UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

NAILA ALBERTINA DE OLIVEIRA

**Análise da concentração de compostos bioativos e avaliação da toxicidade aguda
in vivo dos diterpenos cafestol e caveol presentes no óleo de grãos de café verdes
obtidos por extração supercrítica e por extração com fluido pressurizado**

NAILA ALBERTINA DE OLIVEIRA

**Análise da concentração de compostos bioativos e avaliação da toxicidade aguda
in vivo dos diterpenos cafestol e caveol presentes no óleo de grãos de café verdes
obtidos por extração supercrítica e por extração com fluido pressurizado**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Lopes de Oliveira.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

048a

Oliveira, Naila Albertina de

Análise da concentração de compostos bioativos e avaliação da toxicidade aguda *in vitro* dos diterpenos cafestol e caveol presentes no óleo de grãos de café verdes obtidos por extração supercrítica e por extração com fluido pressurizado / Naila Albertina de oliveira. - Pirassununga, 2015.

111 f.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.

Departamento de Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira.

1. Extração supercrítica 3.Extração Líquido pressurizado 4. Óleo de café verde 5. Toxicidade 6.Ratos. I. Título.

”PARA DEUS NADA É IMPOSSÍVEL”

A Deus por me proporcionar forças suficientes para desenvolver este trabalho.
A minha mãe Maria de Lourdes de Oliveira que sempre esteve ao meu lado, com
muito amor, Paciência... Paciência... amor!
Aos meus pais(Delcino e Maria)

Mamãe

(Toquinho)

Ela é a dona de tudo,

Ela é a rainha do lar, ela vale mais para mim, Que o céu, que a terra, que o
mar!

Ela é a palavra mais linda, que um dia o poeta escreveu ela é o tesouro que
o pobre das mãos do Senhor recebeu.

Mamãe, mamãe, mamãe,

Tu és a razão dos meus dias tu és feita de amor e de esperança, Ai, ai, ai,
mamãe, eu cresci, o caminho perdi, volto a ti e me sinto criança

Mamãe, mamãe, mamãe,

Eu te lembro o chinelo na mão, o avental todo sujo de ovo se eu pudesse eu
queria, outra vez, mamãe começar tudo, tudo de novo!

AGRADECIMENTOS

A professora Alessandra Lopes de Oliveira, por me receber prontamente quando a procurei, por ter paciência e sabedoria durante todas as etapas da minha iniciação na ciência e por acreditar em mim e no meu trabalho.

MUITO OBRIGADA HOJE, AMANHÃ E SEMPRE!

Ao professor Heidge Fukumasu, que colaborou, orientou e mostrou o “caminho das pedras” da experimentação animal.

A professora Silvana Lima Górnaiak pela oportunidade de realizar os meus experimentos no CEPTOX.

Aos professores do departamento de Engenharia de Alimentos, por terem me ajudado sempre que precisei, me aconselhando, me orientando.

A Vanessa Rodrigues bibliotecária da FZEA e a toda a equipe da biblioteca que me proporcionaram o suporte necessário para a formatação deste trabalho, muito obrigada especialmente a você Vanessa!!!!

A minha amiga Thaisa Sandini Meira, que esteve ao meu lado me ensinando, me orientado, me ouvindo, me aconselhando... Realmente não tenho palavras pra agradecer! Nem mesmo um texto todo representa a importância sua na minha vida na Pós-graduação. MUITO OBRIGADA THÁ!

“A Débora Nascimento Santos, que sempre esteve presente nas horas de alegria, tristeza, trabalho, conselhos, ‘ouvido terapia”. MUITO OBRIGADA por estar presente nas horas necessárias onde tudo parecia desabar você sempre trazia a luz!

As pessoas mais especiais que apareceram no final desta caminhada: Frederico, Thiago, Patrícia e Beatrice.

Ao Nilson José Ferreira por me ensinar muito e por colaborar na realização do meu trabalho.

Aos meus amigos e colegas de Laboratório de Alta Pressão e Produtos Naturais, Larissa, Tatiane, Vitor, Heber, Fernando, Luiza, Débora e Paola.

A todos os funcionários do CEPTOX (Baladore, Marcus, Estevam) pela ajuda e pela convivência, e em especial à Elaine, que me mostrou o quanto o carinho e a humanização na experimentação animal são essenciais para a condução de estudos com animais de laboratório.

Ao casal mais querido do CEPTOX, Ester Raspantini e Paulo Cesar Raspantini, muito obrigado por contribuírem, me ajudarem sempre que precisei.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) (Processo FAPESP Nº 2013/03371-0) pela concessão da bolsa de estudos e reserva técnica.

RESUMO

OLIVEIRA, N. A. **Análise da concentração de compostos bioativos e avaliação da toxicidade aguda in vivo dos diterpenos cafestol e caveol presentes no óleo de grãos de café verdes obtidos por extração supercrítica e por extração com fluido pressurizado.** 2015. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Este estudo visou à utilização da tecnologia que emprega CO₂ em estado supercrítico (SFE) para estudar a bioatividade dos diterpenos presentes no óleo de café verde, cafestol (C) e caveol (K), contudo propondo também a otimização de extração com líquido pressurizado (PLE) em batelada, utilizando para isto um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR²). O referido tema tem caráter inovador e inédito, já que a tecnologia de extração com líquido pressurizado, até então empregada para extração de analitos, passa a ser estudada em processos de extração de óleos vegetais tais como, óleo de pequi, óleo de café verde, extrato de sementes de pitanga no LTAPPN. Esta técnica utiliza solventes orgânicos e emprega elevada temperatura de extração, o que aumenta a capacidade de solubilização do solvente, e o emprego de altas pressões que acelera a difusão nos poros da matriz já que a viscosidade do solvente é diminuída. Este comportamento ocasiona maior penetração do solvente na matriz, aumentando sua capacidade de extração. A extração supercrítica (SFE) é uma tecnologia limpa, pois não emprega solventes orgânicos sendo promissora na obtenção de extratos enriquecidos com compostos bioativos que possam desempenhar alguma atividade. O estudo da atividade aguda dos diterpenos presentes no óleo de grãos de café verdes obtidos via SFE e PLE demonstrou que o óleo extraído com CO₂ supercrítico, na dose de 2.000 mg/Kg no estudo de toxicidade aguda e nas doses de 25, 50 e 75 mg/Kg no estudo de toxicidade de doses repetidas, não apresentou letalidade aos animais, porém parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos, apresentaram alterações. Todavia para aplicações do óleo de café verde em produtos desenvolvidos pelas indústrias farmacêuticas, alimentícias e/ou cosméticas, mais estudos de avaliação dos efeitos do óleo de café verde *in vivo* são necessários. Igualmente, o estudo de inovação tecnológica para obtenção de óleo de café verde visa obter extratos enriquecidos em diterpenos, evitando a degradação e tornando-os mais estáveis. Os resultados obtidos indicam que o óleo dos grãos de café verde extraídos via SFE e PLE (em batelada) possuem altas concentrações dos compostos ativos cafestol e caveol, sendo a condição de melhor rendimento a condição 4 (70° C e 8 min.) a de maior rendimento de óleo 9,78%

Palavras-chave: extração supercrítica; extração líquido pressurizado; óleo de café verde; toxicidade; ratos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, N. A. **Concentration of bioactive compounds analysis and evaluation of acute toxicity in vivo of the diterpenes cafestol and kahweol from green beans coffee oil obtained by supercritical and pressurized fluid extractions.** 2015. 111 f. M. Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

This study aimed to evaluate the bioactivity of the diterpenes in green coffee oil, cafestol (C), and kahweol (K) using supercritical fluid extraction (SFE- CO₂), and to optimize the extraction with pressurized liquid extraction (PLE) in batch by using a rotatable central composite design (RCCD²). This issue has innovative and novel character, since the pressurized liquid extraction technology available until now for analyte extraction has been studied in vegetable oil extraction processes such as Pequi oil, green coffee oil, and Pitanga seeds extracts, at LTAPPN. This technique uses organic solvents and high extraction temperature, which increases the solvent solubilization capacity. The use of high pressure accelerates the diffusion rates into the pores of the matrix, due to the lower solvent viscosity. This behavior provides greater penetration of the solvent into the matrix, increasing solvent extraction capacity. The supercritical fluid extraction (SFE) is a clean technology as it does not employ organic solvents, besides being a promising alternative to obtain extracts enriched with bioactive compounds. The results of the acute activity of diterpenes in green coffee oil extracted by SFE and PLE showed that although no lethality was observed in the animals using the oil extracted by SFE at a dose of 2,000 mg / kg in an acute toxicity study, and 25, 50, and 75 mg / kg in a repeated dose toxicity study, changes were observed in biochemical, hematological, and histological parameters. However, more *in vivo* studies about the effects of green coffee oil are required for pharmaceutical, food, and cosmetic applications. Similarly, the technological innovation to obtain the green coffee oil aims at obtaining extracts enriched in diterpenes, preventing degradation and increasing stability. The results indicate that green coffee oil extracted by SFE and PLE (in batch) have high concentrations of the active compounds cafestol and kahweol, and the best extraction condition was the trial 4 (70 ° C, and 8 min), and the highest oil yield was 9.78%

Keywords: supercritical extraction; pressurized liquid extraction; green coffee oil; toxicity; rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diterpenos do café.....	24
Figura 2 - Diagrama de fases pressão-temperatura de uma substância	28
Figura 3 - Grãos de café verde inteiro (A) grãos triturados (B)	37
Figura 4 - Jogo de peneiras da série padrão Tyler e grãos de café verde triturados	38
Figura 5 – Empacotamento do leito fixo do extrator que opera com CO ₂ supercrítico	39
Figura 6 - Sistema de extração com CO ₂ supercrítico do LTAPPN, FZEA/USP	40
Figura 7 - (A): extrator PLE, ASE® 150, Dionex vista interna onde o extrator é acoplado. (B) extrator PLE fechado. (C) ducto acoplado com o frasco coletor de extrato	41
Figura 8 - Diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis T e tE no rendimento do extrato de grãos de café verde obtidos por PLE.	53
Figura 9 - Superfície de resposta gerada pelo modelo de primeira ordem que mostra a influência das variáveis de processo (T e tE) no rendimento dos extratos de grãos de café verde obtidos por PLE	54
Figura 10 - Diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis T e tE no índice de acidez do extrato de grãos de café verde obtidos por PLE	55
Figura 11 - Curvas dos padrões de cafestol e caveol que correlacionam a concentração com a área do pico correspondente utilizadas na quantificação dos diterpenos cafestol e caveol do óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico (SFE) e com líquido pressurizado (PLE).....	57
Figura 12 - (A) Cromatograma do extrato de café verde obtido via PLE (ensaio 4) e (B) Cromatograma do óleo obtido via SFE com os picos de caveol e cafestol em destaque	58
Figura 13 - Diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis T e tE no rendimento dos diterpenos cafestol (g/kg de óleo de café verde) (A) e caveol (g/kg de óleo de café verde) (B) obtidos por PLE.	60

Figura 14 – Consumo de ração das ratas fêmeas-14 dias – Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)	62
Figura 15- Variação de peso das ratas fêmeas-14 dias – Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)	63
Figura 16- Peso relativo dos órgãos (em g – peso do órgão / peso corpóreo x 100) das ratas fêmeas-14 dias – Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)	65
Figura 17 - Bioquímica Sérica das ratas fêmeas-14 dias – fosfatase alcalina, GGT, AST, ALT e LDH - Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).	66
Figura 18 - Bioquímica Sérica das ratas fêmeas-14 dias – albumina, globulina, glicose, triglicerídeos e proteína total - Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).	67
Figura 19 - Bioquímica Sérica das ratas fêmeas-14 dias – colesterol total, colesterol HDL, uréia e creatinina - Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).	68
Figura 20 – Parâmetros Hematológicos das ratas fêmeas-14 dias – Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)	69
Figura 21– Consumo de ração das ratas fêmeas-14 dias – Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com fluido pressurizado – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)	70
Figura 22– Variação de peso das ratas fêmeas-14 dias – Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com líquido pressurizado – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)	71
Figura 23 - Peso relativo dos órgãos (em g – peso do órgão / peso corpóreo x 100) das ratas fêmeas-14 dias-Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com líquido pressurizado – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão) ...	72

Figura 24- Parâmetros Bioquímicos das ratas fêmeas-14 dias - fosfatase alcalina, GGT, AST, ALT e proteína total – Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com líquido pressurizado – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão). ...	73
Figura 25- Parâmetros Bioquímicos das ratas fêmeas-14 dias - albumina, glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL– Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com líquido pressurizado – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).....	74
Figura 26- Parâmetros Bioquímicos das ratas fêmeas-14 dias - uréia e creatinina– Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com líquido pressurizado – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)	75
Figura 27- Parâmetros Hematológicos das ratas fêmeas - 14 dias - Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com líquido pressurizado. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).	766
Figura 28 – Consumo de ração dos ratos - 28 dias – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)	78
Figura 29 - Variação de peso dos ratos - 28 dias – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)	79
Figura 30- Gráficos do peso relativo dos órgãos-alvo - coração, baço, pulmão e timo (em g – peso do órgão / peso corpóreo x 100) dos ratos - 28 dias – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).....	80
Figura 31- Gráficos dos pesos relativo e absoluto dos órgãos-alvo fígado e rins (em g – peso do órgão / peso corpóreo x 100) dos ratos - 28 dias – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).....	822
Figura 32- Parâmetros Bioquímicos dos ratos - 28 dias – Toxicidade doses repetidas- GGT, fosfatase alcalina e LDH (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).....	85

Figura 33- Parâmetros Bioquímicos dos ratos - 28 dias - albumina, glicose e triglicerídeos – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).....	88
Figura 34- Parâmetros Bioquímicos dos ratos - 28 dias - uréia – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).....	89
Figura 35- Parâmetros Bioquímicos dos ratos - 28 dias, AST, ALT e globulina – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).....	90
Figura 36- Parâmetros Bioquímicos dos ratos - 28 dias - colesterol total, HDL, proteína total e creatinina – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).	91
Figura 37- Parâmetros Hematológicos dos ratos - 28 dias – plaquetas, leucócitos, hemoglobina e hematócrito - Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).....	92
Figura 38- Parâmetros Hematológicos dos ratos - 28 dias – eritrócitos, VCM, hemoglobina corpuscular média, volume corpuscular médio - Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).	933
Figura 39- Histologia do Baço dos animais tratados versus animais controle (A) Baço do tratamento de 75 mg/kg, (B) Baço do animal controle (coloração HE (hematoxilina e eosina) aumento de 100 x.....	96
Figura 40- Histologia do pulmão dos animais dos animais tratados versus animais controle (A) Pulmão do tratamento de 75 mg/kg (coloração HE (hematoxilina e eosina) aumento de 40x	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis dos dois fatores (T e tE) do DCCR no estudo da otimização do rendimento do extrato de grãos de café verde obtidos via PLE ricos em diterpenos ...	41
Tabela 2 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para duas variáveis (reais e codificadas) no estudo do efeito da Temperatura (T) e Tempo Estático (tE) na otimização da PLE	42
Tabela 3 - Massa de grãos de café verdes triturados retidos nas peneiras utilizados no cálculo do diâmetro médio das partículas.....	50
Tabela 4 – Densidade aparente da amostra de grãos de café verdes e triturados	51
Tabela 5 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) que mostra as variáveis (reais e codificadas) e sua influência na otimização do rendimento do extrato de grãos de café verde obtido via PLE e da concentração de diterpenos nestes extratos.	52
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para o rendimento do extrato de grãos de café verde via PLE	53
Tabela 7 - Coeficiente de regressão com base no QM quadrado médio residual para a resposta rendimento do extrato de grãos de café verde obtidos via PLE para um modelo de segunda ordem.....	54
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para o rendimento de cafestol do extrato de grãos de café verde via PLE	59
Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para o rendimento de caveol do extrato de grãos de café verde via PLE	59
Tabela 10 - Coeficiente de regressão com base no MS residual para a resposta rendimento do cafestol do extrato de grãos de café verde obtidos via PLE para um modelo de segunda ordem.....	61
Tabela 11 - Coeficiente de regressão com base no MS residual para a resposta rendimento do caveol do extrato de grãos de café verde obtidos via PLE para um modelo de segunda ordem.....	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AG	Ácido Gálico
Ar	Argônio
ASE	Extração com Solvente Acelerado
ASR	Análise de Superfície de Resposta
C	Cafestol
CLAE	Cromatografia Líquida da Alta Eficiência
CO₂	Dióxido de Carbono
cv.	Cultivar
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
E	Porosidade
EM	Espectro de Massa
Eq.AG	Equivalente em Ácido Gálico
EtOH	Etanol
FID	Detector de Ionização de Chamas
GC/MS	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas
GRAS	Geralmente Reconhecidos como Seguros
H₂	Hidrogênio
H₂O	Água
K	Caveol
KOH	Hidróxido de Potássio
MeOH	Metanol
MTBE	Terc Butil Metil Éter
N₂	Nitrogênio
NaCO₃	Carbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Potássio
OPA	Óleo de Prensagem Antigo
P	Pressão
PLE	Extração com Líquido Pressurizado
SCCO₂	Dióxido de Carbono Supercrítico
SFE	Extração com Fluido Supercrítico

T	Temperatura
tE	Tempo de Estático

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	<i>Tecnologias inovadoras na extração de óleo de café verde</i>	<i>19</i>
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	<i>Óleo de café verde</i>	<i>22</i>
2.2	<i>Extração SFE</i>	<i>26</i>
2.3	<i>Extração PLE</i>	<i>29</i>
2.4	<i>Toxicidade in vivo.....</i>	<i>31</i>
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	<i>Geral.....</i>	<i>36</i>
3.2	<i>Específicos</i>	<i>36</i>
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	<i>Caracterização física da matéria-prima</i>	<i>37</i>
4.2	<i>Densidade real e Densidade aparente.....</i>	<i>398</i>
4.3	<i>Extração do óleo de café verde com CO₂ supercrítico.....</i>	<i>3940</i>
4.4	<i>Extração com Líquido Pressurizado (PLE)</i>	<i>42</i>
4.5	<i>Separação da Cafeína dos Extratos obtidos por SFE</i>	<i>432</i>
4.6	<i>Caracterização do extrato</i>	<i>453</i>
4.6.1	<i>Preparo do óleo de café verde e quantificação dos diterpenos.....</i>	<i>45</i>
4.6.2	<i>Determinação do índice de acidez em ácido oleico</i>	<i>454</i>
4.7	<i>Avaliação da toxicidade in vivo dos diterpenos do óleo de grãos de café verde</i>	<i>455</i>
4.7.1	<i>Animais.....</i>	<i>45</i>
4.7.2	<i>Fármacos e Reagentes.....</i>	<i>455</i>
4.7.3	<i>Preparo dos extratos do óleo de café verde para análise in vivo</i>	<i>456</i>
4.7.4	<i>Toxicidade oral aguda.....</i>	<i>456</i>
4.7.5	<i>Toxicidade doses repetidas (28 dias) do óleo de café verde</i>	<i>457</i>
4.8	<i>Hemograma e Bioquímica</i>	<i>48</i>
4.9	<i>Avaliação do peso relativo dos órgãos, necropsia e análises histológicas.....</i>	<i>48</i>
4.9.1	<i>Análise estatística.....</i>	<i>459</i>

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 <i>Caracterização da matéria-prima.....</i>	50
5.2 <i>Otimização do processo de extração com líquido pressurizado (PLE).....</i>	51
5.2.1 Influência das variáveis de processo no rendimento do extrato.....	51
5.2.2 Influência das variáveis no índice de acidez em ácido oleico.....	55
5.2.3 Influência das variáveis na concentração de diterpenos nos extratos	56
5.3 <i>Avaliação in vivo da toxicidade do óleo de café verde</i>	62
5.3.1 Avaliação da toxicidade oral aguda com óleo de café verde extraído com CO ₂ supercrítico	62
5.3.2 Avaliação da toxicidade aguda do óleo de café verde extraído com líquido pressurizado....	70
5.3.3 Avaliação da Toxicidade de Doses Repetidas (durante 28 dias).....	77
5.3.4 Bioquímica e Hemograma (Toxicidade de doses repetidas)	77
5.3.5 Histologia	77
6 CONCLUSÕES	101
7 REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecnologias inovadoras na extração de óleo de café verde

A extração de produtos naturais, por exemplo, na indústria de perfumes, cosméticos, alimentos e fitoterápicos pode ser definida como uma tecnologia "limpa", quando solventes orgânicos e agressores ao ambiente deixam de ser empregados. A utilização de solventes orgânicos pode causar um impacto ambiental negativo em função do tipo e quantidade dos solventes utilizados. O impacto ambiental global de um ciclo de extração industrial, não é facilmente estimável, no entanto, sabe-se que os gastos energéticos são altos e os resíduos produzidos não são reciclados em todas as etapas dos processos (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012).

Os desafios lançados pela competitividade do mercado e pelo ambiente globalizado exigem inovações tecnológicas que rompam com o passado, principalmente no que se refere ao emprego de solventes orgânicos e à produção de resíduos que venham a causar impactos negativos ao ambiente e à saúde humana. Neste contexto, a técnica de extração com CO₂ supercrítico e extração com líquido pressurizado podem ser consideradas inovações tecnológicas por produzirem menos resíduos especificamente quando se trabalha com líquido pressurizado ou por propiciarem extratos livres de solventes orgânicos como a extração com CO₂ supercrítico, considerada como "tecnologia limpa". Ainda, o CO₂ pode ser reutilizado em processos industriais em larga escala. Os doze princípios da química verde foram rapidamente absorvidos como os doze princípios de Engenharia verde que formam a base dos modernos processos classificados como "sustentáveis". Dentre os princípios, os de maior relevância, consideram fatores tais como tratamento de resíduos produzidos, utilização de substâncias de baixa toxicidade para a saúde humana e meio ambiente, e uso de fontes renováveis de matéria prima (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012; WANG; WELLER, 2006).

A definição geral de química verde é a invenção, design e aplicação de produtos e processos para reduzir ou eliminar o uso de substâncias perigosas para o meio ambiente e para a saúde humana. A extração de produtos naturais com o uso de solventes seguros para a saúde (GRAS - Generally Recognized as Safe) pode ser definida como "extração verde". Extração verde classifica-se também por reduzir o consumo de energia, permitir a utilização de solventes alternativos e produtos naturais renováveis e assegurar a qualidade do extrato ou produto final (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012; CHIACCHIERINI et al., 2007).

A técnica de extração por prensagem atualmente é utilizada para produção de óleos vegetais tais como óleo de azeite de oliva e óleo de café verde. Sistemas mecânicos como os de prensagem são capazes de extrair entre 80 e 90% do óleo contido nos grãos, e por ser uma técnica de baixo custo em escala industrial pode ser considerada economicamente viável (CHIACCHIERINI et al., 2007). Como desvantagem, esta técnica emprega altas temperaturas que podem degradar compostos com atividades comprovadas.

Dos métodos de extração sólido-líquido mais amplamente usados na obtenção de extratos ricos em compostos bioativos existem os “tradicionais” e os “novos”. As técnicas tradicionais de extração sólido-líquido são essencialmente embasadas nos processos de difusão e osmose, incluindo extração Soxhlet, a qual ocorre sob ebulição e refluxo do solvente e, agitação ultrassônica. Os métodos mais modernos de extração têm sido a extração com fluido supercrítico (SFE), extração por líquido pressurizado (PFE) e extração assistida por microondas (MAE) (VANDENBURG et al., 1999). Os métodos tradicionais de extração são realizados à pressão atmosférica, já nos novos é possível alterar não só as condições de temperatura como também a pressão.

A extração supercrítica (SFE) é uma poderosa técnica que vem sendo utilizada nos processos de separação para obtenção de uma infinidade de produtos naturais em diversos segmentos da indústria e da pesquisa, com vários estudos tendo sido feitos visando novas aplicações industriais para essa tecnologia. SFE tem sido aplicada na produção industrial de café, chá e sementes de guaraná descafeinados (SALDANA; MOHAMED; MAZZAFERA, 2002), na extração de aromas, nicotina, óleos essenciais, ácidos graxos e na purificação de produtos farmacêuticos, o que demonstra o quanto essa tecnologia é promissora dentro desses segmentos (SUTTER; SILVA, CASSEL, 1994). A extração com CO₂ supercrítico atualmente tem sido utilizada para desenvolvimento de nano fármacos e compostos sintéticos utilizados como excipientes na indústria farmacêutica. Essa técnica de extração (SFE) contribui para a produção de nano fármacos para doenças tais como tuberculose, doenças infectocontagiosas oriundas de microrganismos multirresistentes e câncer (CAMPARDELLI; BALDINO; REVERCHON, 2015).

O café é uma mistura de muitas substâncias químicas como carboidratos, lipídios, vitaminas e compostos nitrogenados. Além destes, os principais componentes do café são a cafeína, os diterpenos cafestol e caveol, o ácido clorogênico e outros micronutrientes (HAMID; REHMAN; CHEN, 2014).

Os grãos de café verde contêm de 7 a 17 % de lipídeos e seu óleo é constituído basicamente de triacilgliceróis (75 %) e ácidos graxos livres em proporção similar aos óleos vegetais comuns (FERRARI et al., 2010). O óleo de café verde é amplamente

utilizado na indústria cosmética e possui aplicação farmacêutica, devido à alta concentração de triglicilgliceróis e ácidos graxos. Por conseguinte, o seu fracionamento pode gerar a obtenção de outros produtos de alto valor econômico, tais como esteróis, tocoferóis e diterpenos. O óleo de café verde também tem sido comercializado como matéria-prima para aplicações em cosméticos e fármacos, principalmente pela sua ação antioxidante (CHARTIER et al., 2013).

Atualmente, os diterpenos cafestol (C) e caveol (K) receberam maior atenção nas pesquisas, pois estudos demonstram que os ésteres palmitato do C e K e as suas três formas, atuam como antioxidantes e possuem propriedades anticarcinogênicas e de proteção contra a aflatoxina B1, que induz genotoxicidade (CHARTIER et al., 2013).

Estudos de otimização do processo de extração de óleo de café verde e produtos naturais utilizando a técnica de extração com líquido pressurizado, trará maior competitividade para PLE em escala industrial. Estudos de toxicidade são importantes no desenvolvimento e registro de novos fármacos, e o presente estudo elucida a importância de estudos de toxicidade aguda e de doses repetidas em conformidade com protocolos validados na pesquisa de novos compostos bioativos, que futuramente a indústria de cosméticos, fármacos e alimentos funcionais utilizará como base para a ampliação no desenvolvimento de novos produtos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Óleo de café verde

O Brasil é um dos maiores produtores do mundo, sendo o segundo maior consumidor de café. A produção brasileira se concentra nas espécies *Coffea arabica* (café Arábica) e *Coffea canephora* (café Robusta). Há no país uma ampla cobertura territorial de safras de café com diversas condições de cultivo e variabilidade genética entre os cultivares. Atualmente houve um aumento de pesquisas com café, óleo de café verde devido ao aumento do consumo associado a discussões e a disseminação dos efeitos e benefícios à saúde atribuídos ao consumo e a respectiva vantagem e a correlação com o emagrecimento associado ao óleo de café verde e seus bioativos (KITZBERGER et al., 2013). O café é hoje a segunda mercadoria mais importante em todo o mundo, atrás apenas do petróleo, sendo o Brasil o principal produtor mundial e exportador de grãos de café verde (ORTIZ; BENINCÁ; ZANOELO, 2015).

A produção nacional de café arábica e robusta se destaca no cenário mundial, sendo que o arábica representa aproximadamente 75% da produção interna do país. O café é tradicionalmente utilizado como uma bebida, mas nos últimos tempos, óleo de café verde ou torrado tem sido explorado na indústria farmacêutica e alimentícia. O óleo é composto por triacilgliceróis (75%) e ácidos graxos livres, semelhante à de outras composições de óleos vegetais. A fração insaponificável de óleo de café verde é constituída por tocoferóis, esteróis, fosfatídeos, diterpenos, ceras e outros componentes secundários, cujas atividades biológicas têm sido demonstradas (DE OLIVEIRA et al., 2014).

Industrialmente, o óleo de café é obtido por prensagem dos grãos. Entretanto, nos últimos anos, novas técnicas, tais como extração com fluido supercrítico (SFE), foram avaliadas em escala de laboratório para aumentar a fração de compostos de interesse e para aumentar o rendimento do processo e futuramente uma produção em escala industrial (DE OLIVEIRA et al., 2014).

O óleo de café verde é normalmente usado como emoliente na indústria de cosméticos, devido ao seu conteúdo de ácidos graxos e sua capacidade de bloquear a luz solar prejudicial à pele e também é comercializado como matéria-prima para as indústrias farmacêuticas devido à sua atividade antioxidante. É um ingrediente adicionado a cremes usados no tratamento do envelhecimento e doenças relacionadas à pele (DE OLIVEIRA et al., 2014).

O consumo de café como bebida é motivado principalmente pelo seu sabor agradável, aroma, as sensações positivas que produz e seus efeitos fisiológicos. Tal qual

se destaca entre outras bebidas por causa de sua atividade antioxidante e seus compostos ativos, cafestol, caveol, ácido clorogênico (VIGNOLI et al., 2013).

As atividades biológicas atribuídas ao óleo de café têm motivado investigações de sua composição química. Martín, Pablos e González (1998) avaliaram a concentração de ácido clorogênico, cafeína, trigonelina, aminoácidos e polifenóis em 41 amostras de grãos de café Arábica e Robusta e constataram que as duas variedades apresentam diferentes concentrações em cafeína e aminoácidos livres. A discriminação entre as duas espécies também foi analisada com relação à sua concentração de tocoferol. A avaliação na concentração destes componentes demonstra a tendência de investigação das atividades biológicas atribuídas ao óleo de café verde, já que os tocoferóis (α , β , γ e σ) são compostos lipofílicos com propriedades altamente antioxidantes. Os resultados apresentados por Alves et al. (2009) mostram que a concentração de tocoferol pode ser usada para diferenciar as duas espécies, indicando que o café Arábica possui maior concentração de tocoferóis em sua composição, especificamente α -tocopherol.

O óleo de café verde é rico em compostos fenólicos, particularmente em ácidos clorogênicos (PERRONE et al., 2008) cujo alto potencial antioxidante tem sido demonstrado (NAIDU et al., 2008). Além desta importante atribuição, o óleo de café verde tem sido utilizado no tratamento do câncer como agente “quimioprotetor” (drogas que protegem os tecidos saudáveis dos efeitos tóxicos das drogas anticâncer) (FERRAZZANO et al., 2009). O caveol é inibidor de COX-2, indicando propriedades anti-inflamatórias que podem inibir a inflamação vascular e prevenir a aterogênese, porém o mecanismo e como ele ocorre ainda são desconhecidos (KIM et al., 2006).

Os diterpenos cafestol e caveol podem ser considerados exemplos de componentes biológicos contidos no café, visto que, além de demonstrarem atividades quimioprotetoras contra toxinas, como por exemplo, a aflatoxina, pode ter ação pró-carcinogênica. Por exemplo, em fígado de rato, os ativos cafestol e o caveol demonstraram ação protetora contra a genotoxicidade e alterações hepáticas (aflatoxina B1-AFB1) (CAVIN et al., 2001).

Óleo de café verde é altamente rico nestes diterpenos (cafestol - $C_{20}H_{28}O_3$ e o caveol - $C_{20}H_{26}O_3$). Tais diterpenos são álcoois pentacíclicos. O caveol se difere do cafestol por uma dupla ligação entre os carbonos 1 e 2 (Figura 1), levando a um espectro de absorção com pico máximo em diferentes comprimentos de onda. Atualmente vários estudos demonstram que os compostos cafestol e caveol têm efeitos benéficos para a saúde humana, como possíveis fármacos, porém com mecanismo de ação parcialmente desconhecido (KITZBERGER et al., 2013).

Figura 1 - Diterpenos do café

Fonte: Disponível em <<http://www.drugbank.ca/>>.

O cafestol e caveol são difíceis de serem isolados separadamente, sendo o último altamente instável quando purificado. Desta forma, as propriedades biológicas destes compostos têm sido estudadas tradicionalmente utilizando uma mistura de ambos (CAVIN et al., 2002).

Estudos epidemiológicos mais recentes revelam uma associação inversa entre o consumo de café e o risco de alguns tipos de câncer (CAVIN et al., 2002). Desta forma, estudos têm sido voltados para a identificação dos componentes presentes no café que possam ser responsáveis por este efeito benéfico. Em modelos animais e em cultura de células humanas, os diterpenos cafestol e caveol têm produzido uma ampla gama de efeitos bioquímicos que resultaram na redução na genotoxicidade de vários carcinomas (CAVIN et al., 2002).

O caveol, testado em células endoteliais do cordão umbilical humano (células embrionárias) mostrou possuir atividade anti-tumorigênica, antioxidante e anti-inflamatória, na angiogênese do crescimento de um tumor (WANG et al., 2012). Estudos demonstram que o cafestol é um potente antiogênico fitoquímico que exerce funções importantes durante a angiogênese incluindo a fosforilação da quinase (FAK) de adesão e produção de óxido nítrico (NO) (WANG et al., 2012).

O estudo com hamsters fêmeas alimentadas com uma dieta constituída por 20% de grãos de café verde e, em seguida, três vezes por semana pintado na bolsa jugal direita com DMBA (7,12-dimetilbenzeno[a]antraceno) 0,5% em óleo mineral durante 16,5 semanas mostraram tumores ocasionais do lábio e bolsa em relação ao grupo alimentados com uma dieta normal, onde todos os animais apresentavam tumores múltiplos (FORMBY et al., 1987; MC WHORTER et al., 1988). Uma redução de 30 a 40% foi obtida quando os hamsters foram alimentados com uma dieta que consiste em 2,0 g/kg (0,2%) de uma mistura de quantidades iguais de cafestol e caveol antes de receber qualquer tratamento (MILLER et al., 1991). A Aplicação de DMBA e uma solução a 2,5%

de cafestol e caveol em sulfóxido de dimetil (DMSO) teve o mesmo efeito inibitório (MC WHORTER et al., 1988).

O vírus da hepatite C (HCV) infecta cronicamente de 130 à 170.000.000 de pessoas no mundo anualmente. No Brasil, a prevalência da infecção pelo HCV varia entre 1 a 2% por ano. Estudos atribuem propriedades hepatoprotetora ao café e sugerem que esta propriedade seja devido à cafeína. Contudo o café possui outros compostos com atividade comprovada tais como o ácido clorogênico com atividade antioxidante e os diterpenos cafestol e caveol com atividade antitumoral (MACHADO; PARISE; CARVALHO, 2014).

O indicativo de que a cafeína possa estar mesmo desempenhando o papel hepatoprotetora vem, por exemplo, de estudos epidemiológicos conduzidos na Europa e no Japão, que demonstraram que o consumo de café e cafeína pode reduzir o risco do desenvolvimento de doenças tais como cirrose e fibrose hepática não correlacionada ao consumo de bebidas alcoólicas (COSTENTIN et al., 2011).

O café é a bebida mais consumida no mundo e suas propriedades funcionais, atribuídas aos seus componentes, como à cafeína, ao cafestol e caveol, minerais, aminoácidos, lipídios, melanoidinas e açúcares ressaltam o consumo e sua ampla utilização (KITZBERGER et al., 2013).

Atualmente estudos sugerem que o café, a cafeína, os diterpenos cafestol e caveol são benéficos devido às propriedades antioxidantes incluindo o aumento dos níveis de glutathione e efeitos que modificam na fase I e fase de ativação das enzimas II-desintoxicante, fatores os quais podem gerar a proteção contra o desenvolvimento de doenças do fígado (FURTADO et al., 2014).

Os efeitos quimioprotetores dos compostos ativos cafestol e caveol estão relacionados às modificações benéficas do metabolismo xenobiótico. Existem evidências epidemiológicas de que o consumo de café com uma quantidade elevada dos ativos cafestol e caveol, esta associada a uma menor taxa de câncer de cólon em humanos. Recentemente, mostrou-se que os diterpenos cafestol e caveol têm atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*, e reduzem os níveis de expressão da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2), responsável pelos fenômenos inflamatórios e produção de prostaglandinas (LEE; CHOI; JEONG, 2007).

O consumo de café tem sido também associado ao desenvolvimento de doenças como, por exemplo, o possível risco de fraturas, porque elas estão diretamente relacionadas à osteoporose e são caracterizadas como um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, principalmente em idosos (LEE et al., 2014). A população mundial continua a envelhecer e fraturas relacionadas com a osteoporose, provavelmente, continuarão aumentando. Embora a osteoporose esteja correlacionada

ao consumo de café, estudos epidemiológicos são deficientes para afirmar que esta correlação exista (LEE et al., 2014).

Os diterpenos cafestol e caveol são amplamente mencionados na literatura como bioativos do óleo de café verde e do café consumido (torrado), tais compostos desenvolvem um mecanismo responsável por efeitos quimioprotetores, sendo considerados como possíveis mediadores da inibição de bioativação e uma estimulação de desintoxicação celular (MURIEL; ARAUZ, 2010).

A literatura descreve também efeitos hepatoprotetores, bem como atividade antioxidante, anti-inflamatória, além de indução de degradação de substâncias tóxicas e promoção da ação protetora frente à aflatoxina B1 (DIAS et al., 2010). Os diterpenos cafestol e caveol são compostos também responsáveis pelos efeitos quimioprotetores descritos sobre o café, contudo não há uma técnica eficiente para isolar os diterpenos e sua atividade biológica está correlacionada diretamente à mistura dos dois ativos (MURIEL; ARAUZ, 2010).

Óleos vegetais ricos em compostos bioativos, atualmente estão recebendo crescente interesse nas pesquisas devido ao seu papel na prevenção de doenças. No entanto, estudos toxicológicos são necessários para determinar a toxicidade e, assim, estabelecer critérios para a seleção de uma dose segura (TRAESSEL et al., 2014). O presente estudo é o primeiro a representar e demonstrar em níveis toxicológicos sobre o óleo de café verde enriquecido nos bioativos cafestol e caveol, o que pode contribuir para a utilização segura.

No balanço dos prós e contras, o café, pelo alto consumo e produção mundial deve continuar a ter suas potencialidades estudadas, como o que é proposto neste trabalho.

2.2 Extração SFE

O óleo de café verde ou torrado é obtido industrialmente por prensagem dos grãos, mas a extração de óleo de café com o emprego de dióxido de carbono supercrítico (SFE) tem sido explorada para avaliação de quantificação de compostos bioativos, otimização do processo de extração e a utilização da SFE na produção de fitoterápicos (OLIVEIRA et al., 2001, 2005, 2009a, 2009b). Industrialmente, a SFE tem sido aplicada aos grãos de café verde visando à descafeinação, mas, resultados de pesquisas recentes mostram o emprego desta tecnologia na obtenção de óleo de café verde ricos em diterpenos (ARAÚJO; SANDI, 2006; AZEVEDO et al., 2008).

A extração supercrítica (SFE) é uma importante técnica que vem sendo empregada nos processos de separação para obtenção de uma infinidade de produtos naturais em diversos segmentos da indústria e da pesquisa. Atualmente estudos têm sido

desenvolvidos visando novas aplicações industriais para essa tecnologia. SFE tem sido aplicada na produção industrial de café, chá e sementes de guaraná descafeinados (SALDANA; MOHAMED; MAZZAFERA, 2002), na extração de aromas, nicotina, óleos essenciais, ácidos graxos e na purificação de produtos farmacêuticos, o que demonstra o quanto essa tecnologia é promissora dentro desses segmentos (SUTTER; SILVA, CASSEL, 1994).

Aplicações comerciais da extração com CO₂ supercrítico (SFE) apresentam uma tendência de utilização na escala industrial para grãos de café descafeinado, café solúvel, compostos de alto valor agregado tais como especiarias, cravo, canela, isolamento de compostos ativos de plantas medicinais, óleos extraídos de produção de fitoterápicos, matrizes vegetais com emulsões para cosméticos, óleos esfoliantes e protetor solar (DEL VALLE, 2015).

A extração supercrítica é uma extração sólido-fluido supercrítico. Um fluido supercrítico é definido como uma substância que apresenta propriedades P-V-T (pressão-volume-temperatura) acima dos seus valores críticos. Enquanto abaixo do ponto crítico, uma substância pode existir como sólido, líquido ou vapor, acima do mesmo existe a região supercrítica na qual as variações das propriedades termodinâmicas podem ser intensas, causando diferentes efeitos em solutos e reagentes (SANDLER, 1989; BRUNNER, 2005). Este fluido exibe propriedades físico-químicas intermediárias entre as de um gás e de um líquido, o que aumenta sua função como solvente. Sua densidade relativamente alta lhe confere um bom poder de solvência, enquanto que sua viscosidade relativamente baixa e sua alta difusividade promovem um apreciável poder de penetração na matriz do soluto (RIZVI et al., 1986).

Uma pequena variação nas propriedades de estado (P e T por exemplo) nas condições críticas (Figura 2) geram grande variação no comportamento do solvente, causando assim diferentes efeitos sobre solutos e reagentes.

Figura 2 - Diagrama de fases pressão-temperatura de uma substância

Fonte: BOLONKIN et al., 2014.

A SFE de matrizes sólidas consiste basicamente de duas etapas: extração e separação do extrato do solvente. Na extração, o solvente supercrítico flui através de um leito fixo de partículas sólidas e solubiliza os compostos desta matriz. O solvente é alimentado no extrator e distribuído uniformemente no interior do leito fixo. A mistura soluto/solvente deixa o extrator e passa pelo precipitador, onde finalmente os componentes são separados (BRUNNER, 1994).

A eficiência da extração supercrítica deve-se às seguintes considerações: (a) alta variação da solubilidade com dependência da densidade e, portanto, da temperatura e pressão do solvente; (b) aumento da seletividade com aproximação do valor da pressão do solvente à pressão crítica do mesmo; e (c) variação na solubilidade com o peso molecular do soluto, para solutos de estrutura molecular semelhante (RIZVI et al., 1986; BROGLE, 1982). A seletividade do dióxido de carbono pode ser controlada com a temperatura e pressão, ou seja, a extração seletiva de materiais de alta e baixa volatilidade torna-se possível pela escolha apropriada e manipulação correta das condições de operação.

A extração supercrítica nos últimos 13 anos (2000-2013), tem sido empregada para obtenção de extratos de mais de 300 espécies de plantas ao redor do mundo. A técnica (SFE) é utilizada para aquisição de componentes puros de substâncias que são comumente utilizadas na nutrição humana e produção de bioativos. A extração com CO₂ supercrítico tem sido utilizada na obtenção de extratos a partir de matrizes vegetais tais como cenoura (*Daucus carota* L.), cacau (*Theobroma cacao*), alho (*Allium sativum* L.), gengibre (*Zingiber officinale*), ginseng (*Panax spp.*) louro (*Laurus nobilis* L.), laranja

(*Citrus sinensis* L.), orégano (*Origanum spp.*), soja, açafrão (*Curcuma longa* L.), e germe de trigo (*Triticum spp.*) (DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014).

A extração com CO₂ supercrítico (SFE) tem sido amplamente estudada no âmbito da valorização de resíduos e produtos secundários de processos industriais e desenvolvimento de produtos ricos em compostos ativos, sendo exemplos a extração de sementes de uva, casca de eucalipto, tomate, abóbora damasco e arroz. O dióxido de carbono é o solvente mais comum adotado para processos de SFE devido à combinação de várias características fundamentais. O CO₂ pode ser considerado um solvente de baixa toxicidade, não explosivo, facilmente removido do produto extraído. O CO₂ quando reincorporado ao processo de extração não irá poluir o meio ambiente, além disso, o CO₂ é um solvente seguro para a saúde humana e por isso respeita os critérios de sustentabilidade que gerem a adequação dos processos químicos em larga escala. Processos de extração envolvendo dióxido de carbono supercrítico podem ser operados a temperaturas moderadas, que é uma questão fundamental para a preservação de compostos instáveis em extratos (BARBOSA et al., 2014).

2.3 Extração PLE

A técnica de extração com líquido pressurizado (PLE), também conhecida como extração por solvente acelerado (ASE), foi descrita pela primeira vez em 1995 (CARABIAS-MARTINEZ et al., 2005). Essa técnica de extração tem como principais fatores de influência direta, a temperatura, o número de ciclos que o solvente passa pela matriz de extração e a quantidade de solvente empregado.

Esta tecnologia surgiu devido à complexidade da matriz de amostras de alimentos, biológicas, sólidas e semi-sólidas as quais exigem um número elevado de etapas de pré-tratamento. A extração tradicional (Soxhlet) para a determinação de uma ampla variedade de compostos neste tipo de amostra era muitas vezes ineficiente e lento, além de consumir grandes quantidades de solventes orgânicos. A técnica de PLE permite que o tempo e o volume de solvente utilizado no processo sejam reduzidos, comparados com as demais técnicas de extração (CARABIAS-MARTINEZ et al., 2005). Esta técnica de extração desenvolvida para análises laboratoriais passou a ser vista como uma inovação tecnológica plausível de ser empregada em maiores escalas, por isso este grupo de pesquisa tem trabalhado na otimização dos fatores que influenciam este processo (Figura 3).

A extração com líquido pressurizado (PLE) surgiu então como uma alternativa para a extração e fracionamento de produtos naturais, uma vez que permite que a extração seja rápida, além de reduzir consideravelmente o consumo de solvente, podendo então

ser considerada uma tecnologia "verde". Além disso, na PLE os parâmetros do processo podem ser ajustados visando o aumento da seletividade do método para um grupo particular de compostos. Os principais solventes de extração utilizados no PLE são água e / ou etanol, fato o qual torna a técnica de extração segura, pois os solventes utilizados são GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro). A PLE atualmente tem sido usada com sucesso na extração de fotoquímicos termicamente sensíveis a partir de diversas fontes vegetais (MACHADO; PARISE; CARVALHO, 2014).

Os principais fatores que influenciam diretamente a extração líquido pressurizado são a definição da matriz, se animal ou vegetal, o tamanho da partícula, as variáveis tempo estático, volume de solvente, temperatura e o número de ciclos que o solvente passa na amostra, são aspectos importantes que devem ser avaliados previamente em estudos de otimização (MUSTAFA;TURNER, 2011).

A técnica PLE tem dois modos de extração estático e dinâmico (o fluxo de solvente na amostra é contínuo), mas pode também ser usada na combinação de ambos os modos. Contudo no estático, a amostra é adicionada a uma célula de extração de aço inoxidável e posteriormente é preenchida com solvente após o início do processo. Posteriormente o extrato é purgado com N₂ no estado gasoso e logo em seguida o extrato ou ativos são coletados em um frasco de extração que geralmente é de vidro. A extração em modo dinâmico é considerada um sistema de fluxo contínuo de solvente, o qual é bombeado pela amostra, sucedendo a diluição do extrato ou produto resultante da extração. Substâncias tais como sulfato de sódio, terra diatomácea ou celulose, podem ser acrescentadas na célula de extração, pois podem ser empregados para promover a limpeza ou retenção de lipídeos na amostra. A otimização do processo de extração pode ser estudada por modelos estatísticos derivados de planejamentos experimentais, tais como DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional). Atualmente a PLE tem sido empregada nos processos de extração de compostos ativos em alimentos, plantas, fármacos de uso veterinário e determinação de resíduos de agrotóxicos em órgãos, leite e ovos de animais, fenóis, pesticidas em solo, compostos aromáticos, quinolonas, hidrocarbonetos poliaromáticos, herbicidas (PRESTES et al., 2013).

As vantagens da utilização da extração PLE é a alta solubilidade dos analitos em solventes a alta temperatura, maior taxa de difusão, como resultado de aumento de temperatura e a ruptura da forte interação entre soluto-matriz causado por forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e atrações dipolo entre moléculas de soluto e sítios ativos na matriz. Na extração PLE além da temperatura, outros parâmetros podem ser alterados, a polaridade do solvente de extração pode ser escolhida entre uma ampla variedade de acordo com a respectiva matriz a ser utilizada na extração. No entanto os

equipamentos atualmente comercializados permitem apenas a realização da extração dinâmica (ONG; WOO; YONG, 2000).

Após o desenvolvimento de um primeiro instrumento PLE analítico comercial, esta técnica de extração tem sido empregada com sucesso também na extração de amostras com agroquímicos e outros poluentes, produtos farmacêuticos, extratos ricos em compostos ativos de matrizes vegetais. No entanto, a aplicação de PLE em análises de fitoterápicos é pouco empregada comparada as técnicas tradicionais (BENTHIN; DANZ; HAMBURGER, 1999).

2.4 Toxicidade *in vivo*

A toxicologia é uma ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes da interação das substâncias químicas com organismos vivos em geral, englobando também os agentes físicos causadores de toxicidade. Como ciência, define através de estudo qualitativo e quantitativo os efeitos nocivos de substâncias químicas ou agentes físicos, tais como alterações estruturais (lesões anatômicas e histológicas, e de resposta à exposição do organismo frente à substância tóxica (alterações bioquímicas, fisiopatológicas e alterações comportamentais)). Serve também para estimar os limites de segurança, a partir de análise de risco, dos agentes denominados tóxicos (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

Os testes de toxicidade permitem caracterizar o quão nociva é uma substância, a dose/resposta entre a exposição, o agente químico, suas reações adversas e principalmente as doses críticas de exposição, informações essas que no conjunto contribuem para estimar efeitos nocivos em humanos decorrente da exposição a uma determinada substância química (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

O potencial tóxico de uma substância pode ser determinado por estudos *in vitro*, *in vivo*, em organismos uni ou pluricelulares, suas vias potenciais de exposição e as respostas esperadas na espécie estudada. Estudos pré-clínicos em mamíferos são muito utilizados devido à semelhança com o homem, fato o qual prediz melhor os efeitos esperados e o mecanismo de ação do agente químico, objetivando aumentar a confiabilidade na extrapolação dos resultados para humanos (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004).

A organização mundial de saúde (OMS) reportou que aproximadamente três quartos da população mundial utilizam plantas medicinais para tratamento de problemas de saúde. No entanto existe uma preocupação crescente sobre a falta de evidências científicas para toxicidade e estudos de segurança e eficácia de medicamentos a base de plantas e compostos oriundos de produtos naturais (BAE et al., 2014).

A incidência e o mecanismo de toxicidade de muitos fitoterápicos, plantas, vegetais e grãos utilizados mundialmente, todavia são desconhecidos. Efeitos tóxicos mesmo em estudos pré-clínicos ou em estudos clínicos podem ser inconclusivos, pois aspectos como fatores ambientais (época do ano, forma de secagem ou técnica de extração), são fatores que impactam diretamente na quantidade de ativos em estudos de toxicidade (BAE et al., 2014).

Com a relação ao desenvolvimento de novos fármacos é dividida em duas etapas principais, estudos pré-clínicos que são realizados em modelos celulares e animais e os estudos clínicos, que são desenvolvidos em seres humanos. A Resolução CNS 251/97, infere que estudos pré-clínicos realizados em animais sejam parâmetros para justificar a condução de estudos clínicos em humanos. Os resultados dos estudos pré-clínicos devem prever possíveis aplicações terapêuticas, efeitos adversos e possíveis danos reversíveis e irreversíveis à saúde humana.

A avaliação de toxicidade é utilizada com o intuito de determinar o quanto uma substância pode ser considerada tóxica, sendo medicamentos, alimentos e cosméticos. Tais avaliações são importantes para estabelecer se há toxicidade e quais os sintomas relacionados com um quadro de intoxicação aguda pertinente ao ativo em estudo. O teste da DL_{50} foi introduzido em 1927 por Trevan para avaliar substâncias que poderiam ser utilizadas em humanos. Porém o teste de determinação de DL_{50} teve como objetivo principal definir uma dose letal de um medicamento para 50% dos animais do grupo teste, desde então esse teste começou a ser amplamente utilizado para classificação de toxicidade de diversas substâncias. A avaliação toxicológica inicial passou a ser empregada por agências regulatórias internacionais, como o *Food and Drug Administration* (FDA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (VALADARES, 2006).

Para a realização do teste da DL_{50} para cada substância testada, o número empregado era de aproximadamente 100 animais para cada espécie estudada, geralmente camundongos e ratos (GUBBELS-VAN HAL et al., 2005).

Atualmente a utilização da DL_{50} foi gradualmente substituída pelo protocolo OECD-420, que utiliza menor número de animais, como, por exemplo, 3 fêmeas permitindo verificar inicialmente, a classificação toxicológica da substância teste.

A avaliação toxicológica de estudos pré-clínicos com animais é composta por três etapas: aguda, a qual uma dose única inicialmente considerada máxima é administrada a um pequeno número de animais e efeitos tóxicos são avaliados diariamente durante 14 dias, sendo que após são realizados estudos bioquímicos, hematológicos e histológicos.

A etapa sub-crônica, que tem duração de 28 dias de administração da substância teste e são avaliados os mesmos parâmetros do estudo da toxicidade aguda (GOLDIM,

2007). A etapa final de avaliação de toxicidade de uma substância, em um estudo pré-clínico crônico, a administração da substância teste tem duração de 90 dias e são avaliados os mesmos parâmetros do teste de toxicidade aguda. Sabe-se que a condução de estudos pré-clínicos deve ter no mínimo três espécies distintas, roedores e não roedores, envolvendo machos e fêmeas (OECD, 2001).

Estudos toxicológicos permitem estabelecer, o potencial terapêutico, o perfil de letalidade ou sinais de toxicidade, doses terapêuticas e tóxicas, interação medicamentosa ou alimentar que podem potencializar ou diminuir a concentração plasmática do ativo ou metabólito no organismo. Dessa forma, estudos de toxicodinâmica e toxicocinética são importantes para estabelecer determinados parâmetros que podem influenciar na absorção e distribuição de determinados agentes, bem como, na capacidade de gerar ativos mais potentes durante a biotransformação. (VALADARES, 2007).

Além disso, há ensaios *in vivo* e *in vitro* para avaliar genotoxicidade, a carcinogenicidade, a imunotoxicidade, bem como, protocolos para avaliar a toxicidade reprodutiva (NUGENT; DUNCAN; COLAGIOVANNI, 2013).

Com relação aos ativos do café, sabe-se que os diterpenos cafestol e caveol tem ação quimioprotetora, anti-inflamatória, ação hepatoprotetora, sendo considerado um protetor celular de tecidos saudáveis de efeitos tóxicos de drogas anticancerígenas (OLIVEIRA et al., 2014). Contudo até o presente momento, efeitos de toxicidade aguda, sub-crônica e crônica não estão descritos na literatura para tais substâncias. Tais ensaios seguem, como parâmetro inicial o “Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”, regido pela Resolução RE nº 90/04 (BRASIL, 2004).

O desenvolvimento de um novo fármaco sintético ou fitoterápico possui importantes etapas para garantir a segurança de sua utilização futura. As etapas de avaliação botânica, estudos de farmacotécnica, ensaios pré-clínicos, executados em animais de laboratório (camundongos, ratos, coelhos, cães e porcos e/ou primatas), ensaios clínicos de fase I, II, III e IV devem ser realizados para garantir o uso seguro em seres humanos (CAVALCANTE et al., 2007).

A pesquisa clínica é baseada em estudos clínicos conduzidos para o desenvolvimento de novos medicamentos ou para avaliar a bioequivalência de um medicamento genérico frente ao medicamento de referência, sendo que o medicamento genérico é o que contém o mesmo fármaco (princípio ativo), na mesma dose e forma farmacêutica, é administrado pela mesma via e com a mesma indicação terapêutica do medicamento de referência no país, apresentando a mesma segurança que o medicamento de referência no país podendo, com este, ser intercambiável. A intercambialidade é definida pela substituição segura do medicamento de referência pelo medicamento genérico (BRASIL, 1999).

A Fase I consiste na avaliação da tolerância/segurança do medicamento, em um número limitado de voluntários sadios; a partir de resultados satisfatórios na primeira etapa, passa-se a etapa denominada de Fase II se não forem detectados eventos adversos relacionados ao medicamento teste. Nessa fase são realizados testes em voluntários portadores da patologia (doença a qual o medicamento pode ser o tratamento), com número restrito de voluntários (doentes), para avaliar a eficácia do tratamento frente à doença. Se os resultados são positivos nessa fase, tal fase servirá de guia para nortear a condução da fase III. Na fase III, são realizados estudos terapêuticos expandidos, para determinar o risco-benefício do tratamento com o fármaco novo estudado (QUENTAL; SALES FILHO, 2006).

A realização da fase IV ocorre quando produto já é comercializado, contudo seus efeitos colaterais são reavaliados e posteriormente se novos efeitos colaterais são observados por médicos, profissionais da saúde e/ou pacientes, tais efeitos serão descritos futuramente na bula do medicamento. Se eventos adversos severos que causam danos permanentes ao paciente são documentados na fase IV, o fármaco deverá ser reavaliado do mesmo modo em um novo estudo fase III, para que a segurança e eficácia sejam verificadas e notificadas à agência regulatória nacional e internacional (em todos os países do mundo onde o medicamento é comercializado), através da realização de estudos clínicos multicêntricos (QUENTAL; SALES FILHO, 2006).

A OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*) com o intuito de harmonizar a forma de condução de estudos de toxicidade em parcerias com outras agências e instituições internacionais desenvolveram protocolos de condução de estudos pré-clínicos com animais, padronizando metodologias que pudessem ser utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, agências regulatórias e universidades. Tais protocolos se tornaram guias para a regulamentação de substâncias sintéticas e de origem vegetal. Os protocolos de avaliação de toxicidade oral aguda (protocolo nº 420), de toxicidade oral em doses repetidas 28 dias em roedores (protocolo nº 407), são norteadores e fundamentam o uso de animais de laboratório nas etapas iniciais de pesquisas com princípios ativos usados como futuros fármacos sejam desenvolvidos de forma a fundamentar a conformidade de estudos clínicos para as agências regulatórias, de tal forma a comparar sua similaridade com humanos e predizer que tal substância possa ser usada no futuro. É possível comparar a farmacocinética, a biodisponibilidade do medicamento (e a biotransformação em um organismo vivo, antecedendo seus efeitos, e avaliando também a segurança e eficácia do uso em humanos).

A espécie a ser utilizada é uma escolha que deve ser pautada no que se pretende estudar, e qual serão as respostas esperadas, para que a escolha seja baseada na sensibilidade do que se pretende avaliar. A espécie roedora é a mais utilizada em

estudos de toxicidade, avaliação de desreguladores endócrinos, e em estudos de toxicidade inalatório e de administração oral, em geral ratos são mais utilizados devido à sensibilidade da espécie para avaliar tais aspectos (CAMPOS et al., 2009).

O protocolo de toxicidade oral aguda (método doses fixas, protocolo nº420 da OECD), tem como principais aspectos avaliar o aparecimento de sinais de toxicidade a partir da exposição de doses tais como 5, 50, e 2.000 mg/kg de peso vivo do animal do possível ativo a ser estudado. O teste é iniciado com a menor dose que evidentemente não cause sinais de toxicidade e que não levem o animal a óbito. A apresentação ou não de sinais de toxicidade ou morte dos animais expostos à substância estudada define se o estudo terá continuidade e a finalização do mesmo ocorre quando sinais de toxicidade forem evidenciados ou um óbito for identificado. Neste teste são usados preferencialmente ratos e especificamente fêmeas e são 3 animais para cada dose testada, a administração deve ser oral por gavagem (sondagem oro-gástrica) (OECD, 2001).

Estudos de toxicidade de doses repetidas são utilizados para mimetizar os efeitos tóxicos locais e sistêmicos que as substâncias de uso crônico podem oferecer à saúde humana. Para tanto, animais de laboratório como ratos são usados em modelos de estudo de exposição aguda, 28 dias e 90 dias para avaliar se há sinais de toxicidade com o uso agudo, sub-agudo e crônico. Em estudos de toxicidade sub-aguda efeitos adversos em potencial são estudados e futuramente serão relatados em bulas de medicamento.

A OECD dispõe do protocolo nº 407 de toxicidade oral em doses repetidas (28 dias), em roedores, esse teste utiliza ratos machos e fêmeas jovens adultos e o número mínimo é de 5 animais por grupo, esse protocolo recomenda a utilização de um grupo controle com 10 animais para avaliação dos efeitos de toxicidade nos doses a serem testadas. Esta indicação torna mais evidente a observação da persistência, reversibilidade e efeitos depois de decorridos o período de 28 dias de tratamento.

No período de administração da substância ativa, sinais clínicos como hiperexcitabilidade, consumo de água e ração, alterações de peso corporal devem ser observados durante o estudo. Após o período do estudo, devem ser avaliados parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos dos órgãos- alvo, pesos absolutos e relativos dos órgãos. Recomenda-se que sejam avaliadas também alterações de sistema imunológico, sistema nervoso central e sistema endócrino (OECD, 2008).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade oral em ratos, dos extratos do óleo de café verde, extraído com CO₂ supercrítico e com líquido pressurizado, através dos protocolos 407 e 420 preconizados pela OECD. Dessa forma, foi possível avaliar a segurança de ambos os extratos e seu potencial como princípio ativo futuramente.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a toxicidade aguda e sub crônica dos diterpenos presentes no óleo de grãos de café verdes obtidos via SFE e PLE, os níveis de toxicidade e os efeitos da administração do óleo enriquecido dos bioativos C e K em ratos.

3.2 Específicos

Os objetivos específicos foram:

- Analisar os compostos bioativos cafestol e caveol contidos no extrato do óleo de café verde obtidos por SFE em condições de extração já otimizadas em estudos anteriores (300 bar e 70°C).
- Otimizar extrações do óleo de grãos de café verde ricos em diterpenos via PLE em batelada, utilizando para isso um delineamento composto central rotacional (DCCR) com duas variáveis temperatura (T) e tempo estático (tE), sendo tE o tempo de contato com o solvente em cada ciclo estabelecido para cada batelada de extração.
- Determinar a concentração de cafestol e caveol nos extratos obtidos via PLE assim como os testes para comprovar a bioatividade destes extratos.
- Avaliar a toxicidade e a atividade aguda *in vivo* dos diterpenos presentes no óleo de grãos de café verdes obtidos via SFE e PLE.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização física da matéria-prima

A matéria-prima desta pesquisa foi grãos de café Arábica (*Coffea arabica*), cultivar (cv.) Catuaí Amarelo, produzidos na região de Jaú, Torrinha e Dois Córregos, São Paulo/Brasil (22°25'34"S e 48°10'09"W, 802 m acima do nível do mar e uma temperatura média de 22°C) oriundos da colheita de agosto de 2013. Estes grãos, embora denominam-se grãos de café verde são grãos de café maduro, colhidos, secos ao sol, sem cascas, e que não foram submetidos ao processo de torração.

No laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN/FZEA/USP), os grãos foram selecionados, e os defeituosos foram retirados. Os grãos utilizados para a extração do óleo foram secos em estufa de ar forçado durante 48 horas a 50 °C e triturados (Figura 3). A temperatura empregada na secagem dos grãos foi aplicada com o intuito de evitar a degradação dos compostos bioativos cafestol e caveol.

Figura 3 - Grãos de café verde inteiro (A) grãos triturados (B)

A determinação da umidade dos grãos foi realizada através método gravimétrico (AOAC, 1995). Os grãos foram triturados em um moinho tipo faca (Marconi, Piracicaba, BR), e as amostras após serem trituradas foram armazenadas em freezer vertical (Frost Free, Brastemp, BR) à temperatura de -18°C.

A granulometria dos grãos verdes de café triturados foi realizada com uma massa igual a 22 g para a PLE e 88,6 g para a SFE, que foram acondicionados no jogo de peneiras da série padrão Tyler (Figura 4), e agitado durante 5 minutos para que as partículas fossem distribuídas de modo uniforme em cada uma das peneiras. O diâmetro médio da partícula foi calculado através da relação da Equação 1.

Figura 4 - Jogo de peneiras da série padrão Tyler e grãos de café verde triturados

$$d_{mg} = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{j=1}^n (w_i \log \bar{d}_i)}{\sum_{j=1}^n w_i} \right] \quad [1]$$

onde, $d_i = (d_i \cdot d_{i+1})^{0,5}$ d_i : abertura nominal da i-ésima peneira (mm);
 d_{i+1} : abertura nominal da peneira maior que a i-ésima peneira (mm);
 w_i : massa do material retido na i-ésima peneira.

4.2 Densidade real e Densidade aparente

A densidade real dos grãos de café verde moídos foi determinada pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), utilizou-se o picnômetro gasoso (Quantachrome Ultrapyc 1200e, FL, EUA) e uma balança analítica (Quimis, modelo QI-AS, EUA). O equipamento utilizou gás hélio para medir o volume e a densidade real das partículas sólidas por meio da técnica de deslocamento de gás.

A densidade aparente foi determinada empiricamente pela relação entre a massa total de grãos de café moídos acondicionados no extrator e o volume do extrator cilíndrico (300 cm³). A massa de café verde foi empacotada no extrator e pesada onze vezes em uma balança analítica (SHIMADZU AUY220, Tokyo, JP) e o cálculo de densidade aparente foi realizado para os onze ensaios.

A porosidade do leito do extrator foi calculada através da relação entre a densidade real e a densidade aparente e a densidade real pela Equação 2.

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad [2]$$

Onde, ε é a porosidade do leito, ρ_a é a densidade aparente e ρ_r é a densidade real.

4.3 Extração do óleo de café verde com CO₂ supercrítico

O processo de extração supercrítica consistiu no contato dos grãos verdes de café triturado, os quais foram acondicionados no extrator de leito fixo de 300 cm³ (Figura 5) com o CO₂ supercrítico em condições pré-estabelecidas de pressão (300 bar) e temperatura (70 °C) otimizadas previamente para obtenção de óleo de grãos de café verde ricos em cafestol e caveol (DE OLIVEIRA et al., 2014). O controle de pressão foi feito por uma bomba de líquido a alta pressão e um controlador de pressão (back pressure) acoplado ao equipamento, a temperatura foi mantida por manta térmica no extrator e controlada por termostatos internos, o fluxo de CO₂ (Oxinitro Gases e Equipamentos Ltda., Pirassununga, BR) foi de 5 g/min. O extrato foi coletado continuamente em um frasco coletor imerso em um banho de gelo. Ao final de todas as extrações os frascos foram pesados e estabeleceu-se a relação da massa do extrato com a massa dos grãos secos acondicionados no extrator para o cálculo de rendimento total. A Figura 6 mostra o equipamento utilizado nos experimentos, um sistema de extração supercrítica TharSCF (Waters, Milford, USA).

Figura 5 – Empacotamento do leito fixo do extrator que opera com CO₂ supercrítico

Foram realizadas 54 extrações com CO₂ supercrítico, para que se obtivesse o montante de óleo necessário para os ensaios *in vivo*. Antecedendo a extração dinâmica, os grãos de café verde triturados permaneceram em contato com o CO₂ supercrítico durante o tempo estático de 20 min. O tempo total de extração dinâmica com CO₂ supercrítico foi de 6 h. A massa de grãos de café verde triturado utilizada em todas as

extrações foi de aproximadamente 88,6g, como também estabelecido por De Oliveira et al. (2014).

Figura 6 - Sistema de extração com CO₂ supercrítico do LTAPPN, FZEA/USP

- (1) Bomba de HPLC, (2) Controle das temperaturas, (3) Trocador de calor, (4) Frasco coletor imerso no banho de gelo, (5) Cilindro de CO₂.

4.4 Extração com Líquido Pressurizado (PLE)

A extração com líquido pressurizado empregou o etanol (EtOH, 99,3%) (Ciclofarma, Serrana, Brasil) como solvente, o qual é seguro para a saúde (Generally Recognized as Safe - GRAS) e o Brasil é um país com potencial como produtor deste solvente.

Na extração que emprega líquido pressurizado, optou-se por otimizar somente duas variáveis de processo, a temperatura (T) e o tempo estático (tE), pois OLIVEIRA et al. (2014b) ao estudar a otimização das quatro principais variáveis deste processo (temperatura, tempo estático, volume de solvente e número de ciclos) constataram que T e tE apresentaram-se como as mais significativas. Desta forma, no estudo de otimização da extração com líquido pressurizado (PLE), foram estudadas a influência destas duas variáveis no rendimento dos extratos e nas concentrações de cafestol e caveol nestes extratos.

As extrações com PLE foram realizadas no laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais no departamento de Engenharia de Alimentos FZEA/USP-

Pirassununga. O método de extração com líquido pressurizado consistiu em pesar 22 g de grãos de café verde e triturados e acondiciona-las no extrator de leito fixo.

As variáveis do processo que se mantiveram constantes foram, a pressão de 100 bar, o número de ciclos (C) em cada batelada, que foram três, o volume (V) do etanol (EtOH) no extrator foi de 80% de sua capacidade em cada ciclo e a pressão de operação fixa em 103 bar.

A PLE constituiu-se na extração dos componentes presentes nos grãos de café verde pelo solvente, resultando em um volume final coletado de 30 mL. Estes experimentos foram feitos em um equipamento ASE[®] 150, Dionex (Figura 7) e os fatores (T e tE) foram estudados segundo um delineamento completo central rotacional (DCCR²) cujos níveis do planejamento são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Níveis dos dois fatores (T e tE) do DCCR no estudo da otimização do rendimento do extrato de grãos de café verde obtidos via PLE ricos em diterpenos

Fatores	Níveis				
	- α	-1	0	1	+ α
T (°C)	46	60	50	70	74
tE (min)	3	6	80	8	9

$\alpha=1,41$

Figura 7 - (A): extrator PLE, ASE[®] 150, Dionex vista interna onde o extrator é acoplado. (B) extrator PLE fechado. (C) ducto acoplado com o frasco coletor de extrato

A matriz completa do DCCR com cinco níveis e triplicata no ponto central, com as variáveis codificadas e reais é apresentada na Tabela 2.

A extração com líquido pressurizado (PLE), ou extração com solvente acelerado (ASE, *Accelerated Solvent Extraction*), é uma técnica que pode ser utilizada para produção de extratos naturais e princípios ativos a partir de matrizes vegetais que podem

ser usados na indústria farmacêutica e cosmética. O produto extraído com essa técnica gera extratos enriquecidos em compostos ativos (DE OLIVEIRA et al., 2014).

Tabela 2 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para duas variáveis (reais e codificadas) no estudo do efeito da Temperatura (T) e Tempo Estático (tE) na otimização da PLE

Ensaio	T Variáveis Codificadas	Te	T (°C) Variáveis Reais	tE (min)
1	-1	-1	50	4
2	1	-1	70	4
3	-1	1	50	8
4	1	1	70	8
5*	0	0	60	6
6*	0	0	60	6
7*	0	0	60	6
8	+ α	0	46	6
9	- α	0	74	6
10	0	+ α	60	3
11	0	- α	60	9

* Pontos centrais do DCCR.

A técnica de extração PLE apresenta resultados semelhantes aos da extração com Soxhlet em termos de recuperação, repetibilidade e seletividade. No entanto, o tempo de extração e consumo de solventes são drasticamente reduzidos. Nesta técnica (PLE), o aumento da temperatura diminui a viscosidade do solvente, o que permite uma penetração melhorada da matriz e aumenta a difusividade do solvente. A redução do tempo de extração evita uma possível degradação térmica. Este método é amplamente utilizado como uma técnica de extração para identificar a presença de componentes menores ou em baixas concentrações e com características fotossensíveis e termossensíveis (DE OLIVEIRA et al., 2014).

4.5 Separação da Cafeína dos Extratos obtidos por SFE

Na extração com CO₂ supercrítico, a cafeína é extraída junto ao óleo de café verde (enriquecido dos diterpenos cafestol e caveol) devido à sua solubilidade no CO₂ na condição de extração empregada (70 °C e 300 bar). O processo simples de separação mecânica da cafeína do óleo consistiu na centrifugação dos extratos a 3.000 rpm por 10 min em uma centrífuga (Thermo Jouan BR4i, Thermo FisherScientific, Waltham, USA). Após a centrifugação, o óleo foi retirado do tubo de polipropileno (15 mL, 120x17 mm, Falcon) separadamente da cafeína. Este processo foi realizado para todos os extratos utilizados nos testes *in vivo*.

4.6 Caracterização do extrato

Nos extratos obtidos via SFE e PLE foram avaliadas as concentrações dos diterpenos cafestol e caveol. As análises físico-químicas visaram identificar e caracterizar os óleos obtidos por ambas as técnicas de extração. A quantificação dos diterpenos corroborou com a mensuração da condição de maior concentração dos diterpenos C e K nos extratos obtidos via PLE.

4.6.1 Preparo do óleo de café verde e quantificação dos diterpenos

Os extratos obtidos via PLE e aquele obtido na condição otimizada de extração com CO₂ supercrítico (300 bar e 70°C) foram saponificados e transesterificados conforme a metodologia desenvolvida por este grupo de trabalho e descrita por Chartier et al. (2013). Na transesterificação a quente, 100 mg de óleo de café verde, 8,25 g de hidróxido de potássio (Êxodo Científica, Hortolândia, BR) e 100 mL de metanol (Merck, Darmstadt, GE) foram colocados no mesmo frasco em um banho ultrassônico por 1 h e 40 min. Após esse período, essa solução foi colocada em banho-térmico (Marconi, Piracicaba, BR) a 70 °C por 1h. Em seguida, a solução foi seca em N₂. Nesta mesma solução adicionou-se 2 mL de terc butil metil éter (MTBE), (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e 2 mL de água desmineralizada (MilliQ Direct Q3, Billerica, Massachusetts, USA). Posteriormente as soluções foram centrifugadas a 3.000 rpm por 5 min (Thermo Jouan BR4i, Thermo FisherScientific, Waltham, USA) e a fase orgânica (sobrenadante) foi recolhida e mais 2 mL de MTBE foi adicionado à solução. Tal procedimento foi repetido 2 vezes, com o intuito de retirar todo o cafestol e caveol e demais insaponificáveis presentes na amostra. A fase orgânica recolhida foi lavada com 2 mL de água desmineralizada e novamente centrifugada. Após esta lavagem, a fase orgânica recolhida foi seca com fluxo de N₂ em concentrador (Tecnal, TE-019, Piracicaba, BR) à temperatura ambiente.

A identificação dos diterpenos cafestol e caveol na fração insaponificável foi feita por cromatografo gasoso com detector de ionização de chama (GC/FID) e coluna capilar

As frações insaponificáveis diluídas foram injetadas (1 µL) em um GC/FID (GC FID 10 Plus, Shimadzu, Kioto, JP) As condições de análise basearam-se naquelas sugeridas por Chartier et al. (2013) e Oliveira et al. (2014b). A injeção foi realizada no modo *splitless* com temperatura do injetor de 300°C. A temperatura do forno variou em um gradiente com temperatura inicial de 70°C/2,5min com aumento de 40°C/min até 200°C/10min, aumento de 6°C/min até 235°C/0min e aumento de 30°C/min até a temperatura final de 330°C/7min, totalizando 25 min de corrida. Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste

com vazão de 1,20 mL/min. A temperatura de interface do GC foi de 300°C e a temperatura da fonte de ionização de 250°C.

A quantificação dos diterpenos cafestol e caveol foi feita por normalização externa, tal método compara a área da substância a serem quantificados na amostra com as áreas obtidas desta mesma substância em soluções padrões de concentrações conhecidas feitas com padrões analíticos certificados. As soluções de cafestol e caveol puros (Santa Cruz Biotechnology, California, USA.) foram preparadas e utilizadas nas análises em diferentes concentrações para a construção da curva padrão. Estes diterpenos foram diluídos em MTBE a 90, 150, 300, 600, 900, 1.200, 1.500 µg/mL (ppm).

4.6.2 Determinação do índice de acidez em ácido oleico

A determinação do índice de acidez em ácido oleico é importante para determinar o estado de conservação e a qualidade do óleo de café verde extraído. Esta propriedade química do óleo poderá indicar influências exercidas pelos dois processos (SFE e PLE) na constituição do óleo de grãos de café verde.

Para a determinação do índice de acidez em ácido oleico (%), 2 g de óleo foram misturados a uma solução de éter etílico (Ecibra, São Paulo, BR), etanol (Panreac química, Barcelona, Espanha) (2:1) e em seguida foram adicionados 3 gotas do indicador fenolftaleína (Synth, São Paulo, BR). A titulação foi realizada com uma solução padronizada de hidróxido de sódio (Anloquímica, São Paulo, BR) 0,01M até o aparecimento da cor rósea e permanência dela na solução por 30 s (ZENEBON; PASQUET; TIGLE, 2008). O resultado do índice de acidez (IA) foi calculado a partir do volume da solução de hidróxido de sódio gasta na titulação na relação que se apresenta na Equação 3.

$$IA (\%) = \frac{v \times f \times 0,01 \times 28,2}{P} \quad [3]$$

na qual:

v = volume gasto na titulação;

f = fator da solução;

P = Peso da amostra.

4.7 Avaliação da toxicidade *in vivo* dos diterpenos do óleo de grãos de café verdes

4.7.1 Animais

Foram utilizados ratos wistar, com 90 dias, pesando aproximadamente 250 g provenientes do biotério do Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX) do Departamento de Patologia da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária (FMVZ/USP), campus de Pirassununga. Os animais foram mantidos num ciclo claro-escuro de 12 horas, a fase clara foi iniciada diariamente às 7 horas da manhã. As condições de temperatura ($20 \pm 4^{\circ}\text{C}$) foram controladas, tanto quanto a umidade relativa ($55 \pm 10\%$). Cada caixa mantinha 2 animais, sendo que o contato visual entre eles foi possível devido à divisão metálica alocada nas caixas. Os animais foram alimentados com peletes de ração extrusadas (Algomix, Toledo, PR, Brasil) e a água foi ofertada aos animais durante todo o período do experimento *ad libitum*. Os animais foram habituados às condições experimentais, por um período de 15 dias anteriores ao início da administração dos extratos do óleo de café verde.

Todos os procedimentos realizados neste estudo estão em conformidade com os princípios éticos da experimentação animal do Comitê de Ética em Pesquisa- (CEP) da FZEA/USP representado pelo CEPH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos e CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais e as diretrizes internacionais (NIH, 1985). Cujo número do protocolo de aprovação é 2013.1.473.74.4

4.7.2 Fármacos e Reagentes

Os medicamentos e reagentes utilizados neste estudo foram como anestésicos cloridrato de xilazina (ROMPUM® - BAYER, São Paulo, BR), cloridrato de cetamina 10% (CETAMIN® - Rhobifarma, Hortolândia, BR). Também se utilizaram kit's comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, BR) para análises bioquímicas como as enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamiltransferase (GGT), desidrogenase láctica (LDH), e os níveis séricos de uréia, creatinina, glicose, colesterol HDL, colesterol total, triglicérides, albumina, proteína total (PT) uréia e globulina.

4.7.3 Preparo dos extratos do óleo de café verde para análise *in vivo*

Os extratos dos grãos de café verde obtido via SFE a 300 bar e 70°C foram centrifugados para remoção da cafeína antes de serem administrados aos animais. Após esse procedimento extratos foram mantidos no congelador a -20°C até o momento de sua utilização. Este óleo continha 42 g de caveol/kg de óleo de grão de café verde e 21 g de cafestol/kg de óleo.

O extrato do óleo de café verde obtido pela técnica de extração com líquido pressurizado (PLE) na condição de extração previamente otimizada no DCCR que foi de 70°C e tE 8 min, apresentou as maiores concentrações de cafestol e caveol e foi utilizado para as análises *in vivo*. Estes extratos também foram centrifugados para remoção da cafeína antes da administração aos animais. Após esse procedimento extratos foram armazenados (-20°C) até o momento da administração. As amostras de extrato de óleo de café verde obtido via PLE utilizadas para os ensaios *in vivo* apresentaram 21,09 g de caveol/kg de óleo de grão de café verde e 18,44 g de cafestol/kg de óleo. A administração dos extratos nos animais foi por meio de sondagem oro-gástrica (gavagem).

4.7.4 Toxicidade oral aguda

No experimento de toxidade oral aguda do óleo de café verde obtidos via SFE ou PLE foram utilizadas 3 ratas *Wistar* pesando entre 200 a 260g para cada óleo. A administração do óleo de grãos de café verde aos animais foi executada por via oral, por meio de gavagem (sondagem oro-gástrica) que garante, na dose única de 2.000 mg/kg de peso corpóreo do animal.

Durante todo o experimento, os animais foram observados quanto aos sinais clínicos de toxicidade. No primeiro dia se observou os animais nos tempos 15, 30, 45, 60 min. e de hora em hora durante as primeiras 24 horas. Neste período, foram observados sinais como: alteração locomotora, mucosas, pielobereção, sialorreia, convulsões, hiperexcitabilidade, contorções abdominais, tremores, diarreia, letargia e morte. Posteriormente, os animais foram avaliados diariamente a fim de verificar a presença ou ausência de sinais clínicos de toxicidade.

O guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos da ANVISA (BRASIL, 2004) e OCDE (2001) foram utilizados na realização dos estudos de toxicidade aguda e sub-crônica com o óleo de café verde e seus diterpenos cafestol e caveol como fitoterápicos.

4.7.5 Toxicidade doses repetidas (28 dias) do óleo de café verde

No estudo de toxicidade sub-crônica, foram utilizados machos *Wistar* pesando entre 295 a 365 g, os ratos foram pesados antes do início do experimento para distribuição estatisticamente homogênea do peso entre os grupos.

A administração do óleo de café verde aos animais dos experimentos foi executada por via oral (gavagem – sondagem oro-gástrica), nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg de peso corpóreo, uma vez ao dia, durante 28 dias consecutivos. Durante todo o experimento, os ratos foram pesados periodicamente, para ajustar as doses dos tratamentos.

Os animais foram divididos em 4 grupos, sendo um grupo controle com 8 animais, o grupo que recebia a dosagem de 25 mg/kg de peso corpóreo (9 animais), o grupo de 50mg/kg de peso corpóreo (8 animais) e o grupo de 75mg/kg de peso corpóreo (9 animais). Foram avaliados quanto à presença ou ausência de sinais clínicos de toxicidade, conforme descrito no tópico 4.6.4. Ao término do experimento, os ratos foram eutanasiados para avaliação macroscópica, microscópica (histologia), bioquímica e hematológica.

O consumo de ração e o peso dos animais foram realizados periodicamente durante todos os experimentos para o ajuste das doses de acordo com o peso de cada rato individualmente.

4.8 Hemograma e bioquímica

Análises bioquímicas foram feitas nos animais utilizados em ambos os experimentos, de toxicidade aguda e sub-crônica. A coleta de sangue foi realizada com os ratos anestesiados com cloridrato de xilazina e o cloridrato de cetamina, sendo a dose utilizada de 5,0 mg/kg e 50 mg/kg de peso corpóreo concomitantemente, por via intraperitoneal.

Posteriormente os animais foram submetidos à punção cardíaca, a qual foi efetuada com auxílio de seringas (BD, Plastipak, Curitiba, BR) e agulhas (BD, Plastipak, Curitiba, BR) descartáveis. Para a execução do hemograma foi utilizado uma alíquota de sangue com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético - BD, Plastipak, Curitiba, PR, Brasil), tal alíquota foi submetida ao aparelho automático (Vet ABCTM Animal, Blood conter, Horiba, ABX Diagnostics, Montpellier, França) para emissão do valor de cada componente analisado da amostra. A coloração Rosenfeld (Dinâmica Química, Diadema, BR) foi utilizada na coloração das lâminas para a contagem de diferencial dos leucócitos. No procedimento de coloração para a contagem de células, a lâmina foi colocada no suporte

de coloração, foi recoberta com 20 gotas de corante Rosenfeld. Após 3 min. adicionou-se 20 gotas de água destilada, logo após homogeneizar a mistura corante/água permaneceu em repouso por 3 min., posteriormente a lâmina foi lavada em água corrente e seca em posição vertical.

Para as análises bioquímicas, foi utilizada outra alíquota de sangue, que foi mantida em temperatura ambiente por 45 min para que ocorresse a coagulação. Após, a coagulação o sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 min., em seguida coletou-se o soro, que foi mantido a uma temperatura de 4°C, no refrigerador (Brastemp, Flex, São Paulo, BR) até a realização das dosagens. As amostras foram lidas no equipamento no período de 48 horas.

A atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamil transferase (GGT), assim como os níveis séricos de uréia, creatinina, glicose, colesterol total, triglicerídes, proteína total (PT), albumina, dos animais controle e experimentais, foram dosados pelo sistema automatizado, para bioquímica (CELM SBA-200, São Caetano do Sul, BR) do Laboratório do CEPTOX da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária (FMVZ-USP) da Universidade São Paulo campus de Pirassununga.

4.9 Avaliação do peso relativo dos órgãos, necropsia e análises histológicas

O peso relativo dos órgãos, a necropsia e as análises histológicas foram feitas para ambos os experimentos, de toxicidade aguda e sub-crônica.

A avaliação do peso relativo dos órgãos dos animais foi realizada ao final do experimento, seguida da eutanásia dos animais. Após a coleta dos órgãos (fígado, baço, rins, timo, coração e pulmão), estes foram pesados, sendo posteriormente, realizado o cálculo do peso relativo de cada órgão (Equação 4).

$$\text{Peso relativo do órgão (\%)} = \frac{\text{Peso do órgão}}{\text{Peso corpóreo de cada animal}} \times 100 \quad [4]$$

Na necropsia, os órgãos fígado, rins, baço, timo, coração e pulmão, foram avaliados macroscopicamente com o intuito de aferir e detectar possíveis lesões. Em seguida procedeu-se a coleta dos respectivos tecidos para a análise histopatológica. Tais tecidos foram fixados em formol a 10% tamponado preparado com formaldeído (Dinâmica Química, Diadema, SP, Brasil), fosfato de sódio monobásico (Synth, Diadema, SP, Brasil) e fosfato de sódio dibásico anidro (Synth, Diadema, SP, Brasil) no dia seguinte os tecidos foram transferidos para um frasco com álcool etílico 70% (Dinâmica Química, Diadema,

SP, Brasil). Foram emblocados na parafina, cortados com espessura de 5 μm e corados com hematoxilina (Leica, Wetzlar, Alemanha) e eosina (Leica, Wetzlar, Alemanha). A avaliação histológica foi realizada com um microscópio óptico (Nikon, eclipse 50 i, Tóquio, Japão).

4.9.1 Análise estatística

A otimização do processo de extração PLE foi avaliada por análise de superfícies de resposta. As variáveis dependentes obtidas como respostas, tais como rendimento da extração, índice de acidez e a quantificação dos bioativos cafestol e caveol foram analisados pelo DCCR com duas variáveis independentes (T e tE). As superfícies de resposta foram feitas pelo emprego do programa STATISTICA v.12.0 (USA).

Na análise dos dados coletados para identificar a toxicidade, empregou-se o programa estatístico GraphPad Prism 6.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Para verificar a homocedasticidade dos dados utilizou-se o teste de Bartlett. Para avaliação estatística entre dois grupos, foi utilizado o teste t de *Student*. Para dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós teste de Dunnett's ou duas vias, quando existiam dois fatores (tempo e tratamento), seguida pelo pós teste de Bonferroni. Para análise não paramétrica foi utilizado Kruskal-Wallis, seguida pelo teste de Dunn's.

Em todas as análises efetuadas, as diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da matéria-prima

Os grãos de café verdes secos em estufa de circulação de ar forçada e triturados apresentaram um teor de umidade de 4,13% ($\pm 0,10$), completando 95,27% de sólidos totais. A quantidade de massa retida (g) nas peneiras para o cálculo de diâmetro médio das partículas (Equação 1) dos grãos de café verde secos e triturados são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Massa de grãos de café verdes triturados retidos nas peneiras utilizados no cálculo do diâmetro médio das partículas.

Tyler / mesh	Abertura (mm)	Massa de café moído (g) SFE
10	1,700	0,38
14	1,1800	45,92
20	0,8500	102,39
28	0,600	28,44
35	0,4350	9,11
48	0,3000	8,37
65	0,2120	6,63

O diâmetro médio das partículas resultou em 0,8789 mm para os grãos de café verdes triturados e esta granulometria foi mantida para todas as extrações utilizando o CO₂ supercrítico (SFE) e para a extração com líquido pressurizado (PLE). Segundo Oliveira (2010), o parâmetro do diâmetro médio das partículas é importante, pois está diretamente relacionado com a resistência interna de massa. Contudo, para aumentar o rendimento da extração, reduzir o tamanho da partícula pode ser indicado com a finalidade de proporcionar um aumento na área de contato sólido/solvente, com isso diminuindo a distância que o soluto percorre no interior da partícula porosa para a superfície. O tamanho de partícula em estudos com matrizes vegetais ricas em óleo é um dado importante a ser mensurado.

O valor médio da densidade aparente medida empiricamente foi de 0,4001 g.cm⁻³ para os grãos de café verde e triturados. O volume do extrator supercrítico é de 300 cm³. A densidade real foi de 1,35 $\pm$ 0,01 g/cm³. A porosidade do leito fixo apresentou o valor de 0,2964. As massas dos grãos acondicionados no leito do extrator nas 11 repetições e seus respectivos valores são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Densidade aparente da amostra de grãos de café verdes e triturados

Ensaio	Massa de café verde moído (g)	Densidade aparente (g/cm ³)
Extração SFE		
1	88,0610	0,4001
2	88,0598	0,4001
3	88,0494	0,4002
4	88,0608	0,4003
5	88,0578	0,4003
6	88,0556	0,4001
7	88,0601	0,4001
8	88,0589	0,4001
9	88,0619	0,4004
10	88,0552	0,4001
11	88,0610	0,4001
Média	88,0609 ± 0,0195	0,4001 ± 0,0001

5.2 Otimização do processo de extração com líquido pressurizado (PLE)

Os resultados do rendimento dos extratos obtidos via PLE em função das variáveis estudadas no DCCR, temperatura (T) e tempo estático (tE), indicam que foram altos, de modo geral, variando de 6,60 a 9,78 % (Tabela 5), valores semelhantes aos rendimentos obtidos no processo de extração com fluido supercrítico na região otimizada para o melhor rendimento (DE OLIVEIRA et al., 2014).

A matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) (Tabela 5) mostra o resultado das respostas obtidas em função da variação da temperatura (T) e do tempo estático (tE) do processo. Como resposta tem-se o rendimento do óleo de grãos de café verde e a concentração dos principais diterpenos cafestol e caveol neste extrato.

5.2.1 Influência das variáveis de processo no rendimento do extrato

Na análise estatística dos efeitos principais de primeira ordem das variáveis e da interação entre elas na otimização do rendimento da extração (ensaios de 1 a 7, Tabela 5), notou-se que a T, o tE e a interação entre elas influenciaram positivamente o rendimento (R) ($p \leq 0,05$) o que visualiza-se no diagrama de Pareto (Figura 8). O efeito significativo da interação entre as variáveis (T×tE) foi positivamente superior ao efeito de cada uma das variáveis. Na faixa de temperatura estudada o tempo estático (tE) empregado foi a segunda variável que demonstrou maior influência positiva no rendimento.

Tabela 5 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) que mostra as variáveis (reais e codificadas) e sua influência na otimização do rendimento do extrato de grãos de café verde obtido via PLE e da concentração de diterpenos nestes extratos.

	T	tE	T (°C)	tE (min)	Rendimento (%)	Índice de Acidez (%)	Cafestol (g/kg de óleo)	Caveol (g/kg de óleo)
Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais					
1	-1	-1	50	4	7,08	0,1097	7,85	11,12
2	1	-1	70	4	6,60	0,1402	6,64	7,92
3	-1	1	50	8	6,97	0,1418	17,71	21,28
4	1	1	70	8	9,78	0,1549	18,44	21,09
5*	0	0	60	6	7,45	0,1076	19,43	25,16
6*	0	0	60	6	7,98	0,1476	17,52	20,3
7*	0	0	60	6	7,22	0,1292	11,36	14,61
8	-α	0	46	6	7,23	0,1180	6,58	9,15
9	+α	0	74	6	8,78	0,1279	20,08	23,9
10	0	-α	60	3	7,21	0,1477	7,94	11,20
11	0	+α	60	9	8,60	0,1424	12,27	15,72

* Pontos centrais do DCCR.

Figura 8 - Diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis T e tE no rendimento do extrato de grãos de café verde obtidos por PLE.

Os coeficientes significativos avaliados por análise de variância (ANOVA) (Tabela 6) que compõem o modelo de primeira ordem (Equação 4) ajustou-se bem aos dados experimentais com um coeficiente de determinação (R^2) de 95% de variação na superfície de resposta gerada por este modelo.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para o rendimento do extrato de grãos de café verde via PLE

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio (QM)	F_{calc}	$*F_{tab}$	R^2
Regressão (r)	6,4194	3	2,1398	20,73	9,38	0,95
Resíduo (R)	0,3095	3	0,1032			
Total (T)	6,7289	6				

Coeficiente de determinação (R^2)= SQR/SQT ; $F_{calc}=QMR/QMr$; *Valores de F tabelado a $p \leq 0,05$

$$R = 7,583 + 0,583T + 0,768tE + 0,823T \times tE \quad [4]$$

Por meio do teste F, verifica-se que o modelo de primeira ordem para o rendimento do extrato obtido via PLE foi significativo e, portanto preditivo, já que o valor de F_{calc} foi maior que o de F_{tab} . Desta forma, o modelo linear gerado tem a capacidade de explicar 95% da variação dos dados (Tabela 6).

Na análise estatística dos coeficientes que comporiam um modelo quadrático analisado por ANOVA (Tabela 7), verifica-se que os coeficientes de regressão quadráticos ou de segunda ordem não foram significativos.

Tabela 7 - Coeficiente de regressão com base no QM quadrado médio residual para a resposta rendimento do extrato de grãos de café verde obtidos via PLE para um modelo de segunda ordem

Fatores	Efeitos Estimados	Erro Padrão	$t(5)$	p	-95%	95%
Média	7,5514	0,2160	34,963	0,0000	6,9962	8,1066
T (L)	1,1322	0,2649	4,274	0,0079	0,4512	1,8132
T (Q)	0,2803	0,3161	0,887	0,4158	-0,5323	1,0929
tE (L)	1,2612	0,2649	4,761	0,0051	0,5802	1,9422
tE (Q)	0,1797	0,3161	0,569	0,5942	-0,6329	0,9923
T x tE	1,6450	0,3741	4,397	0,0070	0,6834	2,6066

A superfície de resposta gerada pelo modelo linear ou de primeira ordem (Equação 4) mostra que os melhores rendimentos dos extratos de óleo de café verde obtido por PLE foram alcançados quando se empregou temperaturas elevadas para maiores tempos de contato entre o solvente e a matriz acondicionada no extrator de leito fixo (Figura 9). A região otimizada neste experimento indica o direcionamento para que se adote outras faixas de T e tE no estudo da otimização do processo PLE, aquelas que propiciem temperaturas mais elevadas e maiores períodos de contato da matriz com o solvente para que melhores rendimentos possam ser alcançados.

Figura 9 - Superfície de resposta gerada pelo modelo de primeira ordem que mostra a influência das variáveis de processo (T e tE) no rendimento dos extratos de grãos de café verde obtidos por PLE

5.2.2 Influência das variáveis no índice de acidez em ácido oleico

A determinação do índice de acidez é importante para avaliar o estado de conservação do óleo, as condições de armazenagem pós-extração e a respectiva influência da extração na qualidade do produto final.

Os extratos de grãos de café verde obtidos via PFE apresentaram índices de acidez em ácido oleico entre 0,1076 e 0,1549 (%). A legislação brasileira limita o valor de acidez para óleos vegetais refinados a 0,3 % (BRASIL, 2005). Assim, o óleo de grãos de café verde obtido por esta técnica apresenta baixo IA e por isso está em acordo com a legislação vigente. Este índice indica que tanto a faixa de temperatura empregada quanto o contato com o solvente (EtOH) não interferiram na qualidade do extrato. Uma grande vantagem da PFE refere-se à ausência de oxigênio na extração, já que é feita em atmosfera de nitrogênio e isto certamente colabora com a qualidade do extrato.

Na análise estatística da influência da T e do tE no índice de ácidos do extrato, constatou-se que nenhuma destas variáveis, nem a interação entre elas influenciaram estes valores como se vê no diagrama de Pareto (Figura 10) com o nível de confiança de 95% demarcado.

Figura 10 - Diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis T e tE no índice de acidez do extrato de grãos de café verde obtidos por PLE

5.2.3 Influência das variáveis na concentração de diterpenos nos extratos

Os diterpenos cafestol e caveol foram quantificados (fração insaponificável do óleo de grãos de café verde), por normalização externa. As curvas padrão foram construídas de maneira a correlacionar as concentrações de cafestol e caveol (0, 150, 300, 600, 900, 1.200 e 1.500 µg/mL) com as áreas dos picos cromatográficos obtidos em um GC/FID conforme descrito no item 4.5.2.

A regressão linear das curvas padrões (Figura 11) geraram as Equações 5 e 6 que correlacionam a área dos picos cromatográficos com a concentração de cafestol e caveol respectivamente. Estas equações foram utilizadas nos cálculos das concentrações dos diterpenos no óleo de grãos de café verde obtidos por PLE e SFE. A área dos picos cromatográficos obtidos em cada ensaio como aqueles apresentados na Figura 13 foram utilizadas nas respectivas equações para o cálculo da concentração.

A quantificação dos diterpenos foi realizada com o intuito de verificar e avaliar as concentrações dos ativos cafestol e caveol nas amostras extraídas com CO₂ supercrítico (SFE) e com líquido pressurizado (PLE).

As concentrações de cafestol e caveol dos extratos obtidos via PLE em função das variáveis de processo estudadas temperatura (T) e tempo estático (tE) estão apresentadas na Tabela 5. As concentrações de diterpenos foram relativamente altas variando de 6,58 a 20,08 de cafestol/kg de óleo de café verde e de 7,92 a 25,16 g de caveol/kg de óleo de café verde.

Figura 11 - Curvas dos padrões de cafestol e caveol que correlacionam a concentração com a área do pico correspondente utilizadas na quantificação dos diterpenos cafestol e caveol do óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico (SFE) e com líquido pressurizado (PLE).

Cafestol

Caveol

$$\text{Conc. Cafestol} = \frac{\text{Área do pico} + 61151}{1537,9493,45} \quad [5]$$

$$\text{Conc. Caveol} = \frac{\text{Área do pico} + 234400}{1537,9} \quad [6]$$

Figura 12 - (A) Cromatograma do extrato de café verde obtido via PLE (ensaio 4) e (B) Cromatograma do óleo obtido via SFE com os picos de caveol e cafestol em destaque

B

As extrações do óleo de grãos de café verde com CO₂ supercrítico apresentaram rendimento de 42 g de caveol/kg de óleo de café verde e 21 g de cafestol/kg de óleo de café verde. Segundo estudos prévios a condição otimizada de extração com CO₂ supercrítico (70 °C e 300 bar) foi a utilizada neste experimento (DE OLIVEIRA et al., 2014) cuja concentração dos diterpenos foram de 60,4g de caveol/kg e 46,9g de cafestol/kg de óleo de café verde.

A concentração dos diterpenos (caveol e cafestol) em função de todas as condições estudadas para as variáveis do processo de extração com líquido pressurizado foi avaliada por análise de regressão e superfícies de resposta.

A análise dos efeitos principais da temperatura (T), do tempo estático (tE) e da interação entre elas (T×tE) indica que nenhuma das variáveis influenciaram a concentração de diterpenos nos extratos, tanto para o cafestol quanto para o caveol. A não influência das variáveis de processo na concentração de cafestol e caveol ao nível de 95% de confiança pode ser observada nos diagramas de Pareto da Figura 13.

Os coeficientes de determinação de R² calculados foram baixos para os modelos lineares e esse fato indica que os modelos gerados (Tabela 8 e 9, Equações. 7 e 8) não predisseram o comportamento da concentração de cafestol e caveol nos extratos quando diferentes condições experimentais de T e tE foram empregadas no processo de extração PLE.

Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para o rendimento de cafestol do extrato de grãos de café verde via PLE

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio (QM)	F _{calc}	*F _{tab}	R ²
Regressão (r)	118,2874	3	39,43	2,12	9,38	0,68
Resíduo (R)	55,8984	3	18,63			
Total (T)	174,1858	6				

Coeficiente de determinação (R²)= SQR/SQT; F_{calc}=QMR/QMr; *Valores de F tabelado a p ≤ 0,05

$$R = 14,1357 - 0,1200 \times T + 5,4150 \times tE + 0,4850T \times tE \quad [7]$$

Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) do modelo de primeira ordem para o rendimento de caveol do extrato de grãos de café verde via PLE

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Graus de Liberdade	Quadrado Médio (QM)	F _{calc}	*F _{tab}	R ²
Regressão (r)	141,2103	3	47,07	1,50	9,38	0,60
Resíduo (R)	93,7235	3	31,24			
Total (T)	234,9338	6				

Coeficiente de determinação (R²)= SQR/SQT; F_{calc}=QMR/QMr; *Valores de F tabelado a p ≤ 0,05

$$R = 17,3400 - 0,8475 \times T + 5,8325 \times tE + 0,7525T \times tE \quad [8]$$

Figura 13 - Diagrama de Pareto que mostra os efeitos das variáveis T e tE no rendimento dos diterpenos cafestol (g/kg de óleo de café verde) (A) e caveol (g/kg de óleo de café verde) (B) obtidos por PLE.

Ainda que os modelos não sejam preditivos, como se constata também nos coeficientes de regressão das variáveis que comporiam o modelo linear (Tabela 10) e quadrático (Tabela 11) e da interação entre elas, obtiveram-se as maiores concentrações de cafestol e caveol nas condições dos pontos centrais (60 °C e 6 min de tE) e na

condição 9 (74 °C e 6 min. de tE) (Tabela 5). Os menores valores obtidos para os bioativos de óleo de café verde foram encontrados entre as menores condições de temperatura e tempo estático.

Tabela 10 - Coeficiente de regressão com base no MS residual para a resposta rendimento do cafestol do extrato de grãos de café verde obtidos via PLE para um modelo de segunda ordem.

Fatores	Efeitos Estimados	Erro Padrão	t(5)	P	-95%	95%
Média	16,0826	2,8505	5,642	0,0024	8,7552	23,4101
T (L)	-0,6559	1,7482	-0,375	0,7229	-5,1497	3,8379
T (Q)	-4,3167	2,0860	-2,069	0,0933	-9,6790	1,0456
tE (L)	3,4810	1,7482	1,991	0,1030	-1,0128	7,9748
tE (Q)	-1,6961	2,0860	-0,813	0,4531	-7,0584	3,6662
T x tE	0,4850	2,4686	0,196	0,8519	-5,8608	6,8308

Tabela 11 - Coeficiente de regressão com base no MS residual para a resposta rendimento do caveol do extrato de grãos de café verde obtidos via PLE para um modelo de segunda ordem.

Fatores	Efeitos Estimados	Erro Padrão	t(5)	p	-95%	95%
Média*	19,9884	3,3315	5,999	0,0018	11,4243	28,5525
T (L)	2,1824	2,0432	1,0681	0,3342	-3,0698	7,4347
T (Q)	-1,6440	2,4381	-0,6743	0,5300	-7,9113	4,6233
tE (L)	3,7239	2,0432	1,8225	0,1279	-1,5283	8,9762
tE (Q)	-3,1857	2,4381	-1,3066	0,2482	-9,4530	3,0816
T x tE	0,7525	2,8852	0,2608	0,8046	-6,6643	8,1693

*Fator significativo ($p < 0,05$)

Se o modelo fosse preditivo, poder-se-ia afirmar que a região mais próxima à condição otimizada seria o ponto central. No entanto, regiões com elevadas temperaturas e tempo estático também apresentaram elevadas concentrações de cafestol e caveol. A não determinação da região otimizada da concentração dos bioativos cafestol e caveol pode ter ocorrido devido às condições operacionais (T e tE) variáveis designadas no presente estudo. Todavia, na literatura não tem estudos de otimização do óleo de café verde pela técnica PLE para que condições fossem comparadas com o delineamento composto central rotacional (DCCR).

Segundo De Oliveira et al. (2014) temperaturas elevadas tiveram uma influência negativa quanto à extração dos diterpenos (cafestol e caveol) para a técnica de extração com CO₂ supercrítico. Porém no estudo com a técnica de extração PLE se observou o contrário onde os maiores rendimentos dos diterpenos foram às condições com temperaturas elevadas. Fato o qual pode evidenciar que a polaridade do etanol pode ter

carreado uma concentração maior dos bioativos, o que se difere na técnica de extração com CO₂ supercrítico.

5.3 Avaliação *in vivo* da toxicidade do óleo de café verde

5.3.1 Avaliação da toxicidade oral aguda com óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico

Neste estudo, constatou-se que na maior dose testada (2.000 mg/kg peso vivo), nenhum dos três animais (fêmeas) expostos ao óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico apresentou sinais clínicos de toxicidade ou mortalidade nas primeiras 24 h após a exposição e durante o período do experimento. Para que os resultados experimentais sejam considerados válidos pelas agências regulatórias (ANVISA, FDA), é essencial que estes testes sejam conduzidos seguindo protocolos internacionalmente aceitos, como os publicados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (Organization for Economic Co-operation and Development-OECD). Este estudo adotou tal normativa, o Guia OECD 420 (OECD, 2001) como principal norteador para a condução do experimento.

Este teste foi capaz de classificar o óleo de café verde enriquecido em diterpenos e testado em modelos *in vivo* como seguro (para esta dosagem), segundo sistemas internacionalmente aceitos.

Ao avaliar somente o consumo de ração da dieta utilizada para os animais tratados e controle frente aos sinais de toxicidade, a ANOVA de duas vias (tipo de tratamento e dias de observação) demonstrou que houve diferença com relação ao tratamento ($p < 0,0001$), não havendo diferença entre os dias de observação ($p = 0,3629$) nem na interação entre os fatores ($p = 0,5454$). A diferença observada no consumo de ração demonstrou que o grupo controle consumiu uma quantidade maior de ração quando comparado ao grupo tratado (Figura 14). Ressalta-se que, o consumo diário normal para um rato adulto pode variar de 18 a 35 g de ração por dia (MORAILLON et al., 2013) e ambos os grupos (controle e tratado) consumiram em quantidades normais.

Embora o consumo de ração do grupo controle tenha sido maior que o grupo tratado (Figura 14), na variação de peso esta diferença não foi observada (Figura 15), no entanto não há como estabelecer qualquer correlação estatística visto que o número de animais (3) empregados nestes ensaios é deficiente para qualquer conclusão.

O maior consumo de ração pelos animais controle não implica em maior ganho de peso assim como o menor consumo de ração pelos animais tratados não implica na diminuição do peso (Figuras 14 e 15).

Figura 14 – Consumo de ração das ratas fêmeas-14 dias – Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)

Ainda que tenha sido insuficiente para correlacionar parâmetros de variação de peso e consumo de ração, o número de animais foi suficiente para avaliar a letalidade e mortalidade do teste toxicológico. Este fato evidencia que é possível respeitar os aspectos bioéticos da redução de animais em experimentos.

Barbosa et al. (2014), utilizando o mesmo protocolo de análises, demonstrou que o café verde com altas concentrações de cafestol e caveol, pode influenciar no metabolismo celular de ratos, resultando na perda e/ou manutenção de peso. Neste estudo foi possível verificar a manutenção do peso dos animais expostos à dosagem aguda de óleo de grãos de café verde obtidos via extração com CO₂ supercrítico.

Figura 15- Variação de peso das ratas fêmeas-14 dias – Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)

Outro estudo que utiliza a dose 100 mg do óleo de café verde/kg de peso do animal demonstrou um consumo regular da ração assim como neste trabalho, no entanto ocorreu redução de peso dos animais obesos tratados durante 21 dias (MACHADO, 2011). Estes autores sugerem que tenha ocorrido um provável aumento no metabolismo celular, por diferentes mecanismos de ação.

Estudos anteriores sobre o consumo de café já o evidenciavam como possível regulador de peso corporal e também como uma substância preventiva contra diabetes mellitus, porém tal fato era atribuído especificamente à cafeína (KUMARI et al., 2011; YUN, 2010; BISHT; SISODIA, 2010; GUMY et al., 2009; TANAKA et al., 2009; SHIMODA et al., 2006; VAN DAM; FESKENS, 2002; ACHESON et al., 1980). Entretanto o presente estudo utilizou óleo de café verde com baixa concentração de cafeína, e, portanto, pode ter sido esta a causa de não se observar redução no peso corpóreo (Figura 15). Uma constatação possível seria a diminuição de apetite causada pelo consumo de óleo de grãos de café verde (Figura 14), no entanto não se pode identificar tal comportamento visto ao número restrito de animais para esta análise.

A avaliação do peso relativo dos órgãos feita segundo o protocolo de análise de toxicidade confirma o efeito ativo do óleo de grãos de café verde, uma vez que foram constatadas alterações que caracterizam uma substância tóxica.

A Figura 16 mostra a avaliação do peso relativo dos órgãos das ratas expostas à dose de 2.000 mg/kg para a avaliação da toxicidade aguda do óleo extraído com CO₂ supercrítico. A análise de variância ANOVA apontou um aumento significativo quando se analisou o peso relativo do timo ($p=0,0376$) entre os grupos controle e que recebeu tratamento. A alteração do peso relativo do timo poderia indicar uma hiperplasia, porém não houve um aumento na porcentagem de leucócitos. Além disso, a avaliação histológica não confirmou nenhuma alteração na estrutura do órgão. O presente estudo sugere que a aceleração do metabolismo celular por hiperatividade celular possa ter aumentado o peso relativo do timo. Os demais órgãos não apresentaram alterações macroscópicas (Figura 16).

Com relação à análise bioquímica dos animais submetidos à administração de 2.000 mg de óleo de café verde extraído via CO₂ supercrítico/kg de peso corpóreo, para análise dos resultados foi realizado o teste t de *Student*. Este teste apresentou diferença em relação ao grupo controle apenas para a fosfatase alcalina ($p=0,0219$) (Figura 17). No entanto o valor de normalidade deste parâmetro bioquímico para um roedor compreende 40 a 191 U/L (MORAILLON et al., 2013), e os animais apresentaram a enzima em concentrações plasmáticas dentro destes parâmetros.

Embora o aumento da fosfatase alcalina em níveis séricos possa sugerir alterações, tais como obstrução biliar, lesão hepatocelular, alteração nos hepatócitos, hemorragia

intra e/ou extracelular no tecido hepático (COUTO et al., 2008) isto não foi constatado. Para caracterizar um quadro de intoxicação aguda, os animais deveriam também apresentar, sinais clínicos como diarreia, anorexia, letargia, perda de peso e níveis elevados das enzimas hepáticas, gama glutamiltransferase (GGT), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008) detectadas na avaliação bioquímica dos animais, essas alterações não foram apontadas. Especificamente para as enzimas gama glutamiltransferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase e lactato desidrogenase, visualiza-se a não diferenciação do controle na Figura 18.

Figura 16- Peso relativo dos órgãos (em g – peso do órgão / peso corpóreo x 100) das ratas fêmeas-14 dias – Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)

(A) Peso relativo do timo, (B) peso relativo do coração, (C) peso relativo do baço, (D) peso relativo dos rins, (E) peso relativo do pulmão, (F) peso relativo do fígado.

Figura 17 - Bioquímica Sérica das ratas fêmeas-14 dias – fosfatase alcalina, GGT, AST, ALT e LDH - Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).

(A) Fosfatase alcalina, (B) Gama glutamil transferase, (C) Aspartato aminotransferase, (D) Alanina aminotransferase, (E) Lactato desidrogenase.

Não foram verificadas alterações significativas para os parâmetros bioquímicos em nível plasmático da albumina, globulina, glicose, triglicerídeos, e proteína total neste estudo de toxicidade aguda (Figura 18).

Figura 18 - Bioquímica Sérica das ratas fêmeas-14 dias – albumina, globulina, glicose, triglicerídeos e proteína total - Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).

(A) Albumina, (B) Globulina, (C) Glicose, (D) Triglicerídeos, (E) Proteína total.

Ao avaliar os parâmetros da bioquímica sérica (colesterol total, colesterol HDL, uréia e creatina) (Figura 19), a ANOVA não mostrou diferenças significativas em nenhum dos parâmetros analisados. Vale ressaltar que a manutenção desses parâmetros dentro dos valores normais de referência pode sugerir que o óleo de café verde não apresentou evidências toxicológicas.

Figura 19 - Bioquímica Sérica das ratas fêmeas-14 dias – colesterol total, colesterol HDL, uréia e creatinina - Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).

(A) Colesterol total, (B) Colesterol HDL, (C) Uréia, (D) Creatinina.

Os resultados referentes à avaliação dos parâmetros hematológicos, proveniente de ratas expostas ao óleo de café verde, comparadas ao grupo controle (Figura 20), não mostraram diferenças significativas em nenhum dos parâmetros analisados. Dessa forma, pode-se inferir que a administração aguda do óleo de café verde na dose de 2.000 mg/kg corpóreo não causou alterações hematológicas.

Figura 20 – Parâmetros Hematológicos das ratas fêmeas-14 dias – Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)

No estudo toxicológico pré-clínico agudo do óleo de café verde não foram observadas mortes ou alterações clínicas em nenhum dos animais, por outro lado, verificou-se diminuição no consumo de ração do grupo tratado e maior consumo de ração pelo grupo controle. Também foram observadas alterações como aumento do peso relativo do timo e, na análise dos parâmetros bioquímicos, verificou-se um aumento da enzima fosfatase alcalina.

Na necropsia não foram observadas alterações macroscópicas (morfofisiológicas), assim como não ocorreu alterações na avaliação histopatológica. Nestas avaliações não foi constatada nenhuma alteração do timo, coração, baço, rins, pulmão e fígado, indicando que a administração do óleo de café verde em dose única de 2.000 mg/kg de peso vivo não causou toxicidade sistêmica.

Quando ministrada dose de 2.000 mg de óleo de café verde/kg de peso vivo por animal, foi possível observar baixa toxicidade aguda já que a exposição a esta dose não foi letal. A partir deste resultado o óleo de café verde pode ser enquadrado na categoria quatro do sistema mundial harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos (Global Harmonization System) (AMENI, 2011).

5.3.2 Avaliação da toxicidade aguda do óleo de café verde extraído com líquido pressurizado

A extração com líquido pressurizado (PLE) utilizando o etanol (EtOH) como solvente provém extratos ricos em compostos ativos e sem resíduos tóxicos já que o EtOH é seguro para a saúde (Generally Recognized as Safe – GRAS). Atualmente esta técnica de extração tem sido utilizada para obter extratos com alta concentração compostos bioativos (DE OLIVEIRA et al., 2014) e por isso foi escolhida para obtenção de óleo de grãos de café verde rico em cafestol e caveol.

Na avaliação da toxicidade aguda dos extratos ricos em cafestol e caveol obtido por PLE (tE de 8 min e T de 70°), ao avaliar o consumo de ração, a análise de variância (ANOVA) de duas vias (Figura 22) mostrou que houve diferenças significativas entre os dias de observação ($p=0,0040$), não havendo diferenças no tratamento ($p=0,2586$) e nem na interação entre estes fatores ($p=0,6733$). O consumo de ração apresentou um aumento do 1º ao 3º dia e, a partir do 4º dia ocorreu uma manutenção no consumo de ração entre os animais tratados quando comparados ao grupo controle. No entanto, ao avaliar o peso dos animais (Figura 22), o grupo tratado com óleo de café verde obtidos por PLE, apresentou diminuição na variação de peso, enquanto o grupo controle exibiu uma maior variação de peso, todavia o controle não mostrou aumento no consumo de ração.

A diminuição da variação de peso dos animais tratados pode sugerir uma alteração no processo metabólico dos mesmos. Uma vez que o consumo de ração se manteve igual e os animais tratados apresentaram uma clara redução de peso, já o grupo controle mostrou consumo semelhante e aumento de peso, como pode ser observado nas Figuras 21 e 22.

Figura 21– Consumo de ração das ratas fêmeas-14 dias – Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com líquido pressurizado – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)

Com relação ao peso corpóreo, a ANOVA de duas vias mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao tratamento ($p=0,0064$) não havendo diferença nos dias de observação ($p=0,9897$) e nem interação entre os fatores ($p=0,9999$) (Figura 22).

Figura 22– Variação de peso das ratas fêmeas-14 dias – Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com líquido pressurizado – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)

Para análise de peso relativo dos órgãos os animais receberam tratamento agudo com extrato do óleo de café verde extraído com líquido pressurizado (PLE). De acordo com o test t de *Student* realizado, foi possível observar que não houve diferenças significativas, para o baço ($p=0,4360$), fígado ($p=0,7612$), rins ($p=0,9423$), pulmão ($p=0,6677$), e timo ($p=0,4544$), tanto dos animais tratados com 2000 mg/kg de PLE quanto dos animais do grupo controle (Figura 23). Os efeitos tóxicos de um teste de toxicidade aguda podem ser leves, como uma irritação cutânea, ou podem até gerar respostas sistêmicas como alterações renais, hepáticas, e enzimáticas, bem como, causar uma alteração permanente tal como o desenvolvimento de câncer ou cirrose (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Figura 23 - Peso relativo dos órgãos (em g – peso do órgão / peso corpóreo x 100) das ratas fêmeas-14 dias-Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com líquido pressurizado – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)

A análise dos parâmetros bioquímicos (fosfatase alcalina, GGT, AST, ALT e proteína total) dos animais que receberam o óleo de café verde no teste de toxicidade aguda, de acordo com o test t de *Student* realizado, foi possível observar que não houve diferenças significativas, dos animais tratados comparados com o grupo controle, demonstrado na Figura 24.

Figura 24- Parâmetros Bioquímicos das ratas fêmeas-14 dias - fosfatase alcalina, GGT, AST, ALT e proteína total – Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com líquido pressurizado – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).

(A)

Fosfatase alcalina, (B) Gama glutamiltransferase, (C) Aspartato aminotransferase, (D) Alanina aminotransferase, (E) Proteína total.

Ao analisar os parâmetros da albumina, glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL, foi possível observar que não houve diferenças significativas nos parâmetros bioquímicos dos animais expostos ao óleo de café verde (Figura 25).

Figura 25- Parâmetros Bioquímicos das ratas fêmeas-14 dias - albumina, glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL– Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com líquido pressurizado – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).

(A) Albumina, (B) Glicose, (C) Triglicerídeos, (D) Colesterol total, (E) Colesterol HDL.

Quando analisado os parâmetros bioquímicos (uréia, creatinina), dos animais tratados com óleo de café verde, foi possível observar, que não houve diferenças significativas entre o grupo tratado e grupo controle (Figura 26). Logo, pode-se inferir que o óleo de café verde extraído com líquido pressurizado na dose aguda 2.000 mg/kg, não alterou nenhum dos parâmetros avaliados.

Figura 26- Parâmetros Bioquímicos das ratas fêmeas-14 dias - uréia e creatinina– Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com líquido pressurizado – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)

(A) Uréia, (B) Creatinina.

Na análise hematológica, dos animais expostos ao óleo de café verde, no que diz respeito à avaliação de toxicidade aguda, o tratamento na dose de 2000mg/kg com o extrato PLE não causou toxicidade a nível sistêmico. O teste t de *Student* comprovou tal resultado, não apresentando diferença significativa, entre o grupo tratado e o grupo controle (Figura 27).

A análise dos parâmetros hematológicos podem evidenciar a presença ou ausência de alterações nas células sanguíneas. Esses parâmetros embasam a avaliação de efeitos tóxicos que alteram a porcentagem de leucócitos, eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, hemoglobina corpuscular média, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média. Os valores dos parâmetros fisiológicos dos animais de experimentação podem exibir variações influenciadas por vários fatores sendo eles a exposição a uma substância, as condições de acomodação dos animais ou a linhagem das matrizes (DINIZ et al., 2006).

Figura 27- Parâmetros Hematológicos das ratas fêmeas - 14 dias - Toxicidade Aguda (óleo de café verde extraído com líquido pressurizado. Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).

Quando analisada as técnicas de extração com líquido pressurizado e extração com CO_2 supercrítico, através da dose de 2.000 mg/kg de óleo de café verde extraído ministrado em ratas do experimento de toxicidade aguda, foi possível observar que na

primeira não houve nenhum sinal clínico nem alterações sistêmicas que pudessem caracterizar um quadro toxicológico relacionado ao óleo administrado. Em relação à segunda, evidenciou-se a possibilidade dos animais terem desenvolvido uma resposta adaptativa, a exposição do óleo enriquecido com os bioativos cafestol e caveol. Tal estudo gerou evidências de que possíveis efeitos de manutenção e diminuição da variação de peso dos animais possam ter ocorrido, de forma a não promover efeitos tóxicos a nível sistêmico.

A exposição aguda ao óleo de café verde extraído com líquido pressurizado, não promoveu alterações no peso relativo dos animais, nem nos parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Entretanto para confirmar essa hipótese de que o óleo de café verde promoveu de fato um efeito de alteração no metabolismo dos animais, estudos como codificação da expressão gênica de proteínas envolvidas em vias de sinalização celular ativas são sugeridos para pesquisas futuras (BASTOS; ROGÊRO; ARÊAS, 2009).

Com os dados obtidos no estudo de toxicidade aguda do óleo de café verde extraído com líquido pressurizado, não é possível afirmar se houve ou não alterações tóxicas. No entanto, pode-se afirmar que não foi letal aos animais expostos ao óleo de café verde (extraído via PLE), na dose de 2.000 mg/kg.

5.3.3 Avaliação da Toxicidade de Doses Repetidas (durante 28 dias)

O estudo preliminar de toxicidade aguda mostrou que o óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico evidenciou uma diminuição do ganho de peso dos animais, sem apresentar alterações hematológicas e histológicas significativas. Além disso, foi verificado que o uso da dose de 2.000 mg/kg (peso vivo do animal), não foi letal.

O intuito do estudo de toxicidade de doses repetidas foi avaliar os efeitos preditivos encontrados no estudo de toxicidade aguda (descrito acima) e os efeitos da exposição ao óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico, nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg durante 28 dias. Os diterpenos cafestol e caveol podem promover possíveis alterações no metabolismo de proteína e gordura dos animais.

Quando analisado o consumo de ração dos animais tratados com o óleo de café verde durante 28 dias, através de ANOVA de duas vias, observaram-se diferenças significativas no tratamento ($p < 0,0001$), nos dias de observação ($p < 0,0001$) e interação entre os fatores ($p < 0,0001$). O pós-teste estatístico de Bonferroni apontou diminuição no consumo de ração no 3º e no 6º dia do tratamento, nos animais do grupo de 50 ($p < 0,01$) e 75 mg/kg; ($p < 0,0001$), aumento no 9º ($p < 0,01$), no 15º ($p < 0,05$) e no 18º ($p < 0,001$) dia do grupo de 25 mg/kg quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 28).

Embora do terceiro ao nono dia, os animais tenham apresentado uma redução no consumo de ração, a partir do 10º dia o consumo se manteve estável, sem praticamente nenhuma alteração, nas três doses estudadas. O grupo controle apresentou consumo de ração similar aos grupos tratados com o óleo de café verde.

Figura 28 – Consumo de ração dos ratos - 28 dias – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)

Na análise do peso corpóreo, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas com relação ao tratamento ($p < 0,0001$), os dias de tratamento ($p < 0,0098$), porém sem interação entre os grupos e o tratamento ($p = 0,9967$). O pós-teste de Bonferroni apontou diminuição do peso corpóreo no 18º, 21º, 24º e 28º dias de tratamento em ratos do grupo que receberam 75 mg/kg ($p < 0,05$), bem como, no 28º dia em animais que receberam 25 mg/kg ($p < 0,05$) versus animais do grupo controle (Figura 29).

Os animais do grupo controle apresentaram um consumo de ração semelhante aos ratos dos grupos tratados (25, 50 e 75 mg/kg), no entanto, o peso corpóreo do grupo controle aumentou durante o experimento. Já os animais tratados mostraram clara redução no peso corpóreo (Figura 29), evidenciando uma resposta dose/dependente. Essas alterações sugerem que o organismo dos animais passou por um processo adaptativo ao ser exposto ao óleo de café verde. A redução do consumo de ração pode ser associada a um provável estresse calórico devido à exposição dos animais ao óleo de café verde, fato o qual influenciou diretamente na diminuição do peso corpóreo. Pois segundo Garcia et al. (2004), fatores como alteração de temperatura do ambiente,

alterações ambientais e climatológicas, introdução de substâncias concomitante à dieta, podem alterar o consumo de ração e gerar um estresse calórico.

A variação de peso pode ter sido influenciada pelo óleo de café verde e seus diterpenos cafestol e caveol. No entanto essa variação não pode ser diretamente relacionada com as diferenças estatísticas verificadas no consumo de ração.

Figura 29 - Variação de peso dos ratos - 28 dias – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)

Na análise do peso relativo dos órgãos dos animais que receberam o tratamento do óleo de café verde (nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg), durante 28 dias, o test t de *Student*, mostrou diferença significativa, para o timo ($p < 0,003$). O pós-teste de Dunn's mostrou diminuição do peso relativo do timo na dose de 25mg/kg ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (Figura 30).

A alteração no peso relativo do timo pode ser relacionada à exposição do óleo de café verde, no entanto, não há correlação claramente descrita no experimento de exposição de doses repetidas durante o período de 28 dias. Para confirmar tal achado, estudos como celularidade do timo devem ser feitas para avaliar se houve alteração a nível celular do órgão.

A análise do peso relativo do coração, pulmão e baço, dos animais expostos às três doses do óleo de café verde (25, 50 e 75 mg/kg), de acordo com test t de *Student* realizado, foi possível observar que não houve diferença significativa, dos animais tratados comparados com o grupo controle, demonstrado na Figura 30.

Figura 30- Gráficos do peso relativo dos órgãos-alvo - coração, baço, pulmão e timo (em g – peso do órgão / peso corpóreo x 100) dos ratos - 28 dias – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).

(A) peso relativo do coração, (B) peso relativo do baço, (C) peso relativo do pulmão, (D) peso relativo do timo.

Para avaliar o peso relativo do fígado e dos rins dos animais que receberam as três doses do óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico durante 28 dias, o teste t de *Student*, foi possível observar diferença significativa no peso relativo do fígado ($p < 0,001$) nos grupos tratados. O pós-teste de Dunnett mostrou aumento do peso relativo desse órgão nas três doses estudadas, 25 mg/kg, ($p < 0,01$), 50 mg/kg ($p < 0,001$), e 75 mg/kg, ($p < 0,0001$) comparadas com os animais do grupo controle. Essa alteração evidencia a

resposta dose/dependente da exposição ao óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico.

Ao avaliar o peso absoluto do fígado, dos animais tratados com óleo de café verde (durante 28 dias), de acordo com o teste de Kruskal Wallis realizado, foi possível verificar diferenças significativas no peso absoluto do fígado ($p=0,0189$) (Figura 31). O pós-teste de Dunn's apontou aumento deste parâmetro nas doses de 50mg/kg ($p<0,05$), bem como na maior dose (75mg/kg, ($p<0,01$) quando comparados aos animais do grupo controle. O aumento do peso absoluto e do peso relativo do fígado denota que possa ter ocorrido uma alteração no processo de biotransformação hepática, visto que ambos os parâmetros analisados mostram o aumento do órgão.

No entanto, na análise histológica do fígado, não foram observadas alterações morfológicas como megalocitose, necrose ou apoptose nos ratos expostos ao óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico nas três doses (25, 50 e 75 mg/kg).

As alterações do peso relativo e absoluto do fígado não evidenciaram claramente uma alteração hepática, pois não foram observados danos estruturais, celulares (hiperplasia) ou alterações na estrutura dos hepatócitos.

Todavia, a alteração do peso relativo e absoluto do fígado dos animais expostos ao óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico, possa ser atribuída à presença dos bioativos cafestol e caveol, compostos presentes no óleo de café verde. Esses bioativos podem ser responsáveis por aumentar o colesterol sérico, causar alterações no fígado, e também nas enzimas hepáticas (TVERDAL; SKURTVEIT, 2003).

No entanto não é possível afirmar que o aumento do peso absoluto e relativo do fígado está diretamente relacionado ao óleo de café verde ou aos diterpenos, pois nos achados histológicos do órgão, não se detectou alterações estruturais, processos inflamatórios, apoptose ou hemorragias.

Ao avaliar o peso relativo dos rins dos animais do experimento de toxicidade de doses repetidas (Figura 31), a análise estatística mostrou diferença significativa no peso relativo deste órgão para o grupo de maior dose ($p<0,05$). O pós-teste de Dunnet's mostrou aumento do peso relativo os rins dos animais expostos à dose de 75 mg/kg, ($p<0,05$) quando comparados ao grupo controle. Porém na avaliação do peso absoluto dos rins, dos animais dos grupos tratados com o óleo de café verde (nas três doses), não foram observadas diferenças significativas.

Figura 31- Gráficos dos pesos relativo e absoluto dos órgãos-alvo fígado e rins (em g – peso do órgão / peso corpóreo x 100) dos ratos - 28 dias – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)

(A) peso relativo do fígado, (B) peso relativo dos rins, (C) peso absoluto do fígado, (D) peso absoluto dos rins.

5.3.4 Bioquímica e Hemograma (Toxicidade de doses repetidas)

A GGT (gama glutamil transferase) é uma enzima hepática que está presente na membrana celular e nas frações microssomais celulares. A elevação da concentração dessa enzima em nível sérico concomitante à elevação da fosfatase alcalina pode-se inferir a possibilidade de uma alteração no trato biliar (PINCUS; SHAFFNER, 1999).

A análise dos parâmetros bioquímicos dos animais que receberam o óleo de café verde durante 28 dias nas três doses de 25, 50 e 75 mg/kg, de acordo com a ANOVA de

uma via, foi possível observar diferenças significativas para os níveis de gama glutamiltransferase (GGT) ($p=0,0193$) (Figura 32). O pós teste de Dunnett apontou aumento deste parâmetro nos animais do grupo de 75mg/kg para a enzima GGT, sendo ($p<0,01$) comparado ao grupo controle.

Segundo Lima et al. (2013), foram observados efeitos hepatoprotetores em ratos expostos a café descafeinado e grãos verdes. Ao avaliar as enzimas hepáticas de ratos *Wistar* que receberam doses intraperitoneais de tetracloreto de carbono e doses diárias de bebida de café arábica, os compostos presentes no café, sendo eles o ácido clorogênico e a cafeína quantificados por HPLC, não demonstraram alterações de GGT (gama glutamil transferase) nos animais tratados com a infusão de café na dose diária de $5,7\text{mL/ kg}^{-1}$ de peso vivo, durante 15 dias, sendo essa dose equivalente a oito copos de 50 mL de infusão de café consumidos por um humano adulto. No entanto foram observadas alterações nas enzimas hepáticas AST e ALT

O estudo de toxicidade de doses repetidas (28 dias) do óleo de café verde extraído com CO_2 supercrítico, não demonstrou alterações significativas nas enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

Os bioativos como descrito por Dias et al. (2010), demonstraram efeitos hepatoprotetores, além de indução da degradação de substâncias tóxicas. O presente estudo apontou alterações bioquímicas como aumento das enzimas GGT, e LDH e respectivo efeito dose/dependente, claramente evidenciado em todos os parâmetros avaliados (bioquímicos hematológicos e histológicos). Esse fato sugere que para eliminar e metabolizar o óleo de café verde, o metabolismo celular dos animais passou por uma alteração enzimática no processo de biotransformação.

O aumento dessa enzima (GGT) pode sugerir que o metabolismo dos animais teve uma alteração no processo de biotransformação e metabolização do óleo de café verde. Embora, na avaliação histológica realizada não foi possível verificar alterações em níveis hepatobiliares, colestase (redução do fluxo biliar) e/ou hiperplasia biliar, ou mesmo lesão de colangiócitos (células epiteliais do canal biliar).

As fosfatases são enzimas que se encontram diretamente relacionadas à formação de tecidos ósseos e por atuarem com pH alcalino são chamadas de fosfatases alcalinas e estão presentes principalmente em tecidos ósseos, fígado, intestino, rins e placenta. As fosfatases encontradas em níveis plasmáticos, na análise dos parâmetros bioquímicos são oriundas de isoenzimas hepáticas e/ou ósseas. Essa enzima é considerada um marcador para disfunções hepatobiliares tais como cirrose hepática, hepatites virais, processos obstrutivos de ducto hepatobiliar e também alterações ósseas (PINCUS; ZIMMERMAN; HENRY, 1999).

Ao avaliar os parâmetros bioquímicos dos animais expostos ao óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico durante 28 dias, a análise de variância (ANOVA) de uma via apontou diferença estatisticamente significativa nos níveis de fosfatase alcalina (F.A.) ($p < 0,001$) entre os grupos expostos ao óleo de café verde nas doses de 25, 50 e 75mg/kg, comparados ao grupo controle. O pós-teste de Dunnett, apresentou diminuição deste do parâmetro em animais do grupo de 25mg/kg ($p < 0,01$), 50mg/kg ($p < 0,05$) e 75mg/kg ($p < 0,0001$) comparados ao grupo controle (Figura 32).

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos dos ratos submetidos aos ensaios (agudo e doses repetidas) demonstrou-se que ocorreu aumento nos parâmetros séricos de GGT e diminuição da fosfatase alcalina (F.A.).

O LDH (lactato desidrogenase) é uma enzima catalizadora no metabolismo anaeróbio na síntese de glicose. Alterações de LDH em níveis plasmáticos podem sugerir danos teciduais que podem ser utilizados no diagnóstico clínico e/ou na detecção de lesão celular do hepatócito (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2012; SILVA, 2002).

Ao avaliar os níveis de LDH, a ANOVA de uma via mostrou diferença significativa, ($p < 0,0010$). O teste de Dunnett apontou aumento nos níveis do LDH nos animais que receberam as doses de 25 mg/kg ($p < 0,01$), 50 mg/kg ($p < 0,05$) e 75mg/kg ($p < 0,001$) comprados animais do grupo controle (Figura 32).

A lactato desidrogenase é uma enzima intracelular que catalisa a reação de piruvato a lactato e encontra-se no citoplasma de todas as células do organismo, inclusive nas hemácias. Essa enzima também é encontrada no miocárdio, rins, fígado e músculos (PINCUS; ZIMMERMAN; HENRY, 1999).

A detecção de níveis elevados de LDH no soro pode ocorrer devido a uma moléstia ou alterações em tecidos contendo LDH (fígado, rins, tecido muscular, coração, pulmão). O aumento do nível sérico de LDH é normalmente encontrado em morte celular (PINCUS; ZIMMERMAN; HENRY, 1999).

O estudo com óleo de semente de uva onde foi usado o controle com óleo de milho, apresentou aumento da enzima LDH em níveis plasmáticos, porém as membranas celulares dos tecidos do miocárdio estavam íntegras, sem alterações histológicas, não apresentando assim cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade nos ratos expostos a dose de 2g/kg (peso vivo do animal) de óleo de semente de uva (AL-ATTAR, 2014).

O aumento do LDH (lactato desidrogenase) em nível sérico no experimento com o óleo de café verde não evidencia um efeito de toxicidade, evidenciando o resultado do estudo com o óleo de uva, que também descreveu aumento de LDH. No entanto, essa alteração isoladamente da enzima não é específica para nenhum órgão e com isso não é

possível inferir que houve o desenvolvimento de efeitos tóxicos sistêmicos baseando-se nessa alteração.

Figura 32- Parâmetros Bioquímicos dos ratos - 28 dias – Toxicidade doses repetidas- GGT, fosfatase alcalina e LDH (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).

(A) Gama glutamil transferase, (B) Fosfatase alcalina, (C) Lactato desidrogenase.

A albumina é uma proteína que em condições normais apresenta concentrações plasmáticas elevadas, também é equivalente a dois terços das proteínas totais do organismo. Sua principal função é a manutenção do estoque de aminoácidos, transporte de substâncias e proteínas plasmáticas. (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2012).

Para avaliar o tratamento do óleo de café verde frente aos parâmetros bioquímicos, dos ratos expostos ao óleo de café verde, a análise estatística (ANOVA de uma via) apontou diferença significativa para a os níveis de albumina sérica ($p < 0,0001$) *versus* grupo controle. O pós teste de Dunnett, apresentou aumento desta parâmetro nos grupos de 25mg/kg ($p < 0,0001$), 50mg/kg ($p < 0,0001$) e 75mg/kg ($p < 0,001$).

Segundo o estudo de Lima et al. (2013) a bebida (infusão) do café seja ele torrado, descafeinado ou verde tem ação de prevenir o acúmulo de gordura no fígado, mas na avaliação *in vivo*, não fez com que os animais expostos à bebida tivessem parâmetros bioquímicos dentro dos valores de referência. Outro parâmetro bioquímico importante avaliado foi a albumina sérica de ratos expostos à infusão de café descafeinado e torrado que apresentaram redução dos níveis de albumina sérica. Enquanto que no estudo com o óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico os animais apresentaram elevação nos níveis de albumina sérica, demonstrando novamente o efeito dose/dependente.

A concentração da glicose em níveis plasmáticos se constitui a partir de um equilíbrio entre produção e consumo de glicose no organismo. A concentração excedente é armazenada no fígado como glicogênio, um polímero da glicose que é biotransformado no fígado.

Quando analisado os níveis de glicose plasmática dos animais expostos ao óleo de café verde, através da ANOVA, observaram-se diferenças significativas ($p < 0,0001$), entre os grupos. O teste de Dunnett apontou diminuição na glicose sérica nas três doses estudadas 25mg/kg ($p < 0,01$), 50mg/kg ($p < 0,001$) e 75mg/kg ($p < 0,0001$) (Figura 33), quando comparadas ao grupo controle. Esses achados salientam os resultados de Cardoso et al. (2011), que mostrou que, o tratamento com tinturas de café solúvel, em ratos diabéticos, promoveu redução dos níveis de glicose que variaram entre 20 e 24%.

O fígado mantém os níveis sanguíneos da glicose, armazena a mesma como glicogênio quando ela é abundante e controla sua liberação quando os suprimentos do organismo estão baixos. Também no fígado o lactato é transformado em glicose (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2012).

O aumento nos níveis plasmáticos de glicose, observados no gráfico da Figura 34 do experimento de toxicidade de doses repetidas com óleo de café verde, elucidam a possibilidade de alteração no mecanismo de equilíbrio entre a produção e consumo de glicose em nível celular.

A diminuição da taxa de glicose pode elucidar a hipótese de que para biotransformar os diterpenos cafestol e caveol, o mecanismo celular hepático consumiu uma carga energética maior. A substância intracelular utilizada para fornecer energia para a maioria das funções celulares é o trifosfato de adenosina (ATP), ele tem a função de carreador de energia a nível celular (GUYTON; HALL, 2012).

A energia anaeróbia é derivada de alimentos sem o uso de oxigênio. O glicogênio contido no fígado, por exemplo, é considerada a melhor fonte energética em condições anaeróbias, pois ele é fosforilado, visto que a glicose tem que ser fosforilada antes de se tornar disponível a nível celular (GUYTON; HALL, 2012).

Segundo Cardoso et al. (2011), as substâncias como o ácido clorogênico, presente no café, podem ser úteis na prevenção e tratamento do diabetes. Evidências epidemiológicas também sugerem que o alto consumo de café pode reduzir o risco de diabetes *mellitus* tipo 2.

A diminuição dos níveis plasmáticos de glicose demonstrada neste estudo fundamenta um possível efeito hipoglicemiante do óleo de café verde, não excluindo assim a possibilidade de se obter uma atividade antidiabética relacionado aos bioativos cafestol e caveol em estudos futuros.

Os ácidos graxos comumente são utilizados pela maioria dos tecidos, exceto do sistema nervoso, os ácidos graxos são fontes de energia, servindo para manutenção do metabolismo basal, a temperatura corporal e fonte energética para exercícios (NAHAS, 1995).

Na análise bioquímica dos animais expostos ao óleo de café verde durante 28 dias, a ANOVA de uma via apresentou diferenças significativas nos níveis de triacilgliceróis ($p < 0,0001$), entre os grupos. O pós-teste de Dunnett apontou diminuição nos níveis de triglicerídeos dos animais do grupo de 25mg/kg ($p < 0,001$), 50mg/kg ($p < 0,01$) e 75mg/kg ($p < 0,0001$) (Figura 33). O estudo conduzido por Cardoso et al. (2011) demonstrou que o tratamento com tinturas de café solúvel, foi capaz de diminuir os níveis de triacilglicerídeos entre 51 a 57% em ratos diabéticos.

Nesses tecidos, os ácidos graxos são ativados e transformados dentro das mitocôndrias para serem degradados. A terceira etapa se constitui na degradação dos ácidos graxos etapa a etapa até se transformarem em acetil COA, que a seguir é processada pelo ácido cítrico (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2012).

Os triacilgliceróis são hidrolisados pelas lipases, pois os ácidos graxos liberados não são solúveis no plasma sanguíneo, sendo assim a albumina disposta na corrente sanguínea é ligada aos ácidos graxos, atuando como transportadora. Tais meios permitem que os ácidos graxos se tornem acessíveis como fonte de energia para os tecidos.

Figura 33- Parâmetros Bioquímicos dos ratos - 28 dias - albumina, glicose e triacilgliceróis – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).

(A) Albumina, (B) Glicose, (C) Triacilgliceróis.

A uréia tem como função principal excretar nitrogênio em nível celular, as concentrações em níveis plasmáticos são diretamente influenciadas pela reabsorção renal, se o consumo de água do animal é reduzido, esse fato aumenta a concentração sérica e isoladamente não representa um fator de alteração renal, se a creatinina, por exemplo, não se apresentou alterada nos animais dos experimentos agudo e de doses repetidas.

A avaliação bioquímica da uréia dos animais do experimento de toxicidade do óleo de café verde, a análise não paramétrica de Kruskal Wallis demonstrou diferenças significativas nos níveis de uréia ($p < 0,0108$). O pós-teste de Dunn's apontou aumento

deste parâmetro nas doses de 25 e 50mg/kg ($p<0,05$) (75mg/kg, ($p<0,01$) comparados aos animais do grupo controle, demonstrado na Figura 34.

Salienta-se que o aumento da concentração plasmática de uréia reflete sua taxa de produção durante o catabolismo de aminoácidos e sua excreção renal (GARCIA et al., 2006). Diante disso os achados do estudo evidenciam a possibilidade de que para o processo de eliminação do óleo de café verde, o organismo dos animais teve que passar por uma adaptação para excretar o óleo ao longo do período do tratamento.

Figura 34- Parâmetros Bioquímicos dos ratos - 28 dias - uréia – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão)

Os parâmetros bioquímicos (aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), e globulina (Figura 35)), dos animais que receberam tratamento durante 28 dias do óleo de café verde, de acordo com a ANOVA de uma via realizada, foi possível observar que não houve diferenças significativas nos animais expostos às doses de 25, 50 e 75 mg/kg do óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico enriquecido de diterpenos.

Esses parâmetros demonstram que as alterações enzimáticas nos parâmetros bioquímicos como o aumento da GGT, LDH, e a diminuição da fosfatase alcalina não caracterizam um quadro hepatotóxicos. Pois enzimas como ALT e AST, são as principais enzimas que aumentam o nível sérico quando ocorre um quadro de intoxicação, seja ele agudo ou doses repetidas.

Figura 35- Parâmetros Bioquímicos dos ratos - 28 dias, AST, ALT e globulina – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).

(A) Aspartato aminotransferase, (B) Alanina aminotransferase, (C) Globulina

A avaliação dos parâmetros bioquímicos, colesterol total, colesterol HDL, proteína total e creatinina (Figura 36), dos animais expostos ao tratamento com óleo de café verde enriquecido dos diterpenos cafestol e caveol (durante 28 dias), de acordo a ANOVA de uma via realizada, observou-se que não houve alterações significativas, nos animais expostos a dose de 25, 50 e 75 mg/kg do óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico.

Figura 36- Parâmetros Bioquímicos dos ratos - 28 dias - colesterol total, HDL, proteína total e creatinina – Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).

(A) Colesterol total, (B) Colesterol HDL, (C) Proteína total, (D) Creatinina.

As plaquetas denominam-se fragmentos de células anucleadas em formato de disco, se deslocam dos megacariócitos, na medula, diretamente para o fluxo sanguíneo. Sendo assim, as plaquetas tem a função mais importante na hemostasia normal, que é a formação do tampão hemostático que sela efeitos vasculares e apresentam uma superfície que recruta e concentra os fatores de coagulação ativados protegendo,

mantendo a integridade, vedando, formando agregados e tampões nos vasos e participando do processo de formação da fibrina (ROBBINS; COTRAN, 2010).

Os parâmetros hematológicos do estudo de toxicidade de doses repetidas (durante 28 dias) do óleo de café verde, a análise de variância (ANOVA), apontou diferença significativa somente nos níveis de plaquetas ($p=0,0008$). O pós-teste de Dunnett mostrou aumento significativo nos níveis de plaquetas nas três doses estudadas, 25mg/kg ($p<0,05$) 50mg/kg ($p<0,01$) e 75mg/kg ($p<0,001$) versus animais do grupo controle (Figura 37). Com relação à análise diferencial das células brancas, a ANOVA de uma via não apontou diferenças significantes entre os grupos (dados não mostrados).

Figura 37- Parâmetros Hematológicos dos ratos - 28 dias – plaquetas, leucócitos, hemoglobina e hematócrito - Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).

(A) Plaquetas, (B) Leucócitos, (C) Hemoglobina, (D) Hematócrito.

Os parâmetros hematológicos dos animais expostos às doses repetidas de 25, 50, 75 mg/kg do óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico, tais como eritrócitos, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, a análise de variância (ANOVA), não apresentou alterações significativas, demonstradas na Figura 38.

Figura 38- Parâmetros Hematológicos dos ratos - 28 dias – eritrócitos, VCM, hemoglobina corpuscular média, volume corpuscular médio - Toxicidade doses repetidas (óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico – Os dados são apresentados como média e respectivo erro padrão).

(A) Eritrócitos, (B) Volume corpuscular médio, (C) Hemoglobina corpuscular média, (D) Concentração de hemoglobina corpuscular média.

O estudo com camundongos expostos a um pré-tratamento com 100 mg/kg de peso vivo dos padrões de acetato de cafestol e acetato de caveol diluídos em óleo de oliva durante 3 dias, não apresentaram alterações nas enzimas hepáticas (AST e ALT), quando comparados com grupo controle. Esses animais foram expostos posteriormente a 20 mg/kg (peso vivo) de tetracloreto de carbono para indução de danos hepáticos, o pré-

tratamento com cafestol e caveol impediu a elevação das enzimas hepáticas em níveis séricos nos animais tratados com tetracloreto de carbono (LEE; CHOI; JEONG, 2007).

A diminuição dos níveis séricos de triglicerídeos e o aumento dos níveis de LDH reafirmam a hipótese de alteração do metabolismo celular hepático, pois tais alterações predizem o aumento da biotransformação de ácidos graxos, por um provável aumento de lipases, no mecanismo de transformação e distribuição dos ácidos graxos em energia. Visto que o aumento da LDH pode ser relacionado com o aumento da atividade glicolítica dos tecidos durante períodos de anaerobiose, causada por uma redução na oferta de oxigênio por estresse metabólico decorrente de demandar maiores cargas energéticas para o organismo para metabolizar o óleo de café verde (VIEIRA et al., 2006).

As alterações dos parâmetros bioquímicos podem também justificar a diminuição no ganho de peso e a manutenção do consumo de ração no final do experimento. Esses parâmetros podem sustentar também a hipótese de que os animais sofreram uma alteração no mecanismo de biotransformação do óleo de café verde convergindo assim para os resultados obtidos.

Óleos vegetais ricos em compostos bioativos, atualmente estão recebendo crescente interesse nas pesquisas devido ao seu papel na prevenção de doenças. No entanto, estudos toxicológicos são necessários para determinar a toxicidade e, assim, estabelecer critérios para a seleção de uma dose segura (TRAESSEL et al., 2014). O presente estudo é o primeiro a representar e demonstrar em níveis toxicológicos sobre o óleo de café verde enriquecido nos bioativos cafestol e caveol, o que pode contribuir para a utilização segura no futuro.

O ensaio toxicológico pré-clínico de toxicidade oral aguda e doses repetidas do óleo de café verde em ratos Wistar, não induziu morte de nenhum animal, quando esses foram submetidos à dose única de 2.000 mg/kg e as doses repetidas de 25, 50 e 75 mg/kg de peso vivo, por via oral.

Contudo vale ressaltar que as alterações bioquímicas em níveis séricos tais como o aumento de LDH, albumina e uréia, podem sugerir uma possível caracterização de mecanismo celular adaptativo, nos animais que foram expostos ao óleo de café verde. As mudanças dos parâmetros elucidam também a possibilidade de que o óleo de café verde enriquecido dos bioativos (cafestol e caveol) pode combater o estresse oxidativo das células hepáticas, mas esse mecanismo, todavia é desconhecido (LIMA et al., 2013).

Para afirmar as alterações observadas e confirmar o mecanismo de adaptação do organismo para biotransformar o óleo de café verde, mais estudos são necessários para que futuramente a ação dos bioativos (cafestol e caveol) seja desvendada.

5.3.5 HISTOLOGIA

A hemocaterese pode ser a provável causa do depósito de ferro encontrado na análise histológica do baço dos animais, expostos à dose de 75mg/kg (peso vivo) do óleo de café verde (Figura 39), tal alteração pode ter ocorrido devido à perda de plasticidade das plaquetas, que nessa condição são fagocitadas por macrófagos e o produto da fagocitose é utilizado na formação de novos eritrócitos. Essa reação fagocítica ocorre no baço, onde naturalmente em um animal sadio um terço das plaquetas são sequestradas para o órgão.

O resultado visto na histologia (depósito de ferro no baço dos animais expostos a dose de 75 mg/kg de óleo de café verde) do presente estudo corrobora com Cançado (2007), que relatou que o ferro em excesso é depositado gradativamente em vários órgãos ou tecidos, principalmente no fígado, baço, miocárdio, glândulas endócrinas e medula óssea, fato o qual pode ocasionar lesão celular e tecidual, fibrose e insuficiência funcional. O principal mecanismo de toxicidade do ferro relaciona-se com o ferro livre, ou seja, o não ligado à transferrina. Quando a quantidade de ferro absorvido ultrapassa a capacidade ferroquelante do organismo de armazená-lo e "neutralizá-lo", ocorre saída de ferro dos macrófagos para a circulação e, uma vez ultrapassada a capacidade de saturação da transferrina plasmática, o ferro livre em excesso é depositado nos hepatócitos em outras células parenquimatosas, e/ou no baço.

O ferro em excesso é tóxico para os tecidos do animal, e o mecanismo de peroxidação de lipídeos por reações de radicais livres catalisadas pelo ferro, promovem a estimulação da formação de colágeno por ativação das células hepáticas e a interação de espécies reativas de oxigênio e do próprio ferro com o DNA, provocando assim uma lesão celular ou caracterizando-se como um fator predisponente para carcinoma hepatocelular (ROBBINS; COTRAN, 2010).

As hemácias e plaquetas velhas ou parasitadas, ao perderem a sua flexibilidade e não conseguirem penetrar nos sinusoides, são fagocitadas pelos macrófagos, processo o qual é denominado hemocaterese. Os macrófagos são células com alta atividade, apresentam superfície irregular, com inúmeras saliências, e citoplasma contendo numerosos lisossomos que depositam suas enzimas nos vacúolos que contêm material fagocitado, formando os fagossomos, onde vai ser realizada a digestão do material fagocitado. Após esse processo o ferro é depositado no interior das células do baço (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A hemoglobina, resultante da digestão de hemácias, desdobra-se nas porções heme e globina. A fração globina é quebrada em seus constituintes de aminoácidos que vão para a circulação sanguínea. As moléculas de ferro, da fração heme, no interior dos

macrófagos, se agrupam formando um pigmento denominado de hemossiderina (alta concentração de ferro) que são levados à medula óssea pela transferrina, onde são utilizadas para formação de novas hemácias (GUYTON; HALL, 2011; FREITAS et al., 2009).

A provável sobrecarga de ferro no mecanismo de absorção, metabolização, distribuição e excreção, pode sugerir que de fato houve um aumento da fagocitose de hemácias por macrófagos resultando no aumento da produção de pigmentos férricos de hemossiderina. Fato que justifica a fagocitose de hemácias velhas ou com perda de plasticidade (FREITAS et al., 2009). Os dados as alterações histológicas do grupo tratado com óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico na dose de 75 mg/kg, é demonstrado na Figura 39, onde pode ser visto o depósito de ferro nas células do baço.

Figura 39- Histologia do Baço dos animais tratados versus animais controle (A) Baço do tratamento de 75 mg/kg, (B) Baço do animal controle (coloração HE (hematoxilina e eosina) aumento de 100 x

(A) As setas demonstradas na figura indicam o depósito de ferro no baço dos animais

(B) Imagem do baço de um animal controle (coloração HE (hematoxilina e eosina)
aumento de 100 x

A análise histopatológica dos fragmentos de fígado, rim, timo e coração coletados na necropsia dos animais de ambos os grupos controle e 75 mg/kg não evidenciou alterações dignas de nota associadas ao tratamento. Porém, foi possível notar que em 2 animais do grupo tratado com óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico (2/9) demonstraram a presença exacerbada de tecido linfoide nos cortes de pulmão dos animais, como pode ser verificado na Figura 40.

No entanto, o teste estatístico de Qui-quadrado demonstrou que não houve alterações significativas ao analisar a porcentagem de animais com pulmão acometido, expostos ao óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico, quando comparados com o grupo controle, sendo $p = 0,1558$.

Figura 40- Histologia do pulmão dos animais dos animais tratados versus animais controle
(A) Pulmão do tratamento de 75 mg/kg (coloração HE (hematoxilina e eosina) aumento de 40x

(A) Pulmão do grupo exposto à dose de 75 mg/kg de óleo de café verde

(B) Pulmão dos animais expostos à dose de 75 mg/kg do óleo de café verde (coloração HE (hematoxilina e eosina) aumento de 100x (aumento da população linfóide)

O aumento do peso relativo do timo o qual produz células imunológicas que compõem o mecanismo de defesa contra patógenos em organismos vivos (GUYTON; HALL, 2012), pode ter ocorrido devido às alterações pulmonares observadas na histologia, pois os linfócitos T tem sua origem na medula óssea, porém logo após migram primeiramente para o timo, onde serão divididos e desenvolverão células diversas para atuarem contra diferentes antígenos específicos, com isso, o aumento do peso relativo do timo pode estar associado a um aumento na produção de células de defesa contra o microrganismo presente no pulmão dos animais. Contudo o timo não evidenciou alterações histopatológicas dignas de nota ou associadas ao tratamento.

Entretanto a alteração do peso relativo do timo pode ser relacionada com a predisposição anatômica dos roedores para o desenvolvimento de infecções de vias aéreas superiores. Deste modo uma provável infecção pulmonar pode ter sido desenvolvida pelos animais do experimento, mas vale ressaltar que a moléstia pode ter sido desenvolvida por causa do *Mycoplasma pulmonis* (parte da microbiota respiratória natural de ratos) (MORAILLON et al., 2013).

Segundo Timenetsky, Summa e Lucca (1992) ratos e camundongos são denominados hospedeiros naturais de algumas espécies de micoplasma. Esses autores confirmam os achados histológicos de alterações sugestivas de proliferação do micoplasma no pulmão dos animais.

As alterações histológicas dos animais tratados durante 28 dias com o óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico (nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg) podem ou não estar associadas ao tratamento, no entanto mais estudos são necessários para caracterizar o aparecimento de lesões histológicas relacionadas ao óleo de café verde.

Os resultados do estudo de toxicidade de doses repetidas durante 28 dias não caracterizam um quadro de intoxicação, fato o qual converge com os resultados do experimento anterior de toxicidade aguda. Ambos os testes de toxicidade predizem que um efeito de mecanismo celular adaptativo pode ser visto nos animais expostos ao óleo de café verde.

As alterações de variação de peso, manutenção do consumo de ração, alterações bioquímicas, hematológicas e histológicas sugerem evidências de que, um mecanismo de adaptação possa ter ocorrido, pois os animais tiveram alterações sugestivas de que para metabolizar, absorver e excretar o óleo de café verde enriquecido (cafestol e caveol), o organismo pode ter alterado o processo de biotransformação, processo o qual é denominado como alteração química pelo qual sofre o xenobiótico no organismo, comumente sob a ação de enzimas específicas e/ou inespecíficas (MEYER, 1996). Juntamente com os fenômenos de absorção, distribuição e excreção, a biotransformação também participa da regulação de níveis plasmáticos de drogas e substâncias em geral.

O provável processo de alteração na biotransformação pode ser visto de forma mais clara no estudo onde a exposição ao óleo ocorreu durante 28 dias seguidos, sendo que os animais ao final o experimento apresentam uma estabilização no consumo de ração, diminuição da glicose sérica e dos triglicerídeos, fato o qual sugere que se os animais fossem expostos por um período maior ao óleo de café verde, efeitos de alteração de metabolismo celular poderiam ser observados e melhor descritos. Esses achados fornecem embasamento para estudos futuros da utilização do óleo de café verde com altas concentrações dos bioativos cafestol e caveol na redução dos índices glicêmicos em diabéticos e no controle da obesidade.

No entanto não foram avaliados parâmetros específicos, tais como fatores de expressão genica, e proteínas específicas do metabolismo celular, para que os achados nos experimentos pudessem ser confirmados.

6 CONCLUSÕES

Quanto ao rendimento de óleo de café verde extraído com líquido pressurizado (PLE), o Delineamento Composto Central Rotacional DCCR² foi preditivo, sendo a condição 4 (70° C e 8 min.) a de maior rendimento de óleo 9,78%. O rendimento da extração mostrou que na faixa de temperatura estudada o tempo estático (tE) empregado foi a variável que demonstrou maior influência positiva no rendimento. Contudo essa técnica não foi preditiva para as concentrações dos bioativos cafestol e caveol, sendo que nenhum dos fatores estudados influenciou positivamente ou negativamente nos diterpenos.

A quantificação dos bioativos cafestol e caveol do óleo de café verde extraído via CO₂ supercrítico mostrou concentrações semelhantes ao estudo De Oliveira et al. (2014) corroborando com o fato de que a extração supercrítica tem uma indicação positiva no desenvolvimento de fitoterápicos a partir de matrizes vegetais.

A avaliação de toxicidade do óleo de grãos de café verde enriquecidos dos diterpenos cafestol e caveol nos estudos agudo e doses repetidas demonstrou que o óleo de café verde promoveu uma alteração no mecanismo de biotransformação dos ratos expostos a dose máxima de 2.000 mg/kg (peso vivo) no estudo agudo e as doses repetidas de 25, 50 e 75 mg/kg (peso vivo) durante 28 dias dos animais expostos ao óleo de café verde por gavagem.

A deposição de ferro no baço desses animais corrobora com a hipótese de que o ferro acumulado ocorre por um aumento da fagocitose de plaquetas e hemácias que perdem a plasticidade ou são parasitadas, sendo o ferro um dos produtos da fagocitose dos macrófagos. Essa alteração não pode ser justificada, pois o ferro a nível plasmático não foi quantificado na análise bioquímica.

Mais estudos são necessários para confirmar a hipótese de que o óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico possa de fato gerar alteração do metabolismo celular. Estudos com marcadores de células pró-inflamatórias podem ser uma das alternativas.

Contudo pode-se predizer que o óleo de café verde extraído com CO₂ supercrítico não apresentou evidências claras que pudessem caracterizar um quadro toxicológico para os animais nas doses estudadas. Na literatura não existem estudos toxicológicos do óleo de café verde, fato o qual esse estudo poderá embasar estudos futuros para que a bioatividade a nível celular dos diterpenos cafestol e caveol possa ser descrita.

As alterações verificadas no presente estudo levam a crer que um organismo vivo passa por um processo adaptativo ao ser exposto a uma substância por um tempo determinado, fato o qual sustenta o uso de medicamentos fitoterápicos com cautela, pois

a relação custo/benefício deve ser avaliada sempre, pois efeitos colaterais ocorrem com o uso prolongado de qualquer substância.

Com relação ao estudo de 28 dias, foram observadas diferenças no consumo de ração, peso corpóreo, bem como, alterações bioquímicas, hematológicas e histológicas. Sendo assim, mais estudos são necessários para verificar a eficácia e segurança do óleo de café de verde. Estudos como a exposição em animais durante 90 dias das doses utilizadas no estudo de 28 dias, estudos de genotoxicidade e carcinogênese devem ser realizados para completar a avaliação pré-clínica.

7 REFERÊNCIAS

AMENI, A. Z. **Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de Casearia sylvestris, em ratos Wistar**. 2011. 95 f Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ACHESON, K. J. et al. Caffeine and coffee: their influence on metabolic rate and substrate utilization in normal weight and obese individuals. **American Society for Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 33, n. 5, p. 989-997, 1980.

AL-ATTAR, A. M. Effect of grapeseed oil on diazinon-induced physiological and histopathological alterations in rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Amsterdam, v. 22, p. 284-292, 2014.

ALVES, R. C. et al. Discrimination between arabica and robusta coffee species on the basis of their tocopherols profiles. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 114, p. 295-299, 2009.

AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. Arlington: AOAC International, 1995.

_____. **Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL**. 18nd ed. Gaithersburg, MD, USA: AOAC INTERNATIONAL, 2005.

_____. **Test No. 407**: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing, 2008.

ARAÚJO, M. A.; SANDI, D. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 101, p. 1087-1094, 2006.

AZEVEDO, A. B. A. et al. Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 44, p. 186-192, 2008.

BAE, J. W. et al. Characterizing the human equivalent dose of herbal medicines in animal toxicity studies. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 162, p. 1-6, 2015.

BARBOSA, H. M. A. et al. Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 85, p. 165-172, 2014.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 53, n. 5, p. 646-56, 2009.

BENTHIN, B.; DANZ, H.; HAMBURGER, M. Pressurized liquid extraction of medicinal plants. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 837, n. 1, p. 211-219, 1999.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

BISHT, S.; SISODIA, S. S. Coffea arabica: a wonder gift to medical science. **Journal of Natural Pharmaceuticals**, Mumbai, v. 1, n. 1, p. 58-65, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução – RE nº 90. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução n. 251 de 07 de agosto de 1997. Normas de pesquisa com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1997. p. 21117.

BROGLE, H. CO₂ in solvent extraction. **Chemistry and Industry**, Chichester, p. 385-390, June. 1982.

BRUNNER, G. In: BAUMGÄRTEL, H.; FRANCK, E. U.; GRÜNBEIN, W. (Eds.). **Gas extraction**: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and application to separation processes. New York: Springer, 1994.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, London, v. 67, p. 21-33, 2005.

CAMPARDELLI, R.; BALDINO, L.; REVERCHON, E. Supercritical fluids applications in nanomedicine. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 101, p. 193-214, 2015.

CAMPOS, S. V. et al. Toxicidade sobre aguda e crônica. In: CORRÊA, C. L. et al. **Bases científicas para avaliação da toxicidade de agrotóxicos**. São Paulo: ILSI-Brasil-Internacional Life Science Institute do Brasil, 2009. cap. 4, p. 95-130.

CANÇADO, R. D. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 316-326, 2007.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R. et al. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1089, p. 1-17, 2005.

CARDOSO, L. M. et al. Efeito das tinturas de café torrado e moído nos níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e glicose em ratos diabéticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, v. 12, p. 77-81, 2011.

CARDOSO, L. M. et al. Influência de tinturas de fruto cereja e verde de café no tratamento do Diabetes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 4, p. 249-253, 2010.

CAVALCANTE, W. L. G. et al. Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 112, p. 490-497, 2007.

CAVIN, C. et al. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 40, p. 1155-1163, 2002.

CAVIN, C. et al. Protective effects of coffee diterpenes against aflatoxin B₁-induced genotoxicity: mechanisms in rat and human cells. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 39, p. 549–556, 2001.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Reduction, refinement and replacement of animal use in toxicity testing: an overview. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.

CHARTIER, A. et al. Optimization of the isolation and quantitation of kahweol and cafestol in green coffee oil. **Talanta**, Amsterdam, v. 117, p. 102-111, 2013.

CHEMAT, F; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 7, p. 8615-8627, 2012.

CHIACCHIERINI, E. et al. Impact evaluation of innovative and sustainable extraction technologies on olive oil quality. **Trends in Food Science & Technology**, Kidlington, v. 18, n. 6, p. 299-305, 2007.

COSTENTIN, C. E. et al. Association of caffeine intake and histological features of chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 54, p. 1123-1129, 2011.

CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 2a, 2009.

DE MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 92, p. 115-176, 2014.

DE OLIVEIRA, P. M. A. et al. Enrichment of diterpenes in green coffee oil using supercritical fluid extraction— characterization and comparison with green coffee oil from pressing. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 95, p. 137-145, 2014.

DEL VALLE, J.M. Extraction of natural compounds using supercritical CO₂: going from the laboratory to the industrial application. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 96, p. 180-199, 2015.

DIAS, R. C. E. et al. Evaluation of kahweol and cafestol in coffee tissues and roasted coffee by a new high- performance liquid chromatography methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 88-93, 2010.

DINIZ, M. F. F. et al. Padronização do parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos swiss e ratos wistar. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 10, n. 2, p. 171-176, 2006.

FERRARI, M. et al. Interfacial properties of coffee oil. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 365, p. 79-82, 2010.

FERRAZZANO, G. F. et al. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 80, p. 255-262, 2009.

FORMBY, W. A. et al. Green coffee beans effects on oral carcinogenesis in the hamster. In: ANNUAL SESSION OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR DENTAL RESERCH, 65., 1987, Chicago. **Proceedings...** Chicago, 1987. (Journal of Dental Research, v. 66, Special.66, 159 abstracts, 1987).

FURTADO, S. K. et al. Prevention of rat liver fibrosis and carcinogenesis by coffee and caffeine. **Food and Chemical Toxicology**, Killington, v. 64, p. 20-26, 2014.

GARCIA, R. C. et al. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre o perfil bioquímico e o desempenho de coelhas jovens. **Acta Scientiarum. Animal Science**, Maringá, v. 26, n. 1, p. 57-67, 2004.

GOLDIM, J. R. A avaliação ética da investigação científica de novas drogas: a importância da caracterização adequada das fases da pesquisa. **Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre e Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 27, n. 1, p. 66-73, 2007.

GUBBELS-VAN HAL, W. M. L. G. et al. An alternative approach for the safety evaluation of new and existing chemicals, an exercise in integrated testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Maryland Heights, v. 42, n. 3, p. 284-295, 2005.

GUMY, C. et al. Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by plant extracts used as traditional antidiabetic medicines. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 80, p. 200–205, 2009.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Fundamentos de fisiologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

HAMID, A. M. S.; REHMAN, K.; CHEN, S. Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus. **Nutrition**, New York, v. 13, p. 11-20, 2014.

KIM, H. G. et al. The coffee diterpene kahweol inhibits tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in human endothelial cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Maryland Heights, v. 217, p. 332-341, 2006.

KITZBERGER, C. S. G. et al. Diterpenes in green and roasted coffee of *Coffea arabica* cultivars growing in the same edapho-climatic conditions. **Journal of Food Composition and Analysis**, Maryland Heights, v. 30, p. 52-57, 2013.

KUMARI, P. et al. Herbal fight for obesity: A review. **International Journal of Pharmaceutical Research and Development**, India, v. 3, n. 4, p. 193-201, 2011.

LEE, D. R. et al. Coffee consumption and risk of fractures: a systematic review and dose–response meta-analysis. **Bone**, Philadelphia, v. 63, p. 20-28, 2014.

LEE, K. J.; CHOI, J. H.; JEONG, H. J. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 45, p. 2118-2125, 2007.

LIMA, A. R. et al. Effect of decaffeination of green and roasted coffees on the in vivo antioxidant activity and prevention of liver injury in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 23, n. 3, p. 506-512, 2013.

MACHADO, A. P. D. F. et al. Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) residues: a comparison with conventional methods. **Food Research International**, Kidlington, 2015. (In press).

MACHADO, S. R.; PARISE, E. R.; CARVALHO, L. Coffee has hepatoprotective benefits in Brazilian patients with chronic hepatitis C even in lower daily consumption than in American and European populations. **The Brazilian Journal Infect Disease**, Salvador, v. 18 p. 170-176, 2014.

MARTÍN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Discrimination between arábica and robusta Green coffee varieties according to their chemical composition, **Talanta**, Amsterdam, v. 46, p. 1259-1264, 1998.

MC WHORTER, K. et al. Kahweol and cafestol effects on oral cancer. **Journal of Dental Research**, Thousand Oaks, v. 67, Special, 338 abstracts, 1988.

MILLER, E. G. et al. Kahweol and cafestol: inhibitors of hamster buccal pouch carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 15, p. 41-46, 1991.

MORAILLON, R. et al. **Manual elsevier de veterinária**: diagnóstico e tratamento de cães, gatos e animais exóticos. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

MURIEL, P.; ARAUZ, J. Review coffee and liver diseases. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 81, p. 297–305, 2010.

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 703, n. 1, p. 8-18, 2011.

NAHAS, M.V. **Obesidade, controle de peso e atividade física**. Londrina: Midiograf, 1999. 85 p.

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

NUGENT, P.; DUNCAN, J. N.; COLAGIOVANNI, D. B. The preparation of a preclinical dossier to support an investigational new drug (ind) application and first-in-human clinical trial. In: FAQI, A. S. **A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development**. London: Elsevier, 2013. p. 309-333.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2008.

OLIVEIRA, A. L. et al. Brazilian roasted coffee oil obtained by mechanical expelling: compositional analysis by GC/MS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, p. 677-682, 2005.

OLIVEIRA, A. L. et al. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). **Food chemistry**, Amsterdam, v. 145, p. 522-529, 2014.

OLIVEIRA, A. L. et al. Sensory evaluation of black instant coffee beverage with some volatile compounds present in aromatic oil from roasted coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, p. 76-80, 2009a.

OLIVEIRA, A. L. et al. Prediction of the solubility of aromatic compounds from Brazilian roasted coffee (2-methylpyrazine; 2-furfuryl alcohol; 2,5-dimethylpyrazine: gamma-butyrolactone and 2-furfurylacetate) in SC-CO₂. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, Tokyo, v. 42, p. 219-230, 2009b.

OLIVEIRA, A. L. et al. Sensory and yield response surface analysis of supercritical CO₂ extracted aromatic oil from roasted coffee. **Journal of Food Science and Technology**, New Delhi, v. 38, p. 38-42, 2001.

OLIVEIRA, D. A. **Caracterização fitoquímico e biológica de extratos obtidos de bagaço de uva (*Vitis vinífera*) das variedades merlot e syrah**. 2010. 211 f. Dissertação (Mestrado) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

ONG, E. S.; WOO, S. O.; YONG, Y. L. Pressurized liquid extraction of berberine and aristolochic acids in medicinal plants. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 904, n. 1, p. 57-64, 2000.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Test No. 420**: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Paris: OECD Publishing, 2001.

ORTIZ, R. W. P.; BENINCÁ, C.; ZANOELO, E. F. Cyclically pressurized extraction of solutes from ground coffee: kinetic experiments and modeling. **Separation and Purification Technology**, Kidlington, v. 141, p. 256-262, 2015.

PERRONE, D. et al. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 106, p. 859-867, 2008.

PINCUS, M. R.; ZIMMERMAN, H. J.; HENRY, J. B. Emzimologia clínica. In: HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. Barueru: Manole, 1999. p. 268-295.

POVH, N. P.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita*). **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 21, p. 245-256, 2001.

PRESTES, O. D. et al. O estado da arte na determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 5, p. 697-710, 2013.

QUENTAL, C.; SALLES FILHO, S. Ensaio clínico: capacitação nacional para avaliação de medicamentos e vacinas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 408-424, 2006.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 38, p. 146-166, 2006.

REVERCHON, E.; SENATORE, F. Supercritical carbon dioxide extraction of chamomile essential oil and its analysis by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, p. 154-158, 1994.

RIZVI, S. S. H. et al. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. **Food Technology**, Chicago, v. 40, p. 55-65, 1986.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Pathologic basis of disease**. Philadelphia: Saunders, 2010.

SALDANA, M. D. A.; MOHAMED, R. S.; MAZZAFERA, P. Extraction of cocoa butter from Brazilian cocoa beans using supercritical CO₂ and ethane. **Fluid Phase Equilibria**, Amsterdam, v. 194, p. 885-894, 2002.

SALDANA, M. D. A.; ZETZI, C.; MOHAMED, R. S. Decaffeination of guaraná seeds in a microextraction column using water-saturated CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 22, p. 199-127, 2002.

SANDLER, S. I. **Chemical and engineering thermodynamics**. 2nd ed. New York: Wiley, 1989. 622 p.

SHIMODA, H.; SEKI, E.; AITANI, M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 1-9, 2006.

SI, H. et al. High corn oil dietary intake improves health and longevity of aging mice. **Experimental Gerontology**, Philadelphia, v. 58, p. 244-249, 2014.

SILVA, F. N. Isquemia hepática normotérmica em ratos: estudo da lesão celular através do uso de clampeamento pedicular contínuo e intermitente. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 6, p. 342-348, 2002.

SILVA, G. **Extração de pigmentos do urucum com CO₂ supercrítico**. 1999. 208 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. São Paulo: Manole, 2008.

STATSOFT, Inc. **Statistica (data analysis software system)**: version 10. 2004. Disponível em: <www.statsoft.com>. Acesso em: 10 abr. 2015.

SUTTER, L. E. D. N.; SILVA, M. F. F.; CASSEL, E. Extração supercrítica, uma nova tecnologia industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 14, p. 3-10, 1994.

TANAKA, K. et al. Anti-obesity and hypotriglyceridemic properties of coffee bean extract in SD rats. **Food Science and Technology Research**, Basel, v. 15, n. 2, p. 147-152, 2009.

TIMENETSKY, J.; SUMMA, M. E. L.; DE LUCCA, R. R. Mycoplasma pulmonis e/ou Mycoplasma arthritidis em animais de laboratório (ratos e camundongos) de diferentes biotérios. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 45-50, 1992.

TRAESEL, G. K.; et al. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 74, p. 320-325, 2014.

TREMAN, J. The error of determination of toxicity. **Proceedings of the Royal Society**. v. 101B, p. 483-514, 1927.

TVERDAL, A.; SKURTVEIT, S. Coffee intake and mortality from liver cirrhosis. **Annals of Epidemiology**, New York, v. 13, n. 6, p. 419-423, 2003.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiás, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VANDENBURG, H. J. et al. Comparison of pressurised fluid extraction and microwave assisted extraction with atmospheric pressure methods for extraction additives from polypropylene. **Analyst**, Cambridge, v. 124, n. 3, p. 397-400, 1999.

VAN DAM, R. M.; FESKENS, E. J. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. **Lancet**, London, v. 360, p. 1477-1478, 2002.

VIEIRA, W. H. B. et al. Adaptação enzimática da LDH em ratos submetidos a treinamento aeróbio em esteira e laser de baixa intensidade. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, São Carlos, v. 10, n. 2, p. 205-211, 2006.

VIGNOLI, J. A. et al. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food Research International**, Kidlington, v. 1, p. 1-7, 2013.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, Kidlington, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006.

WATERS. **Extrator TharSCF**. Disponível em: <www.waters.com>. Acesso em: 10 abr. 2015.

YUN, J. W. Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. **Phytochemistry**, Kidlington, v. 71, p. 1625-1641, 2010.

ZENEBON, O.; PASCUET, S. N.; TIGLEA, P. (Coords.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, 1020 p. Disponível em < http://www.crq4.org.br/sms/files/file/analisedealimentosial_2008.pdf >. Acesso em: 17 ago. 2015.