa Microsoft Office Excel).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISE COLORIMÉTRICA: Flavonoides e Taninos

A avaliação dos teores de taninos e flavonoides, foram obtidos por equivalência às curvas de calibração (APÊNDICE B) da rotina, para flavonoides e, do ácido tânico, para taninos, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3 – Concentração de taninos e flavonoides (mg.g^{-1}) de duas cultivares do café arábica, Catuaí Vermelho IAC 99 e Catucaí amarelo 2SL, em diferentes níveis de processamento pós-colheita.

AMOSTRA	Taninos (mg.g^{-1}) \pm EP	Flavonoides (mg.g^{-1}) \pm EP
CVCI	152,20 ^{de} \pm 2,23	244,85 ^a \pm 0,37
CVCM	193,09 ^c \pm 3,59	178,18 ^b \pm 1,40
CVSP	159,42 ^d \pm 2,54	135,59 ^d \pm 2,94
CVT1	144,20 ^{def} \pm 5,58	50,22 ^g \pm 0,96
CVT2	51,87 ^g \pm 1,22	61,14 ^{fg} \pm 0,56
CVBSP	159,31 ^d \pm 4,35	69,11 ^f \pm 0,55
CVBT1	121,09 ^f \pm 0,74	65,22 ^{fg} \pm 3,86
CVBT2	50,53 ^g \pm 0,89	89,29 ^e \pm 3,88
CACI	125,64 ^{ef} \pm 4,72	160,77 ^c \pm 2,73
CASP	384,42 ^a \pm 3,08	233,74 ^a \pm 0,21
CAT1	226,31 ^b \pm 1,74	102,62 ^e \pm 1,82
CAT2	57,37 ^g \pm 2,50	54,48 ^{fg} \pm 1,30

Os valores estão expressos em média \pm EP (n=3); EP: Erro Padrão; ^{a-g} Infere diferença estatística significativa entre os tratamentos, ANOVA, Teste Tukey (p < 0,05).

O interesse quanto aos compostos bioativos, de modo geral, está relacionado aos seus mecanismos de ação, os quais os capacitam a atuar como antioxidantes e na modulação da expressão de genes responsáveis pela produção de enzimas envolvidas nos mecanismos de proteção celular (BASTOS, 2009).

A Tabela 3 mostra as variações observadas nos teores totais de taninos nos diferentes grupamentos e condições de processamento. O grupamento 3 apresentou o maior teor de taninos, na amostra Catucaí amarelo seco e pilado

(CASP = 384,42 mg.g⁻¹), seguida de sua condição de torra leve CAT1 (226,31 mg.g⁻¹). De modo geral, para todas as condições secas e piladas (CVSP, CVBSP e CASP) obtiveram teores maiores em relação às suas condições de torra correspondentes, as quais apresentaram perda gradativa na medida em que houve o prolongamento do tempo de torrefação. Apenas a amostra Catuaí vermelho torra 1 (CVT1), de torra leve, se manteve estável em relação à sua condição seca e pilada, mas apresentando queda dos teores, quando em torra média (CVT2).

CUONG e colaboradores (2014) encontraram resultados semelhantes aos aqui apresentados quando avaliaram os teores de taninos, em café robusta. Os cafés verdes (equivalentes aos secos e pilados do presente estudo) apresentaram maiores teores dessa classe de compostos, onde foi observada uma queda gradativa à medida que o processo de torra ocorria.

Kim, Silva e Jung (2011) avaliaram o processo de hidrólise térmica do ácido tânico durante o aquecimento em reator fechado, condicionado às temperaturas de 65, 100, 150 e 200°C. Os autores quantificaram ácido gálico e pirogálico, produtos da hidrólise do ácido tânico, e observam o aumento destes compostos a 150°C, confirmando que o processo de hidrólise com o aumento da temperatura. Ainda neste estudo, os autores constaram que a hidrólise térmica promoveu o aumento da atividade antioxidante do ácido tânico processado.

Da condição imatura para matura do grupamento 1 (CVCI e CVCM respectivamente), é possível observar um ligeiro aumento nos teores totais de taninos, na condição matura. No grupamento 3 não foi possível fazer esta comparação, uma vez que se tem apenas a condição imatura do Catuaí amarelo 2SL (CACI). Apesar dos resultados aqui observados, Rosseti (2007) apresentou, em seus estudos, resultados diferentes quando avaliou os teores de compostos fenólicos totais, na casca e sementes de café, durante as etapas do amadurecimento dos frutos. Este autor observou um declínio nos teores de compostos fenólicos da casca, quando ocorreu o amadurecimento do café cereja e inferiu que isto ocorreria devido à oxidação destes compostos, que são responsáveis pela coloração característica após o amadurecimento.

Os flavonoides encontrados no café expressaram maiores teores nas amostras Catuaí vermelho cereja imaturo (CVCI) e Catucaí amarelo seco e pilado (CASP), com concentrações de $244,85 \text{ mg.g}^{-1}$ e $233,74 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente. A partir dos cafés secos e pilados, o processo de torrefação não necessariamente levou a uma queda drástica dos teores de flavonoides. Em algumas amostras, como a torra leve e média do grupamento 3 (CAT1 e CAT2), é possível observar essa perda gradativa. Enquanto, no grupamento 1, para as mesmas condições (CVT1 e CVT2), o teste revelou um aumento significativo deste conteúdo. E no grupamento 2, também nas mesmas condições (CVBT1 e CVBT2) não foram observadas alterações significativas. Tais observações indicam uma variação entre os cafés especiais e bóia, aqui avaliados.

Nos cafés cereja avaliados houve uma variação significativa dos teores de flavonoides, mostrando o decaimento dos seus valores da condição imatura para a madura (CVCI e CVCM, respectivamente). Na avaliação de cafés Catuaí vermelho, na condição verde, verde cana, cereja e passa, Costa (2015) avaliou o teor de flavonoides e observou que cafés cerejas e verdes eram semelhantes quanto aos teores de flavonoides ($3,31 \pm 0,03 \text{ g.100g}^{-1} \text{ b.s}$ e $3,28 \pm 0,05 \text{ g.100g}^{-1} \text{ b.s}$, respectivamente), já os cafés cerejas e verde-cana apresentaram diferenças significativas ($3,31 \pm 0,03 \text{ g.100g}^{-1} \text{ b.s}$ e $3,01 \pm 0,13 \text{ g.100g}^{-1} \text{ b.s}$, respectivamente), mesmo com baixa flutuação. Apesar de observar diferença significativa entre as condições cereja e verde cana, o autor mostra uma maior concentração de flavonoides, em cafés cerejas maduros e verdes. Já no presente estudo, os cafés cerejas imaturos, que englobam as condições verde e verde-cana, são os que apresentam os maiores teores, concentrações que decrescem quando o café está na condição cereja maduro.

No trabalho de Moreira (2013), ao avaliar extratos etanólicos de café arábica verde e torrado (torra média), observou o aumento dos flavonoides da condição verde para torrada, assim como em um dos grupamentos citados no presente estudo. Entretanto, ao avaliar outros compostos, como ácido clorogênico, trigonelina e cafeína, observou-se que no teste antioxidante o café verde possuía um resultado mais satisfatório, sendo melhor, inclusive, em relação aos padrões de comparação. Estes resultados levaram o autor a sugerir que o café verde

possuí melhores benefícios, quando comparado ao café torrado. Segundo Wang e Ho (2009), os flavonoides presentes no café são principalmente os da classe de flavonóis e estão em maior concentração em cafés verdes, quando comparados as suas condições de torra.

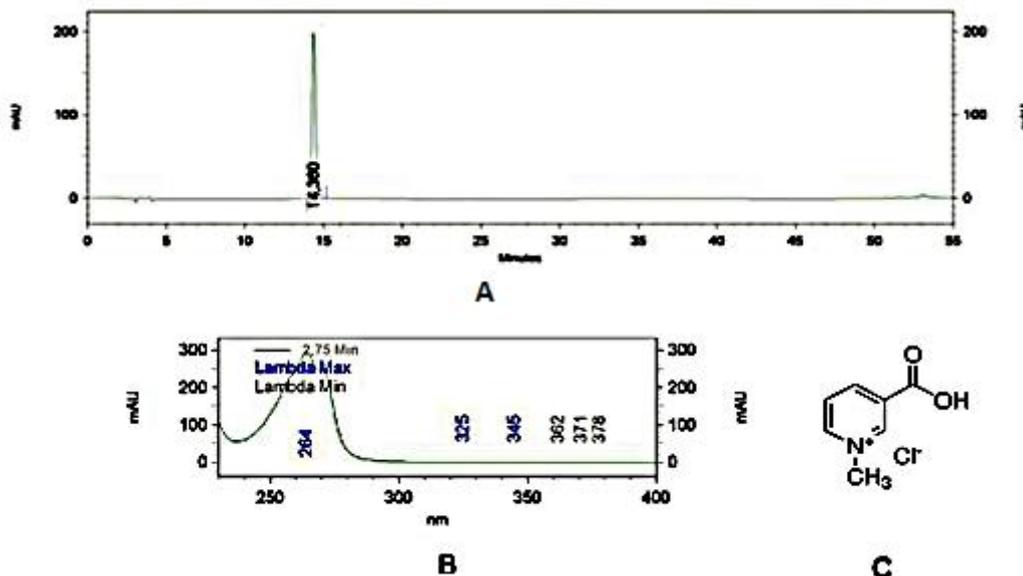
No trabalho de Hecimovic e colaboradores (2011), que avaliou cafés arábica e conilon na condição verde e em três níveis de torra, foi observado um ligeiro aumento dos teores de flavonoides, nas torras leves e médias e uma diminuição na torra forte, para a maioria dos cultivares avaliados. Neste mesmo estudo, os pesquisadores avaliaram o conteúdo de uma classe individual de flavonoides (flavan-3 ol) e observaram uma baixa concentração desta substância em cafés verdes, mas um aumento deste composto em cafés de torra clara e média. Esses autores sugerem que este aumento pode estar relacionado às reações de Maillard. Assim, o aumento observado no grupamento 2, após o café ser condicionado à torra, pode ser explicado pelo mesmo mecanismo.

6.2 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E TRIGONELINA ATRAVÉS DE CLAE

O ácido clorogênico e a trigonelina, presentes no café, trazem benefícios aos seus consumidores e, comumente, estão presentes em maior concentração nos cafés secos e pilados, ou seja, aqueles que não passaram pelo processo de torra (FARAH, 2008; MOREIRA et al., 2014).

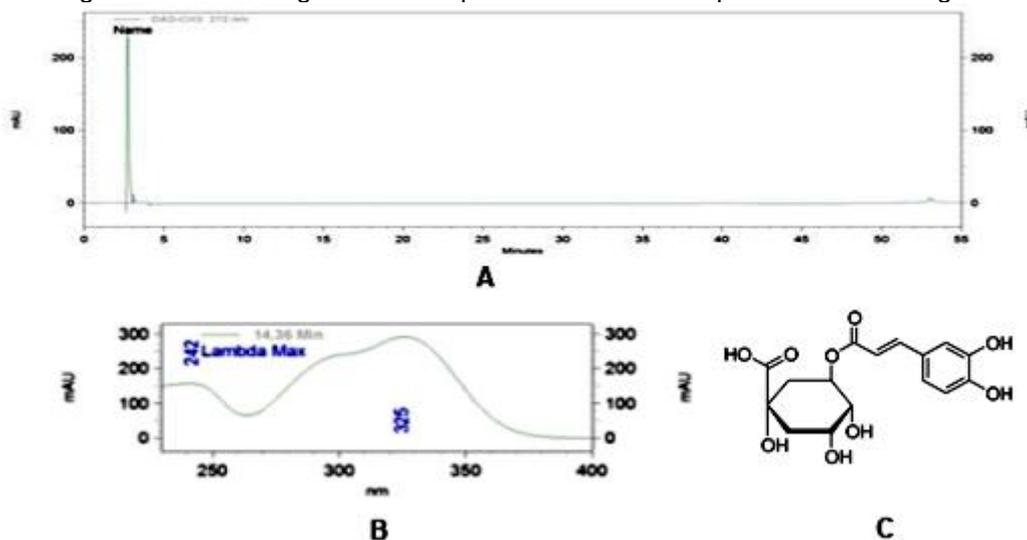
Para o processo de quantificação por meio do uso da CLAE, a definição do comprimento de onda das amostras foi baseada nos máximos de absorção dos padrões. Assim para o ácido clorogênico, a detecção foi a 280 nm e para a trigonelina foi a 272 nm. As Figuras 15 e 16 mostram o cromatograma, espectro de absorção e a estrutura química de cada um dos padrões utilizados.

Figura 15 - Cromatograma obtido por CLAE através do padrão cloridrato de trigonelina.



Padrão cloridrato de trigonelina na concentração de $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (A); Espectro de absorção obtido por CLAE através do padrão cloridrato de trigonelina (B); Estrutura química cloridrato de trigonelina (C). Fonte: Arquivo pessoal.

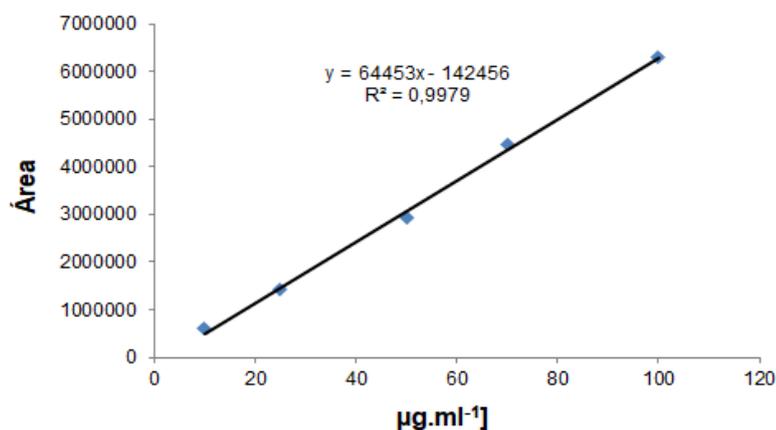
Figura 16 - Cromatograma obtido por CLAE através do padrão ácido clorogênico



Padrão do ácido clorogênico na concentração de $100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (A); Espectro de absorção obtido por CLAE através do padrão ácido clorogênico (B); Estrutura química ácido clorogênico (C). Fonte: Arquivo pessoal.

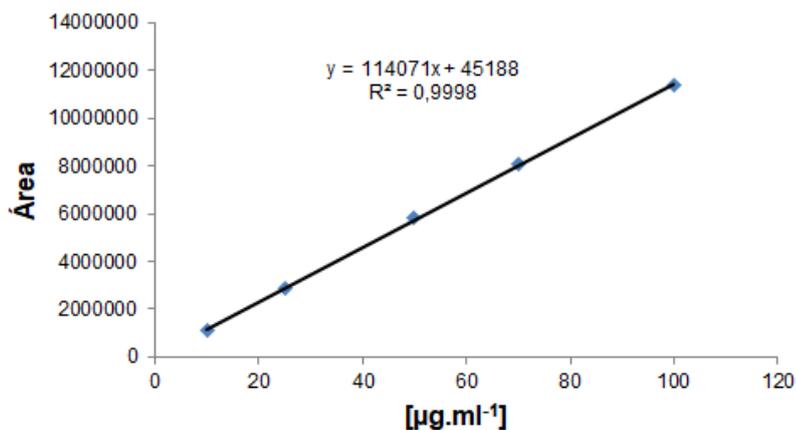
Após as leituras dos padrões em diferentes concentrações (10 ; 25 ; 50 ; 75 e $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), foi possível construir uma curva de calibração para cada um dos padrões usados, por meio de regressão linear (Figuras 17 e 18). Utilizando as equações originadas em cada reta, calculou-se a concentração de cada composto nas amostras de café em $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Tabela 4).

Figura 17 - Curva de calibração do padrão trigonelina a 272 nm em análise por CLAE.



Fonte: Arquivo pessoal.

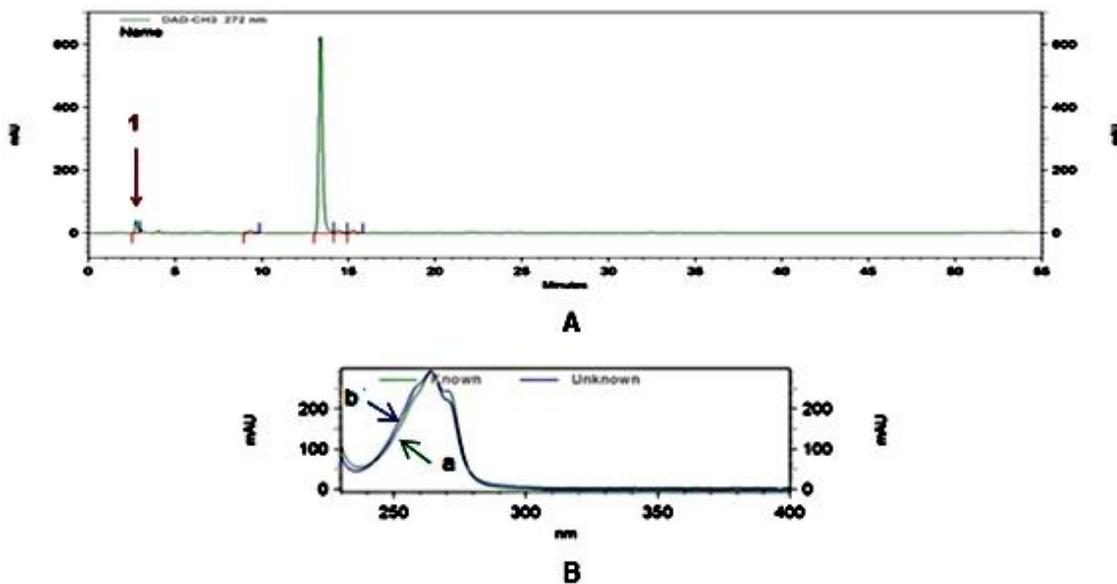
Figura 18 - Curva de calibração do padrão ácido clorogênico a 280 nm em análise por CLAE.



Fonte: Arquivo pessoal.

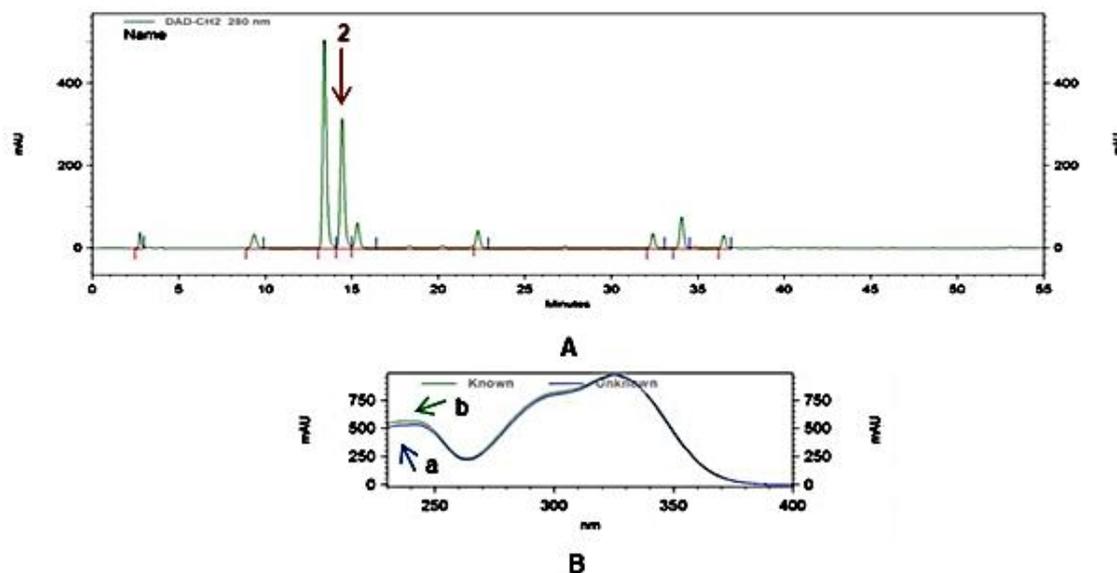
O cromatograma e o espectro de sobreposição das amostras com o padrão, também estão reproduzidos para a trigonelina (Figura 19) e o ácido clorogênico (Figura 20), sendo apresentada também, a tabela com o padrão de similaridade das amostras com seus respectivos padrões (Tabela 5). Os demais cromatogramas, que identificaram a presença dos compostos de interesse, encontram-se no APÊNDICE C.

Figura 19 - Cromatograma (CLAE), a 272 nm, do extrato etanólico da amostra “Catucaí amarelo 2SL torra 1” (CAT1).



Tempo de retenção de 2,74 minutos correspondente à presença de trigonelina¹ (A); Sobreposição dos espectros de absorção no pico representativo da trigonelina de uma solução padrão de referência (a) e da amostra CAT1 (b) (B). Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 20 - Cromatograma (CLAE), a 280 nm, do extrato etanólico da amostra “Catucaí amarelo 2SL seco e pilado” (CASP).



Tempo de retenção de 14,36 minutos correspondente à presença de ácido clorogênico² (A); Sobreposição dos espectros de absorção no pico representativo do ácido clorogênico de uma solução padrão de referência (a) e da amostra CASP (b) (B). Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4 – Concentração de trigonelina e ácido clorogênico ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) contidos nas amostras de café.

AMOSTRA	Ácido clorogênico [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Trigonelina [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]
CVCI	146,42	55,45
CVCM	103,32	70,26
CVSP	29,84	35,63
CVT1	nd	13,53
CVT2	nd	11,11
CVBSP	12,15	nd
CVBT1	nd	nd
CVBT2	nd	nd
CACI	189,26	90,47
CASP	192,85	86,27
CAT1	9,47	27,79
CAT2	nd	19,06

nd: não detectado

Tabela 5 – Padrão de similaridade das amostras, com os padrões de trigonelina e ácido clorogênico, contidos nas amostras de café.

AMOSTRA	Ácido Clorogênico	Trigonelina
CVCI	0,99	0,99
CVCM	0,99	0,99
CVSP	0,99	0,99
CVT1	nd	0,99
CVT2	nd	0,97
CVBSP	0,99	nd
CVBT1	nd	nd
CVBT2	nd	nd
CACI	0,99	0,99
CASP	0,99	0,99
CAT1	0,99	0,99
CAT2	nd	0,99

nd: não detectado

Os ácidos clorogênicos (ACG's) são conhecidos, principalmente, pelo seu potencial antioxidante e, no café, colabora com a síntese de compostos que, após os processos de torrefação, serão responsáveis pelos aspectos característicos da bebida como a cor, o sabor e o cheiro (ROSSETI, 2007; MOREIRA et al., 2015). O café verde é conhecido por possuir as maiores concentrações deste composto, entretanto, os processos de torra promovem sua degradação ou incorporação na formação de novos compostos bioativos, principalmente pelas reações de Maillard (LIU; KITTS, 2011).

No presente estudo, é possível observar que entre os grupamentos houve uma diferença quanto à presença de ACG's. A quantificação realizada mostra que o grupamento 3, pertencente ao Catucaí amarelo 2SL, revela maiores concentrações de ACG's, nas amostras CACI e CASP, que passam a decair de forma gradativa à medida que passaram pelo processo de torrefação, chegando a aproximadamente 5% da concentração inicial, quando submetido à torra leve (CAT1), e perda total na torra média (CAT2). O trabalho de Abrahão et al. (2010) corrobora com o presente estudo, ao avaliar duas padrões de bebida de café arábica (rio e mole) em grãos de cafés verdes e torrados. Naquele estudo, os resultados indicaram que durante os processos de torrefação ocorre uma redução drástica de ACG's. O trabalho de CHO et al. (2014) avaliou a flutuação de ACG's no café arábica e em cinco condições: verde e torras: leve, média escura e muito escura, nos tempos 9, 11, 13 e 16 minutos a 240°C. Esses pesquisadores obtiveram resultado com comportamento similar aos aqui apresentados, uma vez que observaram decréscimo de ACG's à medida que se prolongava os níveis de torra, corroborando a percepção de sensibilidade dos ACG's ao aquecimento.

Já o trabalho de Hečimović e colaboradores (2011) não corroboram esta ideia, uma vez que observaram para a maior parte das variedades por eles avaliadas, um aumento de ACG's na torra mais branda, que investigaram esse parâmetro em quatro variedades de café arábica e conilon, distribuídas em café verde e o café torrado em três níveis distintos.

De modo geral, estudos anteriores mostram uma diminuição de ACG's quando o café é condicionado a processos de torra, entretanto, outros aspectos são

observados. Por exemplo, Kamiyama (2015), em estudos com amostras comerciais de café, percebeu que os produtos do ácido clorogênico, formados a partir a torra, tendem a sofrer uma diminuição das concentrações de ACG's durante o aquecimento e, ainda, relaciona este evento a uma potencialização da atividade antioxidante. Vignoli e colaboradores (2013) inferem que os processos de torra podem diminuir a presença de ACG's em cafés arábica e conilon, mas inverso a esta diminuição, eles observaram o aumento do nível de melanoidinas, provavelmente, resultado das reações de Maillard. As melanoidinas também podem exercer funções biológicas importantes, como atividade antioxidante, isto porque os ACG's, assim como outros compostos fenólicos, quando não são totalmente degradados, podem se incorporar a estas novas estruturas (NICOLI, 1997; BEKEMAN, 2008). O presente estudo, no entanto, não pode atestar o percentual de ACG's que foram incorporados às melanoidinas, ou ainda, que contribuiu para os aspectos sensoriais da bebida, uma vez que esta avaliação não foi realizada.

Nas amostras nos grupamentos 1 e 2 observa-se a presença de ácido clorogênico em maiores concentrações nos cafés cerejas do grupamento 1 (CVCI e CVCM). Houve também, a observação do decaimento desta presença no café seco e pilado (CVSP), visto que esta observação pode estar relacionada ao fato destes cafés não fazerem parte do mesmo ciclo de colheita. Portanto, é possível que a degradação observada do CVCM para o CVSP não ocorra (Tabela 4). É possível ainda que a presença dos ACG's não sofra grande alteração durante o processo de secagem por via seca a partir de amostras maduras do café cereja.

No café "bóia", o café seco e pilado (CVBSP), apresenta uma menor concentração de ácido clorogênico, e assim como nos outros grupamentos, também é reduzida após a torra. Como os ACG's estão envolvidos, dentre outras funções, com aspectos relacionados à qualidade do café, é possível que a diminuição deste composto contribua com a perda de qualidade da bebida.

Apesar das variações observadas, os cafés secos e pilados, que foram os que possibilitaram uma melhor comparação, mostram um comportamento que permite ordená-los da seguinte maneira, quanto à presença de ácido clorogênico:

CASP>CVSP>CVBSP. Farah et al. (2006) relacionaram fatores genéticos, de espécies e variedades, graus de maturação, além das práticas agrícolas, na determinação da composição de ácidos clorogênicos do café, estes aspectos podem assim explicar as variações observadas no presente estudo.

Apesar de seus benefícios, pouco se conhece sobre a biodisponibilidade de ácidos clorogênicos no organismo humano. No trabalho de Farah e colaboradores (2008), foi avaliada essa biodisponibilidade em plasma e urina de 10 indivíduos adultos a partir de uma preparação hidroalcoólica de café verde descafeinado, transformado em cápsulas de 170mg, para ingestão. Esses estudos mostraram que os principais compostos oriundos da degradação dos ACG's foram encontrados no material analisado, indicando serem substâncias altamente absorvidas e metabolizadas por seres humanos.

A variação das concentrações da trigonelina nos diferentes grupamentos e níveis de processamento foi outro ponto abordado no presente estudo. No trabalho de Koshiro et al. (2006) foi avaliada a biossíntese de trigonelina em grãos de café arábica e robusta e os autores observaram que a atividade biossintética é maior no pericarpo do que nas sementes, mas em se tratando de frutos maduros observaram uma maior concentração desse composto em sementes, sugerindo uma transferência da trigonelina do pericarpo para a semente à medida que os frutos amadureciam.

A degradação da trigonelina, que ocorre durante o aquecimento e por processos de desmetilação e descaboxilação, também origina pirróis e piridinas que estão relacionadas ao "*flavor*" da bebida. Além disto, também é responsável pela produção de niacina (vitamina B3), que participa de processos do metabolismo energético (MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999 NOGUEIRA; TRUGO, 2003; ABRAHÃO, 2008; ANDRADE, 2009).

Conforme apresentado na Tabela 4, é possível observar uma variação dentro dos grupamentos, onde o grupamento 3, que é pertencente ao Catucaí amarelo 2SL, apresenta os maiores teores dos compostos de interesse, nas amostras CACI (90,47 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e CASP (86,27 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), apresentando uma maior degradação à

medida que o tempo de torrefação aumentava. O mesmo comportamento foi observado nas amostras do grupamento 1, Catuaí vermelho IAC 99. Casal, Oliveira e Ferreira (2000) observaram uma resposta semelhante, ao avaliarem cafés conilon e arábica. Sendo observado que no café arábica, a maior concentração de trigonelina foi encontrada em cafés verdes $0,89 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$, decaindo à medida que passava pelo processo de torra, chegando à $0,05 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Outra observação do mesmo estudo foi a de que durante a degradação da trigonelina havia o aumento do ácido nicotínico (outra denominação da vitamina B3), mas que o aumento do tempo de torra, ainda que em uma mesma temperatura, também promovia sua degradação, demonstrando que uma torra mais acentuada poderia suprimir os benefícios provenientes da torrefação.

Entretanto, Wei e Tanokura (2014), ao avaliarem cafés conilon e arábica de diferentes localidades, observaram que a torra clara promoveu o aumento nas concentrações de trigonelina. Contudo, para a maioria dos relatos da literatura, é comum a informação de que há maior concentração de trigonelina em cafés verdes, com perdas durante o processo de torrefação (MONTEIRO; TRUGO, 2005; ZHOW; CHAN; ZHOU, 2012; MOREIRA, 2013), assim como observado no presente trabalho.

No grupamento 3, Catuaí vermelho IAC 99 “bóia”, não foi detectada a presença da trigonelina. Como este composto contribui para a qualidade da bebida final, justifica-se aqui a sua ausência nos cafés “bóia”, pois normalmente eles são considerados cafés de baixa qualidade (SANTOS; CHALFOUN; PIMENTA, 2009).

6.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Nos últimos anos houve o aumento do interesse por produtos naturais que possuíssem componentes químicos com atividade antioxidante. Agentes sintéticos com esta capacidade têm perdido seu espaço devido à suspeita de promover a carcinogênese, já de origem natural, provenientes principalmente de plantas, tem auxiliado da prevenção do estresse oxidativo em células vivas (LIMA et al., 2010; CHO et al., 2014).

A atividade antioxidante de duas cultivares de café arábica – Catuaí vermelho IAC 99 e Catuaí amarelo 2SL foram mensuradas por quatro testes *in vitro*: DPPH, ABTS, FRAP e Atividade Quelante do Fe^{2+} . Os resultados estão apresentados na Tabela 6, por EC_{50} , na forma de média e erro padrão (EP). A concentração eficiente (EC_{50}) representa a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do radical ou íons de transição, em 50%. Assim, quanto menor o EC_{50} , melhor será o desempenho da amostra. A curva dos padrões utilizados para os testes se encontra no APÊNDICE D.

De modo geral, das duas cultivares avaliados, dos três grupamentos e em todas as condições de processamento, a amostra Catuaí amarelo 2SL seco e pilado (CASP) apresentou melhor desempenho como antioxidante, para todos os testes avaliados, sendo importante ressaltar também que esta mesma amostra apresentou os maiores teores de compostos bioativos. Sabe-se que a atividade antioxidante de plantas, muitas vezes está relacionada com a presença de compostos fenólicos como: ácidos fenólicos (ácido clorogênico), flavonoides e taninos (ANDRADE; HENARES; MORALES, 2005; BARBOSA, 2015).

Segundo Abrahão (2008), a característica redutora apresentada por compostos fenólicos desempenham um papel importante na neutralização de radicais livres, além da quelação de metais em transição, sugerindo que estes compostos atuam na prevenção do estresse oxidativo e, portanto, como excelentes antioxidantes.

Pela correlação de Pearson (Tabela 7) o teor de taninos é o composto mais relacionado com a resposta antioxidante das amostras, para os testes DPPH (- 0,756), ABTS (- 724) e FRAP (- 0,635), mas não para o teste de Atividade quelante (- 0,489). A correlação negativa, neste caso, indica que aumento de teor de taninos está ligado a uma baixa do EC_{50} (melhor atividade antioxidante). A amostra CASP, possui o maior teor de taninos, justificando, portanto, seu desempenho para a maior parte dos testes. Muitos trabalhos relatam a boa atividade antioxidante de taninos proveniente de plantas de modo geral (SILVA; SILVA, 1999; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; FIGUEROA-ESPINOZA et al., 2015). Os estudos de Costa et al. (2014), avaliaram extrações do café arábica com os solventes água e etanol, em diferentes variações de volume, mostraram

que em dois testes avaliados (FRAP e DPPH), a atividade do teste FRAP estava altamente correlacionada com a presença de taninos e fenóis totais.

Dentro dos grupamentos, as amostras secas e piladas (CVSP, CVBSP e CASP), também conhecidas como “café verde”, e o nível de torra leve (CVT1), apresentaram as melhores respostas antioxidantes mostrando serem mais benéficas para a saúde, no que tange a discussão de prevenção e inibição de danos oxidativos.

Os estudos apresentados por Vignoli, Bassoli e Benasse (2011), mostraram que os diferentes níveis de torra de cultivares Arábica e Robusta, testados pelo grupo, não afetaram significativamente a atividade antioxidante, considerando ainda que a atividade estivesse mais relacionada com a composição química do grão do que aos processos de torra aos quais as amostras foram condicionadas.

Outros estudos como os de KAMIYAMA et al. (2015), a partir de extratos aquosos de cafés comerciais, mostraram ainda um aumento significativo da atividade antioxidante durante o processo de torra, sugerindo que havia uma potencialização desta atividade por meio da reação de Maillard. Este fato não foi observado no presente estudo, uma vez que, de forma geral, as amostras apresentaram perda significativa da atividade antioxidante quando submetidas às condições de torra, com algumas exceções tais como no caso da atividade quelante de ferro, que demonstrou melhor resultado após a torra 1, mas voltando a decrescer na torra 2.

Tabela 6 – Atividade antioxidante de duas cultivares do café arábica, Catuaí Vermelho IAC 99 e Catuaí amarelo 2SL, em diferentes níveis de processamento pós-colheita em quatro diferentes métodos (DPPH, ABTS, FRAP e Atividade Quelante do Fe²⁺).

AMOSTRA	DPPH (Ác. ascórbico*)		ABTS (Trolox*)		FRAP (FeSO ₄ *)		Atividade quelante (EDTA*)	
	EC ₅₀ (µg.ml ⁻¹) ± EP		EC ₅₀ (µg.ml ⁻¹) ± EP		EC ₅₀ (µg.ml ⁻¹) ± EP		EC ₅₀ (µg.ml ⁻¹) ± EP	
PADRÃO	24,11 ^g	± 0,18	57,61 ^h	± 0,11	279,73 ^f	± 1,21	28,77 ^g	± 0,06
CVCI	194,25 ^c	± 1,46	136,68 ^e	± 0,43	432,21 ^{de}	± 7,67	327,16 ^a	± 2,32
CVCM	135,22 ^d	± 1,74	141,42 ^e	± 0,64	551,43 ^c	± 2,56	153,82 ^d	± 6,24
CVSP	111,37 ^e	± 3,29	87,46 ^f	± 0,76	458,69 ^d	± 6,79	221,06 ^c	± 1,76
CVT1	144,73 ^d	± 1,31	90,75 ^f	± 0,93	452,37 ^d	± 0,56	158,78 ^d	± 0,67
CVT2	410,94 ^a	± 1,19	170,21 ^c	± 1,00	774,6 ^b	± 5,24	257,07 ^b	± 2,85
CVBSP	133,76 ^{de}	± 5,98	73,55 ^g	± 0,88	309,55 ^f	± 1,37	114,30 ^e	± 0,92
CVBT1	204,05 ^c	± 3,33	136,91 ^e	± 0,15	480,12 ^{cd}	± 1,35	117,56 ^e	± 0,78
CVBT2	336,33 ^b	± 0,75	158,75 ^d	± 1,12	463,96 ^d	± 11,14	147,51 ^d	± 1,16
CACI	135,02 ^d	± 0,80	186,31 ^b	± 0,32	352,06 ^{ef}	± 9,68	71,22 ^f	± 0,65
CASP	68,00 ^f	± 0,20	53,39 ^h	± 1,67	190,82 ^g	± 0,49	51,53 ^f	± 0,67
CAT1	186,32 ^c	± 2,87	74,60 ^g	± 2,97	488,68 ^{cd}	± 6,79	112,81 ^e	± 2,40
CAT2	407,77 ^a	± 2,90	258,19 ^a	± 0,64	1017,68 ^a	± 10,54	223,53 ^c	± 2,70

Os valores estão expressos em média ± EP (n=3); EP: Erro Padrão; ^{a-h} Infere diferença estatística significativa entre os tratamentos, ANOVA, Teste Tukey (p<0,05); *Padrão para comparação de atividade antioxidante.

Tabela 7 – Matrix de correlação de Pearson

Variáveis	DPPH	ABTS	FRAP	At. Quelante	MTT	Sarcoma	Flavonoides	Taninos	Ácido Clorogênico
DPPH	1								
ABTS	0,743	1							
FRAP	0,823	0,777	1						
At. Quelante	0,484	0,357	0,528	1					
MTT-Sarcoma	-0,195	0,345	0,013	-0,150	1				
Flavonoides	-0,522	-0,241	-0,480	0,029	0,410	1			
Taninos	-0,756	-0,724	-0,635	-0,489	0,079	0,624	1		
Ác. Clorogênico	-0,530	-0,099	-0,499	-0,219	0,610	0,891	0,571	1	
Trigonenila	-0,521	-0,060	-0,352	-0,229	0,697	0,843	0,588	0,942	

Os valores a negrito são diferentes de 0 com um nível de significância $\alpha = 0,05$

Dentro dos grupamentos, as amostras secas e piladas (CVSP, CVBSP e CASP), também conhecidas como “café verde”, e o nível de torra leve (CVT1), apresentaram as melhores respostas antioxidantes mostrando serem mais benéficas para a saúde, no que tange a discussão de prevenção e inibição de danos oxidativos.

Os estudos apresentados por Vignoli, Bassoli e Benasse (2011), mostraram que os diferentes níveis de torra de cultivares Arábica e Robusta, testados pelo grupo, não afetaram significativamente a atividade antioxidante, considerando ainda que a atividade estivesse mais relacionada com a composição química do grão do que aos processos de torra aos quais as amostras foram condicionadas.

Outros estudos como os de KAMIYAMA et al. (2015), a partir de extratos aquosos de cafés comerciais, mostraram ainda um aumento significativo da atividade antioxidante durante o processo de torra, sugerindo que havia uma potencialização desta atividade por meio da reação de Maillard. Este fato não foi observado no presente estudo, uma vez que, de forma geral, as amostras apresentaram perda significativa da atividade antioxidante quando submetidas às condições de torra, com algumas exceções tais como no caso da atividade quelante de ferro, que demonstrou melhor resultado após a torra 1, mas voltando a decrescer na torra 2.

Este resultado, no entanto, não está diretamente relacionado ao aumento de compostos bioativos (da amostra CVT1) aqui avaliados, mas sim, em uma diminuição de taninos não significativa. É importante ressaltar ainda que o Teste

de Atividade Quelante do Fe^{2+} é um teste de avaliação secundária de atividade antioxidante, ligado a quelação de metais envolvidos em processos de catalisação e produção de ERO's (BARREIROS, DAVID; DAVID, 2006).

Para os outros grupamentos (2 e 3) as amostras secas e piladas (CVBSP e CASP), revelaram a melhor atividade antioxidante seguida de uma perda gradativa desta atividade ao ser condicionada ao processo de torrefação (Tabela 6). Isso se deve a degradação de compostos bioativos importantes para esta atividade (SANTOS et al, 2007; VIGNOLI; BASSOLI; BENASSE, 2011). Nascimento (2006) relata esta diminuição de atividade no teste atividade antioxidante de óleos de café verde e torrado.

Daglia et al. (2000), também verificaram esta relação na análise de 6 frações de café verde, 3 cafés arábica e 3 cafés conilon, em três diferentes níveis de torra, observando que as amostras de café verde com maior massa molecular estavam ligados a uma maior atividade antioxidante. Apesar da existência de muitos estudos contraditórios quando ao ganho ou perda de compostos bioativos durante a torra, é importante ressaltar que os fatores genéticos e ambientais podem estar diretamente relacionados com estas divergências, somado a isso, a escolha do solvente e até mesmo frações podem estar ligados a estas variações.

Apesar da diminuição dos compostos de interesse, principalmente os taninos, as amostras que passaram pelo processo de torrefação continuaram revelando atividade antioxidante. Entres as torras, a que obteve o melhor desempenho foram as amostras submetidas ao primeiro nível de torra (CVT1, CVBT1 e CAT1) que apresentaram as melhores respostas nos quatro testes avaliados (Tabela 6). Esse fato pode ser devido à presença de taninos (Tabela 3), mesmo que em menores teores, ou ainda a formação de novos compostos antioxidantes formados após o processo de torra (HALSTED, 2003), que através da reação de Maillard, originam inclusive, compostos de atividade antioxidante secundária que participam da quelação de metais (DAGLIA, 2000; BEKEMAN, 2008).

A amostra CAT2 (Catucaí amarelo 2SL, torra 2) foi a que apresentou, significativamente, as piores respostas antioxidantes (Tabela 6), para todos os

testes avaliados e, na avaliação dos compostos bioativos de interesse, os seus teores de taninos foram aqueles que decresceram mais drasticamente com o aumento do tempo de torra. A torra branda, segundo Vignoli, Bassoli e Benasse (2011), não promove o decaimento significativo dos compostos bioativos do café, este fato pode ser observado apenas na avaliação dos teores de Taninos das duas amostras de um mesmo grupamento (CVSP e CVT1) (Tabela 3), que além de estar mais correlacionados a atividade antioxidante (Tabela 6) também mostra a semelhança estatística entre as duas amostras para dois testes.

6.4 VIABILIDADE CELULAR

O teste do MTT é um dos testes in vitro mais promissores para avaliação de citotoxicidade, nos estudos de Fotakis, Timbrell (2006), foi feita avaliação de quatro testes comumente utilizados para análise de viabilidade celular: vermelho neutro, ensaio de LDH (Lactato desidrogenase) e ensaios de proteínas e MTT. O teste do MTT e teste vermelho neutro se mostram os mais sensíveis para a detecção de uma toxicidade inicial, onde é possível observar um efeito tóxico em uma organela específica, a mitocôndria.

Nos ensaios de viabilidade celular foi avaliada a capacidade antiproliferativa das doze amostras de café em estudo, sob duas linhagens celulares: Linfócitos humanos e Sarcoma 180. Nestes ensaios, a redução enzimática de sais de tetrazólio (MTT) está relacionada à sobrevivência de células que se mostram metabolicamente ativas após exposição à substância teste.

6.4.1 Viabilidade celular - Linfócitos humanos

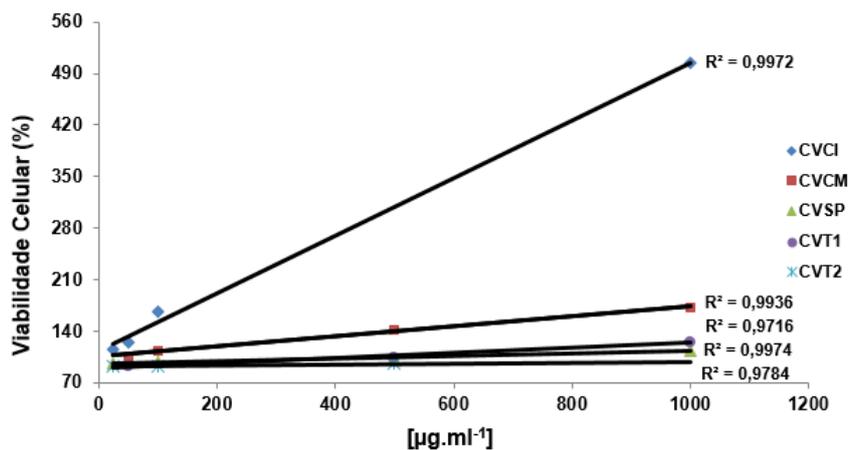
Em condições normais, o organismo mantém-se em homeostase, ou seja, há um equilíbrio entre a proliferação e a morte celular, entretanto, alterações neste equilíbrio podem resultar em hiperplasias ou neoplasias (FOSTER, 2008). Os resultados do teste de viabilidade celular em células saudáveis estão representados nas figuras 24, 25 e 26, de acordo com os grupamentos

estabelecidos. As amostras do presente estudo em todos as cultivares avaliados, obtiveram efeito mitógeno, ou seja, desencadeou a proliferação celular. Entretanto, a amostra Catuaí vermelho cereja imaturo (CVCI) se mostrou a mais efetiva para este feito, onde se observa o aumento de aproximadamente 390%. O restante das amostras tiveram efeitos proliferativos no margem que variou entre 10% e 70%.

O estímulo para proliferação celular está ligado à liberação de fatores de crescimento, estes fatores se ligam a receptores na membrana celular. Segundo Oliveira, (2008) sinais são transmitidos através da membrana para proteínas citoplasmáticas que por consequência liberam fatores de transcrição dentro do núcleo. Assim, é possível aferir que todas as amostras de café aqui avaliadas, ainda que em diferentes níveis de processamento pós-colheita, possuem em sua composição fatores de crescimento atuantes para a linhagem celular avaliada.

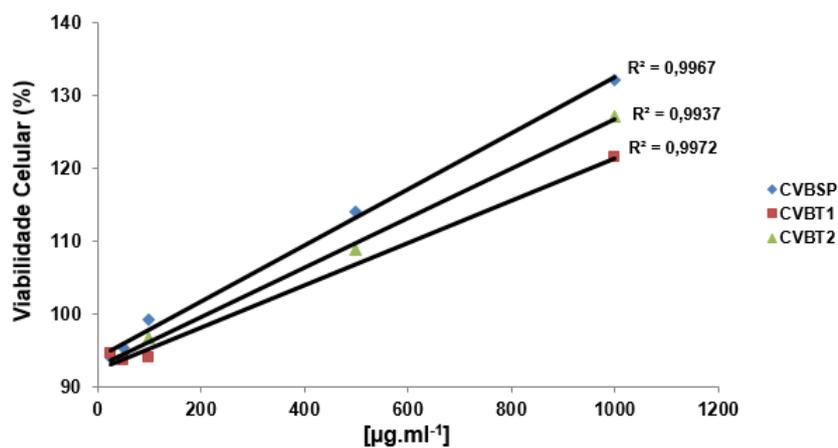
Macêdo e colaboradores (2010) associam a multideficiência de minerais como, o zinco, o cobre e o magnésio à disfunções imunológicas, que podem levar o indivíduo à linfopenia (diminuição de linfócitos). Os autores explicam estes minerais quando presentes atuam como co-fatores de enzimas responsáveis por atividades metabólicas que levam ao aumento dos linfócitos. Trabalhos como de Peres e Koury (2011) corroboram com essa conclusão onde há relação da participação do zinco em processos proliferativos, nos quais este mineral funcionaria como um estabilizador de membranas com o aumento de atividade das enzimas DNA e RNA polimerases, que são requeridas nos processos de replicação e transcrição.

Figura 21 - Viabilidade celular em linfócitos humanos do cultivar “Catuaí Vermelho IAC 99”, em diferentes níveis de processamento pós-colheita (Grupamento 1) à 630nm.



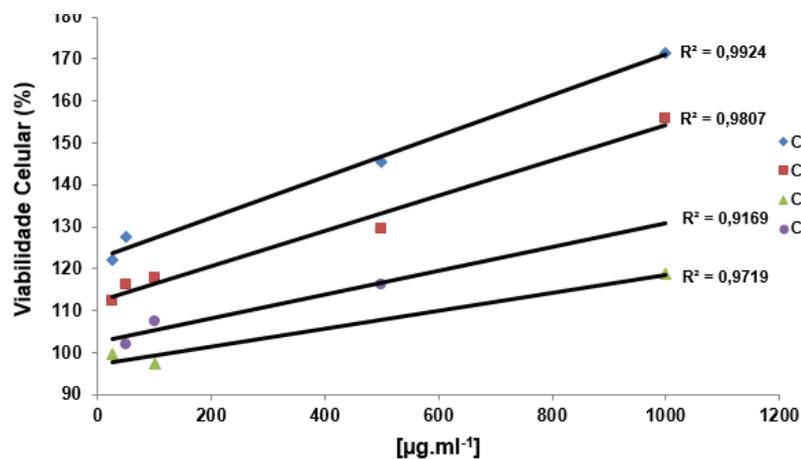
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 22 - Viabilidade celular em linfócitos humanos do cultivar “Catuaí Vermelho IAC 99 Bóia”, em diferentes níveis de processamento pós-colheita (Grupamento 2) à 630nm.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 23 - Viabilidade celular em linfócitos humanos do cultivar “Catucaí amarelo 2SL”, em diferentes níveis de processamento pós-colheita (Grupamento 3) à 630nm.



Fonte: Arquivo pessoal.

PARREIRA (2009) avaliou o efeito do consumo de café por indivíduos adultos e, observou que não houve diferença significativa no percentual de linfócitos para as variáveis: faixa etária, nível de atividade física, nível de consumo de café e nos períodos antes e depois do experimento. Neste caso, pode-se propor que a justificativa para a diferença entre os testes aplicados se dá pelo fato de nos testes *in vivo* haver interferências que podem diminuir a biodisponibilidade dos fatores de crescimento, uma vez que se trata de um organismo com todas as funções biológicas ativas. Enquanto, nos testes *in vitro*, tais fatores podem ser controlados, uma vez que neste caso pode-se avaliar uma linhagem celular específica, com a intervenção mínima de outros fatores.

Chakrabarti et al., (2016) avaliaram a capacidade da cafeína isolada proteger células de linfócitos humanos a indução de genotoxicidade provocadas pelo medicamento sibutramina. Eles observaram que acima de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a cafeína era tóxica, porém, em doses menores, era capaz de proteger a linhagem celular dos danos induzidos por sibutramina.

Outros estudos como de Jeong e colaboradores (2013) mostraram a atividade protetiva de café submetido à torra ao aplicar o teste do MTT em células neuronais da linhagem PC12, com indução de toxicidade por H_2O_2 . O café exposto previamente ao dano induzido por H_2O_2 teve efeito protetivo sobre a linhagem celular, reafirmando assim seu potencial efeito antioxidante, em outra modalidade de teste *in vitro*.

6.4.2 Viabilidade celular - Sarcoma 180

Os testes de viabilidade celular na linhagem tumoral do Sarcoma 180 constam na Tabela 8, onde os dados estão representados em EC_{50} , sendo que o menor valor indica melhor atividade antiproliferativa e vice-versa. As amostras de café aqui avaliadas possuem uma ação citotóxica para esta linhagem tumoral, entretanto, não seguem um padrão específico dentro dos grupamentos, ou seja, um padrão correlacionado ao processamento pós-colheita ou mesmo ao nível de maturação

do grão. Analisando-se a tabela de correlação de Pearson (Tabela 7), observa-se uma correlação positiva entre os resultados aqui apresentados e os compostos ácido clorogênico e trigonelina. Esta correlação, em linhas gerais, infere que a presença de ácido clorogênico e trigonelina dificulta a morte celular.

No trabalho de Pereira (2014), foi avaliado o efeito do ácido clorogênico sobre a viabilidade de sêmen suíno, onde foi verificado que este composto melhorava a viabilidade celular, promovia o aumento de mitocôndrias ativas além de desencadear o aumento da atividade antioxidante pela diminuição do dialdeído malônico, que é um produto da peroxidação de lipídios. O autor ainda infere que o ácido clorogênico é melhor que a vitamina E, no que tange o melhoramento da viabilidade.

Os estudos de Zhou, Chan e Zhou (2012), que investigaram, dentre outros aspectos, a atividade antioxidante de trigonelina em pâncreas de ratos diabéticos, indicam que houve um aumento de enzimas antioxidantes, com consequente diminuição da peroxidação lipídica. Este mesmo estudo ainda relata diminuição significativa dos níveis de glicemia, colesterol total e triglicerídeos dos organismos avaliados.

Os mecanismos de apoptose se dão por duas vias: extrínseca (citoplasmática) ou intrínseca (mitocondrial) (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Segundo esses autores, a via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular, onde os resultados destes estímulos convergem para a mitocôndria, organela considerada a principal mediadora de processos apoptóticos, uma vez que permite a permeabilização com a consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas. Segundo Marullo e colaboradores (2013), a presença de compostos capazes de inibir a respiração mitocondrial, podem desencadear a produção de ERO's que promovem o desequilíbrio de processos metabólicos da mitocôndria, levando a célula à apoptose.

Comumente, células de linhagem tumoral tendem a ter uma resistência a processos de apoptose (OKADA; MAK, 2004), mas percebe-se que amostras de café mesmo que em doses relativamente altas de EC₅₀ desencadearam esta

ação. Oliveira (2012) comenta sobre controle que a família de proteínas Bcl-2 têm sobre os eventos apoptóticos, uma vez que induzem ou reprimem a indução a apoptose, controlando a permeabilidade da membrana, podendo ser anti-apoptótica (como Bcl-XL, Bcl-XS) ou pró- apoptótica (como Bcl-10, Bax, Bak).

Tabela 8 - Atividade antiproliferativa de células tumorais (Sarcoma 180) de duas cultivares do café arábica, Catuaí vermelho IAC 99 e Catuaí amarelo 2SL, em diferentes níveis de processamento pós-colheita pelo método do MTT (630 nm).

AMOSTRA	EC ₅₀ (µg.ml ⁻¹) ± EP
CVCI	834,11 ^b ± 1,01
CVCM	1752,01 ^a ± 23,05
CVSP	140,86 ^f ± 5,72
CVT1	615,83 ^{cd} ± 16,86
CVT2	505,42 ^{cd} ± 3,94
CVBSP	529,42 ^{cd} ± 10,98
CVBT1	277,91 ^e ± 10,07
CVBT2	331,78 ^e ± 11,05
CACI	1652,43 ^a ± 13,19
CASP	623,99 ^c ± 15,27
CAT1	488,00 ^d ± 22,99
CAT2	803,28 ^b ± 20,91

Os valores estão expressos em média ± EP; EP: Erro Padrão; ^{a-f} Inere diferença estatística significativa entre os tratamentos, ANOVA, Teste Tukey (p<0,05).

Como a homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007), pode-se inferir que as amostras de café demonstraram um papel de desequilíbrio destes sistemas para a linhagem de células tumorais aqui avaliadas.

No trabalho de Oliveira (2007) em que foram avaliados, *in vivo*, os efeitos do tratamento com café liofilizado, por 110 dias, em ratos *Wistar* machos, com indução de modelo hepatócito resistente (HR), observou-se a redução de 78% das lesões pré-neoplásicas, indicando que o café possuiu ação moduladora sobre

a hepatocarcinogênese. JIANG e colaboradores (2000) observaram a presença de ação citotóxica em concentrações milimolares do ácido clorogênico, um dos principais compostos bioativos do café, em duas linhagens tumorais humanas. Os autores ainda inferem ação da proteína caspase no processo de morte celular. Todavia, o presente trabalho não permite fazer esta aferição, uma vez que não foi investigado o papel do ácido clorogênico isolado, sobre a citotoxicidade na linhagem Sarcoma 180.

Crisóstomo e colaboradores (2014) avaliaram a capacidade do café arábica torrado reestabelecer o crescimento de quatro linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Eles observaram que em nenhuma concentração testada o café foi capaz de reverter o dano causado por H₂O₂, e ainda complementam, afirmando que o café avaliado só tem um efeito protetivo quando pré-exposto às células. Já no trabalho de Guimarães e colaboradores (2017), foi feito um ensaio antiproliferativo em MTT com cafés robusta em quatro diferentes condições: café verde, torra clara, torra média e torra escura. Os autores observaram que todas as amostras tinham capacidade de matar células tumorais, onde a torra clara tinha o maior percentual (83%) e a torra escura o menor (22,9%).

Em uma análise global, os estudos que tratam das análises anticarcinogênicas do café, em sua grande parte, se referem ao efeito protetivo e preventivo do café aos danos celulares que podem levar ao quadro carcinogênico. A ação citotóxica aqui apresentada mostrou a necessidade de doses relativamente elevadas para a maior parte das amostras. Deve-se levar em consideração que estes resultados podem se diferir de testes *in vivo*, uma vez que a biodisponibilidade dos agentes atuantes no processo de apoptose podem ser menores.

7 CONCLUSÕES

- As amostras de café exibiram atividades antioxidantes distintas, em relação a cada uma das condições avaliadas, quando aplicados os quatro ensaios: DPPH, ABTS, FRAP e Atividade quelante do Fe^{2+} .
- A amostra CASP (Catucaí amarelo 2SL), tanto para atividade antioxidante quanto para a concentração de compostos bioativos foi a que obteve os melhores resultados tanto para a concentração de compostos bioativos, quanto para a avaliação de atividade antioxidante.
- A presença dos compostos bioativos: ácido clorogênico, trigonelina flavonoides e taninos, aqui avaliados, tenderam à queda na medida em que se aumentava o nível de torra, condição que influenciou negativamente na atividade antioxidante, para a maioria das amostras avaliadas.
- A análise de correlação de Pearson indicou que os taninos, presentes nas diferentes amostras, foram os compostos bioativos mais relacionados às respostas antioxidantes observadas.
- A avaliação de viabilidade celular em linfócitos humanos, demonstrou uma função mitógena, com um aumento de proliferação que alcançou percentuais entre 10% e 70%, onde apenas a amostra CVCI apresentou proliferação superior a 300%, não sendo possível definir o agente responsável por esta resposta.
- A análise de viabilidade celular em células tumorais de Sarcoma 180 mostrou uma ação citotóxica do café para esta linhagem. Apesar de não exibir um padrão uniforme frente às condições avaliadas, houve correlação com ácido clorogênico e trigonelina, indicando que a presença destes compostos favorecem a viabilidade celular.

REFERÊNCIAS

ABIC – Associação Brasileira de indústria de Café. **História**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38#57>>. Acesso 21 set. 2017a.

ABIC – Associação Brasileira de indústria de café. **Exportações brasileiras de café verde – não torrado, não descafeinado**: Principais países importadores. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=49#81>>. Acesso 23 set. 2017b.

ABRAHÃO, S. A. et al. 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. et al. Coffee (*Coffea arabica* L.) bioactive compounds and antioxidant activity. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 414-420, 2010.

ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1799-1804, 2008.

AGUIAR, A. T. E. et al. Diversidade química de cafeeiros na espécie *Coffea canephora*. **Bragantia**, v. 64, n. 4, p. 577-582, 2005.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.

ALMEIDA, A. A. P. **Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação *in vitro* e em modelo alimentar**. 2007. 135f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ALMEIDA, M. B.; BENASSI, M. T. Atividade antioxidante e estimativa do teor de melanoidinas em cafés torrados comerciais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. suplemento 1, p. 1893-1900, 2011.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.

ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2169-2180, 2009.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ANDRADE, A. P. S. **Análise química e avaliação do potencial alelopático da casca do café (*Coffea arabica* L.)**. 2009. 107f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

ANDRADE, C. D.; HENARES, J. A. R.; MORALES, F. J. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7832-7836, 2005.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Phenolic compounds in foods-a brief review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.

ASGHAR, A.; RAMAN, A. A. A.; DAUD, W. M. A. W. Advanced oxidation processes for in-situ production of hydrogen peroxide/hydroxyl radical for textile wastewater treatment: a review. **Journal of cleaner production**, v. 87, p. 826-838, 2015.

BACCI, L. A. **Combinação de métodos de séries temporais para previsão da demanda de café no Brasil**. 2007. 145f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Federal de Itajubá - Itajubá, 2007.

BAGGENSTOSS, J. et al. Coffee roasting and aroma formation: application of different time-temperature conditions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Columbus, v. 56, n. 14, p. 5836-5846, 2008.

BARBOSA, L. B. G. **Compostos bioativos e capacidade antioxidante em abóboras-gila (*Cucurbita ficifolia* Bouché)**. 2015. 31f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana. Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília, Distrito Federal. 2015.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. L. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, Vol. 29, No. 1, p.113-123, 2006.

BARROS, J. A. C. **Avaliação da atividade antioxidante e antiproliferativa do extrato aquoso de frutas tropicais**. 2012. 74f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

BASTOS, D. H. M. et al. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.

BATISTA, D. R. R.; DE MATTOS, M.; DA SILVA, S. F. Convivendo com o câncer: do diagnóstico ao tratamento. **Revista de Enfermagem da UFSM**, v. 5, n. 3, p. 499-510, 2015.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2008.

BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 43-50, 2010.

BEKEDAM, E. K. et al. Incorporation of chlorogenic acids in coffee brew melanoidins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 6, p. 2055-2063, 2008.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9, 2012.

BORGES, L. L. et al.; Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1-20, 2011.

BRAGANÇA, S. M. et al. Variedades clonais de café Conilon para o Estado do Espírito Santo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 765-770, 2001.

CALABRESE, E. et al. Crohn's disease: a comparative prospective study of transabdominal ultrasonography, small intestine contrast ultrasonography, and small bowel enema. **Inflammatory bowel diseases**, v. 11, n. 2, p. 139-145, 2005.

CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B.; FERREIRA, M. A. HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 481-485, 2000.

CAVALCANTE, A. G. M.; BRUIN, P. F. C. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. **Jornal brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, p. 1227-1237, 2009.

CECAFÉ - Conselho dos exportadores de café do Brasil. **Exportações brasileiras e consumo externo de café**. Relatório Mensal outubro de 2016. Disponível em: <http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/informe_estatistico/CECAFE_Relatorio_Mensal_OUTUBRO_2016.pdf>. Acesso em: 3 out. 2017

CECAFÉ – Conselho dos exportadores de café do Brasil. **Sobre o café: Produção**. Disponível em:<<http://www.cecafe.com.br/sobre-o-cafe/producao/>>. Acesso em: 23 set. 2017.

CHAKRABARTI, M. et al. Genotoxicity of antiobesity drug orlistat and effect of caffeine intervention: an in vitro study. **Drug and chemical toxicology**, v. 40, n. 3, p. 339-343, 2016.

CHO, A. R. et al. Influence of roasting conditions on the antioxidant characteristics of Colombian coffee (*Coffea arabica* L.) beans. **Journal of food biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 271-280, 2014.

CLIFFORD, M. N.; KELLARD, B.; BIRCH, G. G. Characterisation of chlorogenic acids by simultaneous isomerisation and transesterification with tetramethylammonium hydroxide. **Food chemistry**, v. 33, n. 2, p. 115-123, 1989.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: café**, v. 4, n. 2, 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_18_15_37_37_boletim_cafe_-_maio_2017.pdf>. Acesso em: 22 set. 2017.

CONSÓRCIO PESQUISA CAFÉ. **Catucaí**. Disponível em: <<http://www.consorcioquesquisacafe.com.br/index.php/tecnologias/separador8/cultivares/505-catucai>>. Acesso em: 10 out. 2017.

CORNELLI, U. Antioxidant use in nutraceuticals. **Clinics in dermatology**, v. 27, n. 2, p. 175-194, 2009.

CORREA, R. M. S. et al. **Avaliação in vitro dos possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos do alcalóide julocrotina em linfócitos humanos**. 2011. 33f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular. Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

COSTA, A. S. G. et al. Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 350-357, 2014.

COSTA, M. C. **Compostos bioativos e atividade sequestrante de radicais livres de quatro cultivares do *Coffea arabica* L. em diferentes estádios de maturação dos frutos**. 2015. 90f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências dos alimentos. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2015.

COTINGUIBA, G. G. et al. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, 2015.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical reviews**, v. 109, n. 7, p. 3012-3043, 2009.

CRISÓSTOMO, L. M. S. et al. **Efeitos de extratos de café na proteção contra oxidantes em *Saccharomyces cerevisiae***. 2014. 78f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana. Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2014.

CUONG, T. V. et al. Effect of roasting conditions on several chemical constituents of vietnam robusta coffee. The Annals of the University of Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI. Food Technology, v. 38, n. 2, p. 43, 2014.

DAGLIA, M. et al. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1449-1454, 2000.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DEWANTO, V. et al. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 10, p. 3010-3014, 2002.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DURÁN, C. A. A. et al. Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida. **Revista Virtual de Química**. v. 9, n. p. 107-134, 2016.

ENGERS, V. K.; BEHLING, C. S.; FRIZZO, M. N. A Influência do Estresse Oxidativo no Processo de Envelhecimento Celular. **Revista Contexto e Saúde**, v. 11, n. 20, p. 93-102, 2013.

FARAH, A. et al. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 12, p. 2309-2315, 2008.

FARAH, A. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 373-380, 2006.

FALCÃO, L.; PEREIRA, F. A. B.; ARAÚJO, M. E. Caracterização de cabedais adamascados e de guadamecis dos séculos XVII e XVIII por ATR-FTIR. **Livro de resumos: investigações em conservação do património, 1º colóquio**, p. 103-105, 2016.

FERNANDES, S. M. et al. Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 7, n. 3, p. 197-199, 2001.

FERRÃO, M. F. et al. Técnica não destrutiva de análise de tanino em café empregando espectroscopia no infravermelho e algoritmo genético. **Tecno-lóg**, v. 7, p. 9-26, 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, K. F. C.; NARDIN, J. M. Avaliação in vitro da citotoxicidade do extrato de *Bauhinia glabra* em células linfocitárias normais. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 1, n. 13, p. 79-92, 2017.

FERREIRA, P. M. P. **Determinação do potencial antitumoral de diterpenos isolados das folhas de *Casearia sylvestris* Swarts**. 2007. 116f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

FIGUEROA-ESPINOZA, M. C. et al. Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidant properties. **Food chemistry**, v. 178, p. 38-44, 2015.

FILHO, A. F. L. SILVA, J. S. Secagem de café em combinação. **Revista Brasileira de Engenharia agrícola e ambiental**. Vol.10, n.3, p.671-678, 2006.

FONSECA, Y. M. et al. Determinación de rutina en el extracto *Erythroxylum suberosum* por cromatografía líquida: aplicación de la normalización de las hierbas y los estudios de estabilidad. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, n. 2, 2014.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein test in hepatoma cell lines after exposure to cadmium chloride. **Letters of toxicology**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FREDERICO, S. Cafeicultura científica globalizada e as montanhas capixabas: a produção de café arábica nas regiões do Caparaó e serrana do Espírito Santo. **Sociedade & Natureza**, v. 25, n. 1, 2013.

FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, n. 2, p. 144-149, 2008.

GRIVICICH, I. REGNER, A. ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUIMARÃES, D. A. B., et al. Influência na atividade antiproliferativa de células cancerosas de próstata humana de extratos de grãos de café (*C. canephora*) submetidos a diferentes tipos de torra. Resumos Ganepão. **Braspen Journal**, São Paulo v. 32, (Supl.), 2017. Disponível em: <<https://www.ganepao.com.br/arquivos/Anais-2017.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2017.

HALSTED, C. H. Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin? **The American journal of clinical nutrition**, v. 77, n. 4, p. 1001S-1007S, 2003.

HASLAM, E. **Plant polyphenols: vegetable tannins revisited**. CUP Archive, 1989.

HEČIMOVIĆ, I. et al. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. **Food chemistry**, v. 129, n. 3, p. 991-1000, 2011.

HERNANDEZ-MONTES, E. et al. Activation of glutathione peroxidase via Nrf1 mediates genistein's protection against oxidative endothelial cell injury. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 346, n. 3, p. 851-859, 2006.

HIRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 418-24, 2004.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

IAC – Instituto Agronômico. **Cultivares de café desenvolvidas pelo Instituto Agronômico (IAC) e registradas no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento** – MAPA (registro nacional de cultivares). Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/cafe/tabela_rnc_cultivares_cafe_iac.pdf>. Acesso em: 10 out. 2017.

ICO – International Coffee Organization. **Coffee market report**. 2017. Disponível em: <<http://www.ico.org/documents/cy2017-18/cmr-1017-e.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2017.

JEONG, J. H. et al. Antioxidant and neuronal cell protective effects of columbia arabica coffee with different roasting conditions. **Preventive nutrition and food science**, v. 18, n. 1, p. 30, 2013.

JIANG, Y. et al. Induction of cytotoxicity by chlorogenic acid in human oral tumor cell lines. **Phytomedicine**, v. 7, n. 6, p. 483-491, 2000.

JOSHI, J. G.; HANDLER, P. Biosynthesis of trigonelline. **Journal of biological Chemistry**, v. 235, p. 2981-2983, 1960.

JOMOVA, K. et al. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 345, n. 1-2, p. 91-104, 2010.

KAAKOUSH, N. O.; MORRIS, M. J. More Flavor for Flavonoid-Based Interventions? **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 4, p. 293-295, 2017.

KAMIYAMA, M. et al. Role of degradation products of chlorogenic acid in the antioxidant activity of roasted coffee. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 7, p. 1996-2005, 2015.

KASAI, H. et al. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in vitro and in rat carcinogenesis model. **Food Chemical Toxicology**, v. 38, n. 5, p. 467-471, 2000.

KIM, T. J.; SILVA, J. L.; JUNG, Y. S. Enhanced functional properties of tannic acid after thermal hydrolysis. **Food chemistry**, v. 126, n. 1, p. 116-120, 2011.

KING, A. M. Y.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KOSHIRO, Y. et al. Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* fruits. **Plant science**, v. 171, n. 2, p. 242-250, 2006.

KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LEME, P. H. M. V.; MACHADO, R. T. M. Os Pilares da Qualidade: o processo de implementação do Programa de Qualidade do Café (PQC). **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v. 12, n. 2, 2010.

LEONHARDT, M. **Estudo de agentes inibidores da reação de Maillard em leite condensado**. 2015. 37f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Química industrial). Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2015.

LIMA, A. R. et al. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 20-4, 2010.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 60, p. 1-4, 2013.

LIU, Y.; KITTS, D. D. Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. **Food Research International**, v. 44, n. 8, p. 2418-2424, 2011.

MACEDO, C. R. et al. Variabilidade genética em cultivares do ensaio nacional de Coffea arabica L. **IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. 24 a 26 de junho de 2015, Curitiba – PR, 2015.

MACEDO, É M. C. et al. Efeitos da deficiência de cobre, zinco e magnésio sobre o sistema imune de crianças com desnutrição grave. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, n. 3, p. 329-336, 2010.

MACEDO, F. M. et al. Determinação de compostos fenólicos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. pg. 1164-1165, 2008.

MACHADO, H. et al. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1/2, 2010.

MAFRA, L. A. S. **Indicação geográfica e construção do mercado: a valorização da origem no Cerrado Mineiro**. 2008. 127f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Agricultura e sociedade, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

MANGRICH, A. S. et al. Química verde no tratamento de águas: uso de coagulante derivado de tanino de *Acacia mearnsii*. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 2-15, 2013.

MAPA. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa**. nº8 de 11 de Junho de 2003.

MARCHINI, H. R. **Extração dos taninos da espécie *Pinus taeda* no município de Curitiba-SC e sua avaliação para aplicação industrial como adesivo modificado**. 2015. 117f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2015.

MARIA, C. A.; MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C. Componentes voláteis do café torrado. Parte I: compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v. 22, p. 209-217, 1999.

MARQUES B. **Regiões produtoras de café no Brasil**. 2004. Revista Cafeicultura. Disponível em: <<http://revistacafeicultura.com.br/?mat=3348>>. Acesso em: 22 set. 2017.

MARTINS, G. R.; SILVA, R. M. G. Reprodução sexuada, morte e antioxidantes. **Aprendendo Ciência**, v. 4, n. 1, p. 58-62, 2015.

MARTINS, S. I.F.S.; JONGEN, W. M.F.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 9, p. 364-373, 2000.

MARULLO, R. et al. Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e81162, 2013.

MATIELLO, J.B. et al. **Cultura de Café no Brasil: Novo manual de recomendações**. 2^o edição, revisada, ampliada e ilustrada. Embrapa Rondônia, 2005.

MATOS, A. T. de; MAGALHÃES, M. A.; FUKUNAGA, D. C. Remoção de sólidos em suspensão na água residuária da despolpa de frutos do cafeeiro em filtros constituídos por pergaminho de grãos de café submetido a compressões. **Engenharia Agrícola**, v. 26, n. 2, p. 610-616, 2006.

MESQUITA JÚNIOR, Danilo et al. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

MEUNIER, I. M. J.; FERREIRA, R. Luiz C. Uso de espécies produtoras de taninos para curtimento de peles no Nordeste do Brasil. **Biodiversidade**, v. 14, n. 1, p. 98-104, 2015.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C.. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química nova**, v. 28, n. 4, p. 637, 2005.

MORAIS, S. A. M. et al. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 198-207, 2008.

MOREIRA, I. et al. Solvent effects on extraction of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline in *Coffea arabica*. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 39-43, 2014.

MOREIRA, M. E. C. **Avaliação do potencial farmacológico de café (*Coffea arabica* L.) verde e torrado**. 2013. 113f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-

Graduação em Ciências dos alimentos. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado. Parte II: compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química nova**, v. 23, n. 2, p. 195-203, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURA, A. P. G. et al. **Avaliação da atividade antitumoral e toxicológica do óleo essencial dos frutos de St. Hil. & Tul (ANNONACEAE)**. 2012. 117f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos. Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa 2012.

NAIDU, M. M. et al. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 377-384, 2008.

NAKAMURA, Y.; TSUJI, S.; TONOGAI, Y. Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological samples: application to tannic acid metabolism in the rat. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 1, p. 331-339, 2003.

NAKAZONE, D.; SAES, M. S. M. O agronegócio café do Brasil no mercado internacional. *Revista FAE Business*, n. 9, p. 40-42, 2004.

NASCIMENTO, P. M. **Estudo da composição química, atividade antioxidante e potencial odorífico de um café conillon, em diferentes graus de torrefação e análise comparativa com café arábica**. 2006. 90f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NICOLI, M. C. et al. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. **LWT-Food science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 292-297, 1997.

NOGUEIRA, M.; TRUGO, L. C. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 23, n. 2, p. 296-299, 2003.

NOZELLA, E. F. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. 2001. 167f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de energia nuclear na Agricultura. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592-603, 2004.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, E. M. S. **Consumo de café e restrição alimentar na modulação da hepatocarcinogênese química**. 2012. 101f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

OLIVEIRA, E. M. S. **Efeito modulador do café sobre a Carcinogênese hepática Induzida em ratos**. 2007, 65f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências dos alimentos - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2007.

OLIVEIRA, T. T. et al. Flavonoides e aterosclerose. **Revista brasileira de análises clínicas**, vol. 42(1): 49-54, 2010.

OU, B. et al. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, 2002.

PAIVA, E. F. F. **Análise sensorial dos cafés especiais do Estado de Minas Gerais**. 2005. 55f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

PANSERA, M. R. et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista brasileira farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 17-22, 2003.

PARI, L.; KARTHIKESAN, K.; MENON, V. P. Comparative and combined effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin on antioxidant disparities in chemical induced experimental diabetes. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 341, n. 1-2, p. 109-117, 2010.

PARREIRA, C. R. **Qualidade comercial do café e efeitos sobre parâmetros bioquímicos, físicos e antropométricos de indivíduos adultos**. 2009. 181f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

PASTORE-JÚNIOR, F. **Tratamento do látex de borracha natural com tanino vegetal**. 2017. 162f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica. Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2017.

PEREIRA, B. A. **Adição de ácido clorogênico e cafeína ao sêmen suíno resfriado**. 2014. 106f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

PEREIRA, L. L. et al. Validação de um instrumento para estudo dos diversos métodos e formas de produção de cafés especiais na região serrana do Espírito Santo: um estudo preliminar. **IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Curitiba, 2015.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PERES, P. M.; KOURY, Josely Correa. Zinco, imunidade, nutrição e exercício. **CERES: Nutrição & Saúde**, v. 1, n. 1, p. 9-18, 2011.

PERUZZI, M. F. et al. Avaliação da Atividade Antioxidante pela Inibição da Peroxidação Lipídica e Quelação de Íon Ferro de Extratos Metanólicos de *Azadirachta indica* (NEEM). **Blucher Biochemistry Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 17-19, 2015.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PITA, J. C. L. R. **Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do trachylobano-360 de *Xilopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae)**. 2010. 103f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba, 2010.

PYRZYNSKA, K.; PEKAL, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. **Analytical Methods**, v. 5, n. 17, p. 4288-4295, 2013.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v. 26, n. 4, p. 493-497, 2002.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European journal of pharmacology**, v. 533, n. 1, p. 222-239, 2006.

REINATO, C. H. R. et al. Consumo de energia e custo de secagem de café cereja em propriedades agrícolas do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 6, n. 01, p. 112-116, 2002.

REZENDE, F. M. et al. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **Laboratório de Ensino de Botânica**, p. 93, 2016.

REZENDE, M. A.; ROSADO, P. L.; GOMES, M. F. M. **Café para todos: a informação na construção de um comércio de café mais justo**. SEGRAC, Belo Horizonte, 2007.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROSSETTI, R. P. **Determinação de fenóis totais em frutos do café: avaliações em diferentes fases de maturação**. 2007. 72f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

RUFINO, M. S. M. et al. Comunicado técnico–metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Fortaleza: Embrapa**, 2007a.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁰⁺. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007b.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2006.

SANTOS, M. A.; CHALFOUN, S. M.; PIMENTA, C. J. Influência do processamento por via úmida e tipos de secagem sobre a composição, físico-química e química do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 213-218, 2009.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P.; Taninos. 6° ed. In: SIMÕES, C. M. O.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora UFSC. 2007.

SANTOS, V. E. et al. Análise do setor de produção e processamento de café em Minas Gerais: uma abordagem matriz insumo-produto. **Revista de Economia e Sociologia Rural**. vol.47, n.2, p.363-388, 2009.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1, p. 21-40, 2001.

SCHOLZ, M. B. S. et al. Características físico-químicas de grãos verdes e torrados de cultivares de café (*Coffea arabica* L.) do IAPAR. **Coffee Science**, v. 6, n. 3, p. 245-255, 2011.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**. vol.12, n.1, p.21-32, 1999.

SEBRAE. Café gourmet e orgânico. Estudo de mercado SEBRAE/ESPM, 2008. Disponível em: <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHO NUS/bds/bds.nsf/4D358BA49DC5ACFD832574DC004C0045DEB4/\\$File/NT00039066.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHO NUS/bds/bds.nsf/4D358BA49DC5ACFD832574DC004C0045DEB4/$File/NT00039066.pdf)> Acesso em: 10 out. 2017.

SERAFIN, C. et al. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 578-582, 2007.

SERBAI, D.; OTTO, S. M.; NOVELLO, D. Efeito de diferentes tipos de edulcorantes na aceitabilidade sensorial de café (*Coffea arabica* L.). **Revista Uniabeu**, v. 7, n. 17, p. 1-13, 2014.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v.11, n.39, p.3733-3740, 2016.

SILVA, J. S. et al. **Preparo secagem e armazenagem**. Disponível em: <<ftp://ftp.ufv.br/dea/poscolheita/LIVRO%20SECAGEM%20E%20ARMAZENAGEM%20DE%20CAFE/capitulo1.pdf>>. Acesso em: 08 out. 2017.

SILVA, L. C. da; MORELI, A. P.; JOAQUIM, T. N. M. **Café: beneficiamento e industrialização**. Embrapa – Rondônia, 2015. Disponível em: <http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/Cafe_na_AmazoniaLUISSILVA_2.pdf>. Acesso em: 03 out. 2016.

SILVA, L. R et al. Flavonoides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica argentina**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

SILVA, V. A. **Influência dos grãos defeituosos na qualidade do café orgânico**. 2005. 120f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 227-36, 2004.

SIMÕES, R. O.; FARONI, L. R. D.; QUEIROZ, D. M. Qualidade dos grãos de café (*Coffea arabica* L.) em coco processados por via seca. **Revista Caatinga**, v. 21, n. 2, p. 139-146, 2008.

SOARES, S.; MATEUS, N.; FREITAS, V. Carbohydrates inhibit salivary proteins precipitation by condensed tannins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 15, p. 3966-3972, 2012.

STELMACH, E.; POHL, P.; MADEJA, A. S. The content of Ca, Cu, Fe, Mg and Mn and antioxidant activity of green coffee brews. **Food chemistry**, v. 182, p. 302-308, 2015.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

TANG, S. Z. et al. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems. **Food Chemistry**, v. 76, n. 1, p. 45-51, 2002.

THOMAZIELLO, R. A. **Classificação do café**. Revista cafeicultura, 2014. Disponível em: <http://revistacafeicultura.com.br/?mat=55115>. Acesso em: 08 out. 2017.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado) em Ciências. Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, Vol. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VASCONCELOS, T. B. et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2014.

VARGAS, A. G. de et al. **Influência da sazonalidade na composição química e nas atividades antioxidante e antimicrobiana das folhas de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller)**. 2017. 80f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologias de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2017.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 863-868, 2011.

VIGNOLI, J. A. et al. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food research international**, v. 61, p. 279-285, 2013.

WANG, Y.; HO, C. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8109-8114, 2009.

WEI, F. et al. Chemical changes in the components of coffee beans during roasting. In: **Coffee in health and disease prevention**. 2014. p. 83-91.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature chemical biology**, v. 4, n. 5, p. 278-286, 2008.

XIAO, Z. P. et al. Flavonoids health benefits and their molecular mechanism. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 2, p. 169-177, 2011.

ZENGIN, G. et al. *Sideritis galatica* Bornm: a source of multifunctional agents for the management of oxidative damage, Alzheimer's and diabetes mellitus. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 538-547, 2014.

ZHOU, J.; CHAN, S.; ZHOU, S. Experimental diabetes treated with trigonelline: effect on β cell and pancreatic oxidative parameters. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 279-287, 2012.

APÊNDICES

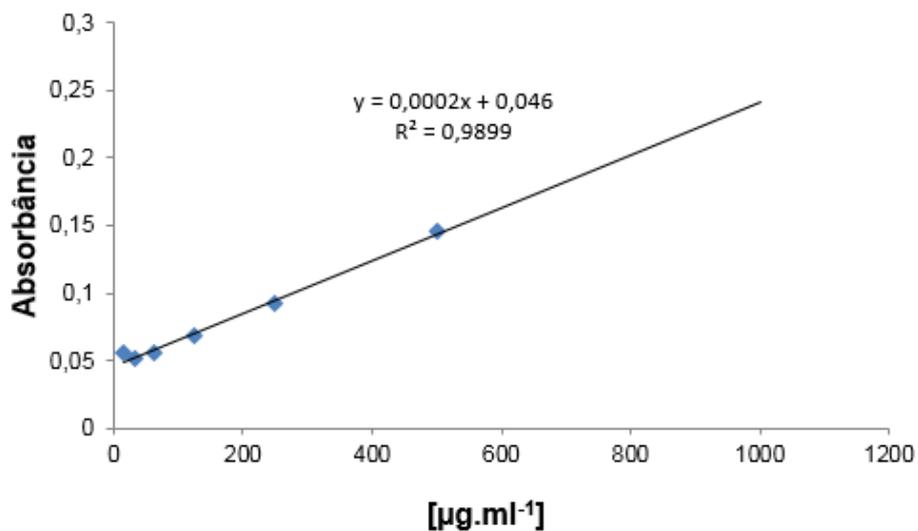
APÊNDICE A**Formulário de voluntariado para doação de sangue**

Eu _____, _____ anos de idade, declaro que autorizei à utilização do meu sangue em experimento para avaliação de citotoxicidade de amostras de café arábica. Declaro ainda, ser saudável, não fumante, não portador de doença crônica e que não fiz a utilização de entorpecentes e/ou bebida alcoólica nos últimos 30 dias. Também não realizei nenhum procedimento radiográfico e não fiz a utilização de antibióticos nos últimos seis meses.

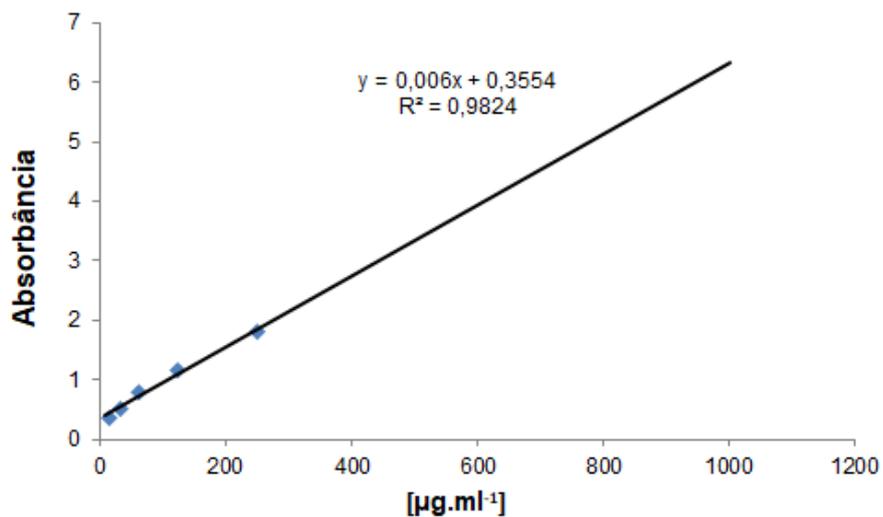
Assinatura

APÊNDICE B

Curva de calibração dos padrões utilizados para cálculo dos teores totais de Taninos e Flavonoides



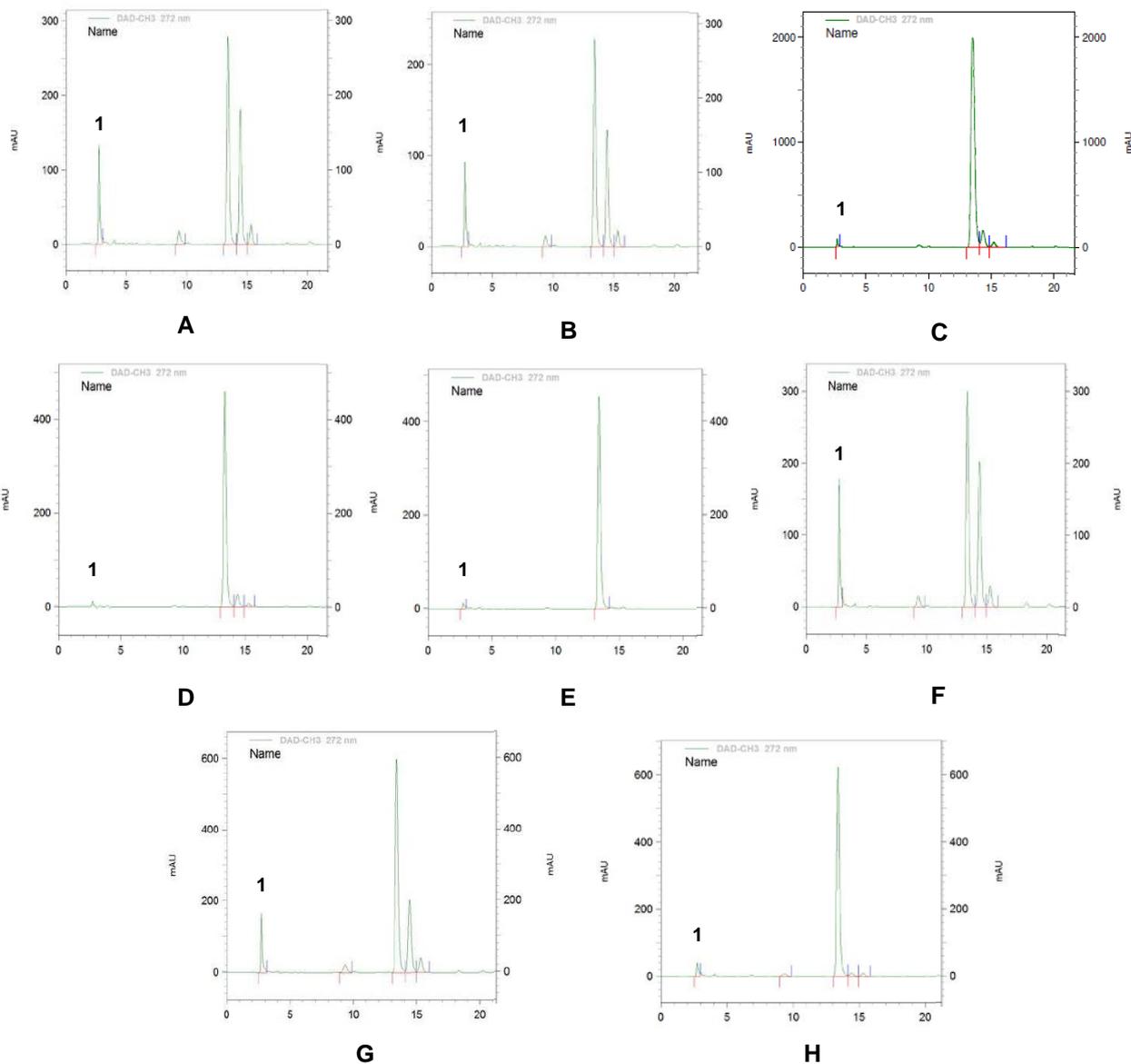
Curva de calibração do padrão ácido tânico à 725nm.



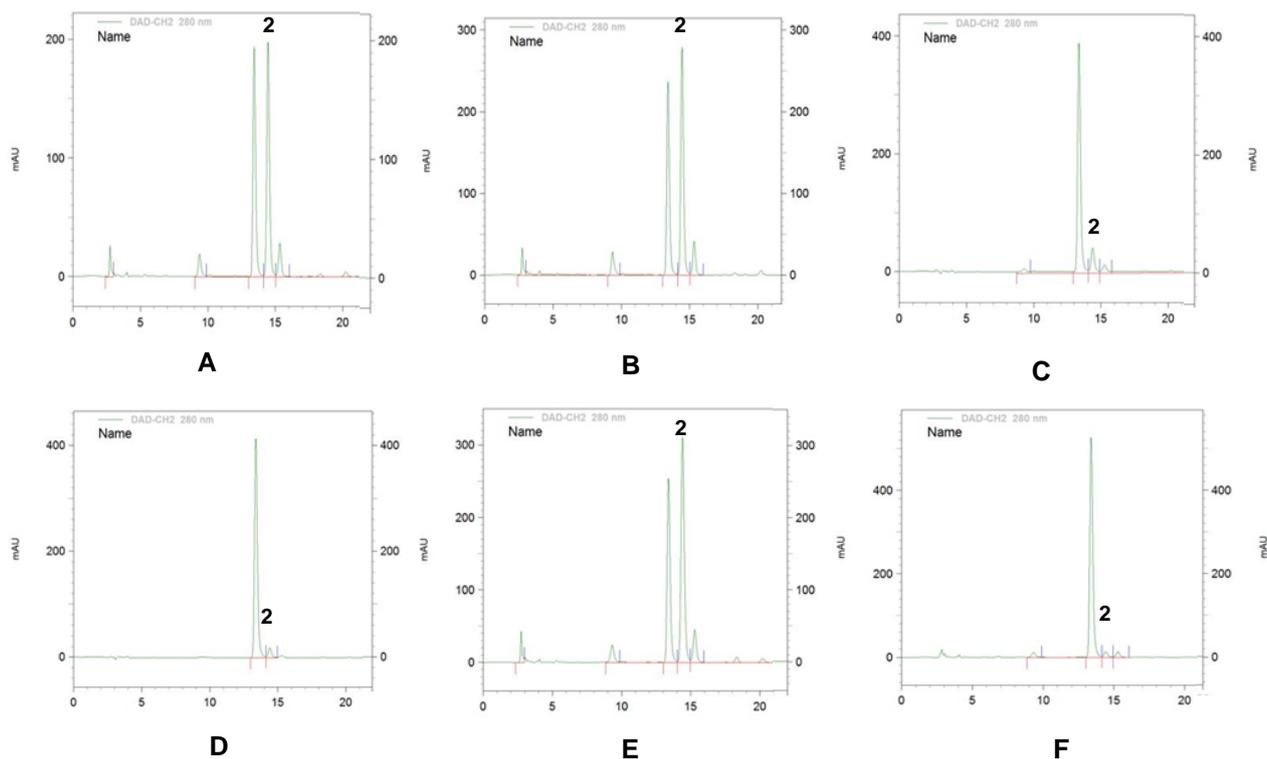
Curva de calibração do padrão Rutina à 420nm.

APÊNDICE C

Cromatogramas das amostras de café com a presença do composto trigonelina e ácido clorogênico



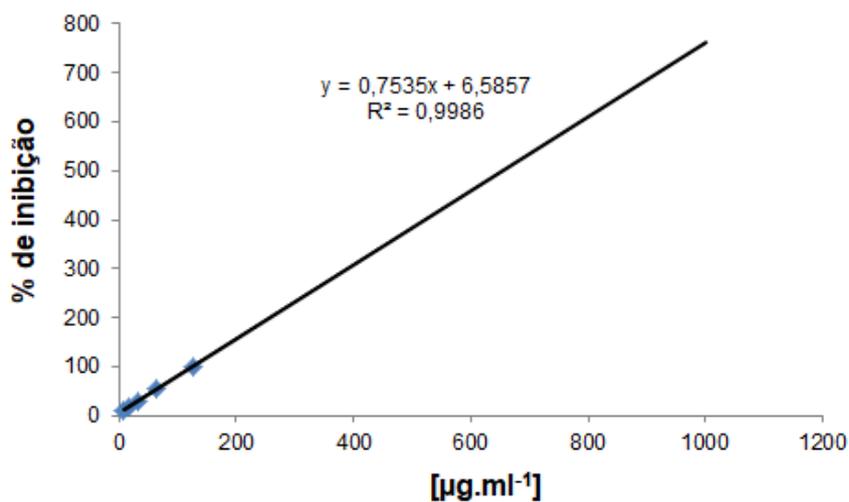
Cromatograma (CLAE), a 272 nm, do extrato etanólico de duas cultivares do Café arábica em diferentes níveis de processamento: Grupamento 1: Catuaí vermelho IAC 99 cereja imaturo (A), Catuaí vermelho IAC 99 cereja maturo (B), Catuaí vermelho IAC 99 seco e pilado (C), Catuaí vermelho IAC 99 torra 1 (D), Catuaí vermelho IAC 99 torra 2 (E); Grupamento 3: aatucá amarelo 2SL cereja imaturo (F), Catucá amarelo 2SL Seco e Pilado (G), Catucá amarelo 2SL Torra 1 (H)
¹Indica presença de Trigonelina na amostra com tempo de retenção aproximado de 2,74 minutos.



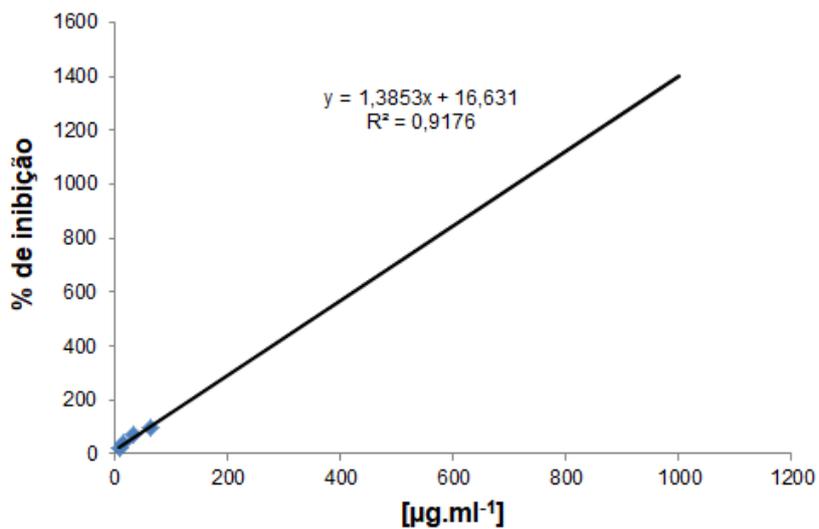
Cromatograma (CLAE), a 280 nm, do extrato etanólico de duas cultivares do Café arábica em diferentes níveis de processamento: Grupamento 1: Catuaí vermelho IAC 99 cereja imaturo (A), Catuaí vermelho IAC 99 cereja maturo (B), Catuaí vermelho IAC 99 seco e pilado (C); Grupamento 2: Catuaí Vermelho IAC 99 Bóia seco e pilado (D); Grupamento 3: Catucaí amarelo 2SL Cereja imaturo (E), Catucaí amarelo 2SL torra 1 (F). ²Indica presença de ácido clorogênico na amostra com tempo de retenção aproximado de 14,36 minutos.

APÊNDICE D

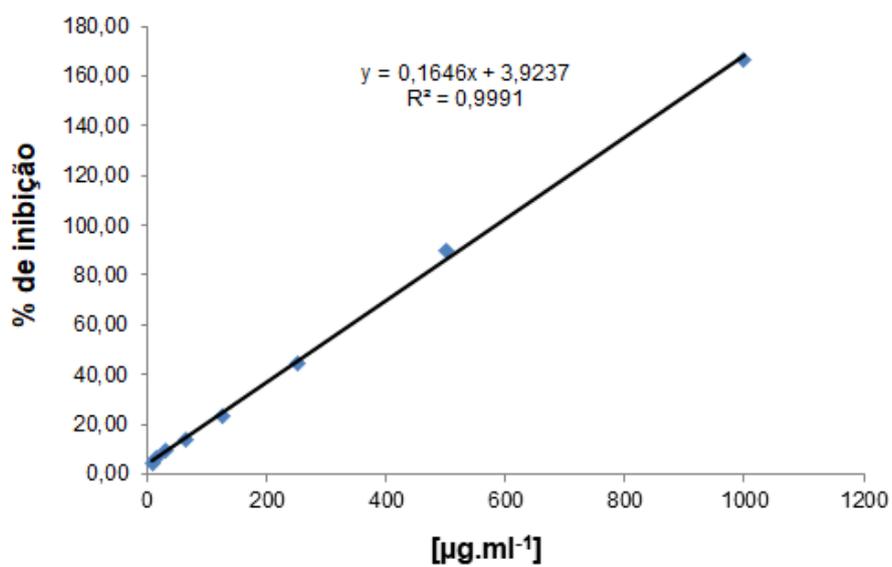
Curva de calibração dos padrões utilizados para comparação de atividade antioxidante



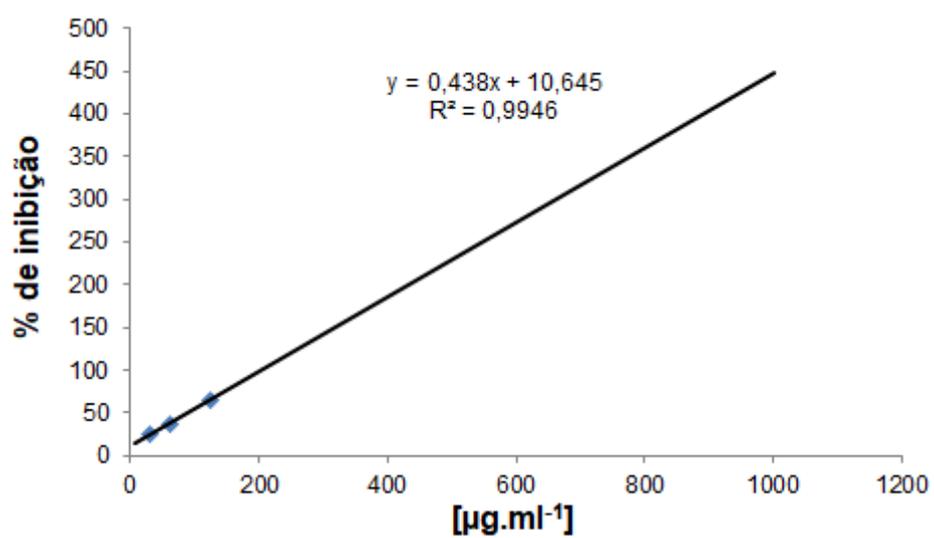
Curva padrão do TROLOX para o teste antioxidante ABTS a 734 nm.



Curva padrão do Ácido ascórbico para o teste antioxidante DPPH a 517 nm.



Curva padrão do FeSO_4 para o teste antioxidante FRAP a 595 nm



Curva padrão do EDTA para o teste antioxidante de Atividade quelante do Fe^{2+} a 562 nm.

ANEXOS

ANEXO A

Certificado de aprovação emitido pelo Comitê de Ética Humano da Universidade Federal do Espírito Santo

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do potencial mutagênico, antimutagênico e citotóxico de plantas medicinais utilizadas pela população capixaba em linfócitos humanos in vitro.
Pesquisador Responsável: Maria do Carmo Pimentel Battuoci
Área Temática: Genética Humana:
 (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.)

Versão: 2
CAAE: 71093016.8.0000.5542
Submetido em: 05/09/2017
Instituição Proponente: Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio



Comprovante de Recepção: PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_553693

- DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

- ↳ Versão em Tramitação (E1) - Versão 3
 - ↳ Emenda (E1) - Versão 3
 - ↳ Documentos do Projeto
 - ↳ Comprovante de Recepção - Submissão
 - ↳ Folha de Rosto - Submissão 1
 - ↳ Outros - Submissão 1
 - ↳ Projeto Detalhado / Brochura Investigad
 - ↳ TCLE / Termos de Assentimento / Justifi
- ↳ Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 2
 - ↳ Projeto Completo

Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações

- LISTA DE APECIAÇÕES DO PROJETO

Apreciação *	Pesquisador Responsável *	Versão *	Submissão *	Modificação *	Situação *	Exclusiva do Centro Coord. *	Ações
E1	Maria do Carmo Pimentel Battuoci	3			Em Edição		
PO	Maria do Carmo Pimentel Battuoci	2	05/09/2017	17/10/2017	Aprovado	Não	

ANEXO B

**Certificado de aprovação emitido pelo Comitê de Ética no uso de Animais da
Universidade Federal do Espírito Santo**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização Fisiológica, Fitoquímica e de Atividades Biológicas de Plantas Medicinais com Potencial Econômico para Produção de Fitoterápicos", Protocolo nº.89/2015, sob a responsabilidade de Maria do Carmo Pimentel Batifucci que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de pesquisa científica(ou ensino)encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal(CONCEA),e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS(CEUA) DO(A) Centro de Ciências da Saúde-Maruípe-Vitória-ES em 04-03-2016

Vigência do Projeto	Início: Abril/2016 Término:Fevereiro/2019
Espécie/Linhagem	Camundongos Swiss(Mus musculus)
Nº de Animais	Experimento Piloto:20 Protocolo Experimental:256 Total:276
Peso/Idade	Peso: 30-40g Idade:6-8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Mamíferos

Vitória (ES), 04 de março de 2016.