UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Café (*Coffea arabica*, L.) submetido a diferentes
condições de torrefação: caracterização química e
avaliação da atividade antioxidante e sensorial**

Fabiana Amaral Araujo

Tese para obtenção do grau de

DOUTOR

Orientador:

Prof. Titular Jorge Mancini-Filho

São Paulo
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Café (*Coffea arabica*, L.) submetido a diferentes condições de torrefação: caracterização química e avaliação da atividade antioxidante e sensorial

Fabiana Amaral Araujo

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Titular Jorge Mancini Filho

São Paulo
2007

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Araujo, Fabiana Amaral
A663a Café (*Coffea arabica*, L.) submetido a diferentes condições
de torrefação : caracterização química e avaliação da atividade
antioxidante e sensorial / Fabiana Amaral Araújo. -- São
Paulo, 2007.
130p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental
Orientador: Mancini Filho, Jorge

1. Antioxidante : Nutrição 2. Alimento : Composto fenólico :
Ciência dos alimentos 3. Café : Tecnologia I. T. II. Mancini
Filho, Jorge, orientador

641.19 CDD

Fabiana Amaral Araujo

Café (*Coffea arabica*, L.) submetido a diferentes condições de torrefação: caracterização química e avaliação da atividade antioxidante e sensorial

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profº. Titular Jorge Mancini Filho
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Fabiana Amaral Araujo no Programa: Ciência dos Alimentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 23 dias do mês de janeiro de 2007, no(a) Aud. Paulo de Carvalho FCF realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Fabiana Amaral Araujo, apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos - Área: Nutrição Experimental, intitulada:

"Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos do café (Coffea arabica, L.)"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Jorge Mancini Filho	Presidente	FCF - USP	<i>aprovado</i>
Deborah Helena Markowicz Bastos	Suplente	FSP - USP	<i>aprovado</i>
Inar Alves de Castro	Suplente	FCF - USP	APROVADA
Anna Lucia Casañas Haasis Villavicencio	Titular	IPEN - Externo	APROVADA
Roseane Fett	Titular	IAL - Externo	<i>aprovada</i>
Resultado Final:			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Edilson Feitosa dos Santos, Técnico Acadêmico, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as) São Paulo, aos 23 dias do mês de janeiro de 2007.

Deborah Helena Markowicz Bastos

Anna Lucia Casañas Haasis Villavicencio

Jorge Mancini Filho
Orientador(a)

Inar Alves de Castro

Roseane Fett

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

“Sem as nuvens não haverá chuva”.

(Provérbio chinês)

Aos meus pais Antonio e Antonietta pelo apoio incondicional, por sempre estarem de “mãos dadas” comigo me apoiando com gestos e palavras que me acalutam e me fortalecem a cada passo da minha caminhada. Caminhada que fizemos juntos até alcançar essa vitória que é nossa!

A Deus pela graça da vida e por me iluminar em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao professor Jorge Mancini Filho pela oportunidade de me desenvolver profissionalmente, por sua valiosa orientação em todas as etapas desse trabalho, pela amizade e estímulo sempre demonstrados.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica e em especial ao Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental agradeço pela ajuda e amizade de professores e funcionários (Secretaria de Pós-Graduação, Assistência Acadêmica, Diretoria da FCF, Setor de Informática, Biotério, Manutenção e Portaria).

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa, a EMBRAPA CAFÉ e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro para realização desse trabalho.

Aos companheiros e colegas do laboratório de Lípidos: à técnica responsável pelo laboratório Rosângela Pavan Torres, aos pós-graduandos Maria Elena D. Bernal Gómez, Maria de Lourdes R. Giada, Elaine A. A. Sanibal, Fernanda Archilla Jardini, Elma R. S. A. Wharta, Alessandro de Lima, Denise D'Agostini, Ana Mara Oliveira e Silva, Claudimar de Jesus Oliveira. Às alunas de iniciação científica, Juliana Meiwald, Mariana Garbi, Tatiane Bottan, Priscila R. B. Broinizi e Marina D. Paes. Aos colegas que trabalharam um período em nosso laboratório Lúcia Perret, Janaína Baggio, Reginaldo A. Trindade, Chiu Chi Ming, professor Aléxis Vidal Novoa. Agradeço pela troca de conhecimentos e por toda a colaboração.

À amiga Maria Elena D. Bernal Gómez pela amizade sincera e valiosa. Agradeço pelo companheirismo e incentivo sempre demonstrados.

Aos bibliotecários da biblioteca do conjunto das químicas Adriana de Almeida Barreiros e Angelo A.A.C. da Cruz pela cordialidade no atendimento. Agradeço também à bibliotecária Leila Aparecida Bonádio pela atenção e amizade e pela revisão das referências bibliotecárias.

Ao Dr. Antônio Marcos A. Levy pela atenciosa correção gramatical dessa tese e pela gentileza dedicada.

A professora Judite Kardos Kloetzel pela tradução do resumo dessa tese e pelo atendimento solícito e gentil.

À Cia de Café Cacique S.A. pelo fornecimento dos grãos de café para realização do trabalho.

À empresa Cargil Agrícola S.A. pela doação do óleo de soja para avaliação da atividade antioxidante do café pelo método do Rancimat.

Ao ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos – Campinas- S.P.), em especial à pesquisadora Sílvia C.S.R. Moura pela gentileza em oferecer a torradora de prova para processamento das amostras.

Às famílias Kawatha e Galindo meu sincero agradecimento por terem me recebido de modo tão acolhedor em seus lares, quando participei da seleção de pós-graduação e quando me mudei para São Paulo.

Aos amigos Luciana de Matos, Alan Alves Brito, Rhowena Jane Barbosa de Matos pela amizade, pelo apoio e por tantos momentos de alegria e companheirismo.

Ao amigo Adalberto Manoel da Silva doutorando do Instituto de Química – USP por me ajudar de forma tão solícita e atenciosa nas explicações sobre reações químicas.

A todos aqueles, que citados ou não, contribuíram de alguma forma para realização dessa conquista.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E ANEXOS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Lipídios.....	03
2.2. Oxidação lipídica.....	04
2.3. Estresse oxidativo.....	05
2.4. Antioxidantes.....	07
2.5. Café.....	09
2.5.1. Atividade antioxidante das melanoidinas.....	12
2.5.2. Atividade antioxidante de cafeína.....	13
2.5.3. Atividade antioxidante de compostos heterocíclicos.....	15
2.5.4. Atividade antioxidante dos ácidos clorogênicos.....	16
2.5.4.1. Biodisponibilidade de ácidos clorogênicos.....	18
2.6. Perspectivas para o uso de antioxidantes.....	19
2.6.1. Perspectivas para o uso de antioxidantes na indústria.....	19
2.6.2. Antioxidantes e câncer.....	19
2.6.3. Antioxidantes, doenças cardiovasculares e desordens neurológicas.....	21
2.7. Análise sensorial.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Material.....	27
4.1.1. Animais.....	27
4.1.2. Amostras.....	27
4.1.3. Reagentes.....	27
4.2. Métodos.....	28
4.2.1. Torrefação do café.....	28
4.2.2. Obtenção do pó de café.....	29
4.2.3. Determinação da composição centesimal.....	29
4.2.4. Determinação do perfil de ácidos graxos dos grãos de café.....	30
4.2.4.1. Esterificação e identificação de ácidos graxos.....	30
4.2.4.2. Análise do perfil de ácidos graxos dos grãos de café por cromatografia gasosa.....	31
4.2.5. Obtenção de extratos dos grãos de café.....	32
4.2.6. Obtenção das frações de ácidos fenólicos dos grãos de café.....	34
4.2.6.1. Obtenção de ácidos fenólicos livres (AFL).....	36
4.2.6.2. Tratamento do resíduo dos ácidos fenólicos livres.....	36

4.2.6.3. Obtenção de ésteres de ácidos fenólicos solúveis (EAFS).....	36
4.2.6.4. Obtenção de ácidos fenólicos insolúveis ligados (AFIL).....	37
4.2.7. Determinação de compostos fenólicos totais.....	38
4.2.8. Identificação dos compostos fenólicos nas frações de ácidos fenólicos.....	39
4.2.9. Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	40
4.2.10. Determinação da atividade antioxidante pelo método do Rancimat..	43
4.2.11. Análise sensorial.....	45
4.2.11.1. Recrutamento dos provadores.....	46
4.2.11.2 Condições do teste, preparo e apresentação das amostras.....	46
4.2.12. Ensaio biológico.....	47
4.2.12.1. Definição do tratamento a ser administrado no procedimento experimental com animais de laboratório.....	47
4.2.12.2. Procedimento experimental com animais de laboratório.....	48
4.2.12.3. Caracterização da fração lipídica do plasma dos animais.....	49
4.2.12.4. Medida da lipoperoxidação pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	49
4.2.12.5. Quantificação de proteínas nos tecidos.....	50
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
6.1. Composição centesimal.....	52
6.2. Determinação do perfil de ácidos graxos dos grãos de café.....	52
6.3. Conteúdo de fenólicos totais em café.....	55
6.4. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de café pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	57
6.5. Avaliação da atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos de café pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	77
6.6. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de café pelo método do Rancimat (meio lipídico).....	91
6.7. Avaliação da atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos de café pelo método do Rancimat (meio lipídico).....	92
6.8 Análise sensorial.....	93
6.9. Resultados do ensaio biológico.....	95
6.9.1. Avaliação do coeficiente de eficácia metabólica.....	95
6.9.2. Avaliação do perfil de ácidos graxos do tecido plasmático.....	96
6.9.3. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vivo</i> pelo método de TBARS..	98
7. CONCLUSÕES.....	103
8. REFERÊNCIAS.....	105
9. ANEXOS.....	120

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E ANEXOS

	Página
FIGURA 01	Patologias e danos celulares causados pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio..... 07
FIGURA 02	Processamento das amostras..... 28
FIGURA 03	Torradora de prova para processamento de café..... 29
FIGURA 04	Esquema de obtenção dos extratos etéreo, etanólico e aquoso do pó de café..... 33
FIGURA 05	Esquema de obtenção das frações de ácidos fenólicos livres, ésteres de ácidos fenólicos solúveis e ácidos fenólicos insolúveis ligados de grãos de café (<i>Coffea arabica</i> , L.)..... 35
FIGURA 06	Modelo de curva cinética para cálculo dos fatores cinéticos..... 43
FIGURA 07	Ácido 5- <i>o</i> -cafeoilquínico..... 64
FIGURA 08	Estrutura química de ácidos fenólicos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos..... 80
GRÁFICO 01	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo de grãos de café <i>in natura</i> no sistema β -caroteno e ácido linoléico..... 67
GRÁFICO 02	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo de grãos de café torrados a 140°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico..... 67
GRÁFICO 03	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo de grãos de café torrados a 160°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico..... 68
GRÁFICO 04	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo de grãos de café torrados a 180°C/10 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico..... 68
GRÁFICO 05	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico de grãos de café <i>in natura</i> no sistema β -caroteno e ácido linoléico..... 69
GRÁFICO 06	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico de grãos de café torrados a 140°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico..... 69
GRÁFICO 07	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico de grãos de café torrados a 160°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico..... 70

GRÁFICO 08	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico de grãos de café torrados a 180°C/10 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	70
GRÁFICO 09	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso de grãos de café <i>in natura</i> no sistema β -caroteno e ácido linoléico....	71
GRÁFICO 10	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso de grãos de café torrados a 140°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	71
GRÁFICO 11	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso de grãos de café torrados a 160°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	72
GRÁFICO 12	Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso de grãos de café torrados a 180°C/10 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	72
GRÁFICO 13	Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos livres de grãos de café <i>in natura</i> no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	83
GRÁFICO 14	Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos livres de grãos de café torrados a 140°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	83
GRÁFICO 15	Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos livres de grãos de café torrados a 160°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	84
GRÁFICO 16	Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos livres de grãos de café torrados a 180°C/10 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	84
GRÁFICO 17	Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis de grãos de café <i>in natura</i> no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	85
GRÁFICO 18	Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis de grãos de café torrados a 140°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	85
GRÁFICO 19	Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis de grãos de café torrados a 160°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	86
GRÁFICO 20	Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis de grãos de café torrados a 180°C/10 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	86

GRÁFICO 21	Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos insolúveis ligados de grãos de café <i>in natura</i> no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	87
GRÁFICO 22	Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos insolúveis ligados de grãos de café torrados a 140°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	87
GRÁFICO 23	Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos insolúveis ligados de grãos de café torrados a 160°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	88
GRÁFICO 24	Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos insolúveis ligados de grãos de café torrados a 180°C/10 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	88
GRÁFICO 25	Evolução do ganho de peso de animais do grupo controle e suplementados com extrato aquoso de café (<i>Coffea arabica</i> , L) torrado a 180°C/10 min durante 30 dias.....	96
ANEXO 01	Cromatograma dos padrões de ácidos fenólicos e da fração de ácidos fenólicos livres do café torrado a 160°C/20 min.....	120
ANEXO 02	Cromatograma da fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis e da fração de ácidos fenólicos insolúveis ligados do café torrado a 160°C/20 min.....	121
ANEXO 03	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP.....	122
ANEXO 04	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal da FCF/USP.....	123
ANEXO 05	Termo de consentimento livre e esclarecido.....	124
ANEXO 06	Ficha de aceitação.....	129
ANEXO 07	Artigo publicado.....	130

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 01 Identificação dos grupos de animais do experimento.....	48
TABELA 02 Composição centesimal do pó de café (<i>Coffea arabica</i> , L.) <i>in natura</i> e torrado em diferentes condições de tempo e temperatura	52
TABELA 03 Composição de ácidos graxos do óleo de grãos de café (<i>Coffea arabica</i> , L.) <i>in natura</i> e torrados em diferentes condições de tempo e temperatura.....	53
TABELA 04 Conteúdo de fenólicos totais (mg de fenólicos/g de amostra) dos extratos etéreo, etanólico e aquoso obtidos a partir de grãos de café (<i>Coffea arabica</i> , L.) <i>in natura</i> e torrados em diferentes condições de tempo e temperatura.....	55
TABELA 05 Conteúdo de fenólicos totais (mg de fenólicos/g de amostra) das frações de ácidos fenólicos presentes nos grãos de café (<i>Coffea arabica</i> , L.) <i>in natura</i> e torrados em diferentes condições de tempo e de temperatura.....	56
TABELA 06 Perfil de compostos fenólicos (mg/g de amostra) contidos nas frações de ácidos fenólicos de café (<i>Coffea arabica</i> , L.) <i>in natura</i> e café torrado em diferentes condições de tempo e temperatura...	57
TABELA 07 Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos etéreo, etanólico e aquoso de café (<i>Coffea arabica</i> , L.) <i>in natura</i> e torrado em diferentes condições avaliada pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	59
TABELA 08 Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos etéreo, etanólico e aquoso de café (<i>Coffea arabica</i> , L.) <i>in natura</i> e torrado em diferentes condições, amostras obtidas a partir da 2ª torra, avaliada pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	60
TABELA 09 Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β -caroteno e ácido linoléico de extratos de café (<i>Coffea arabica</i> , L.).	74
TABELA 10 Porcentagem de atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos livres, ésteres de ácidos fenólicos solúveis e ácidos fenólicos insolúveis ligados de café (<i>Coffea arabica</i> , L.) <i>in natura</i> e torrado em diferentes condições avaliada pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico.....	78
TABELA 11 Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β -caroteno e ácido linoléico de frações de ácidos fenólicos de café (<i>Coffea arabica</i> , L.).....	90

TABELA 12	Porcentagem de inibição da oxidação referente ao período de indução (em horas) para o antioxidante sintético BHT e para os extratos de grãos de café (<i>Coffea arabica</i> , L.) <i>in natura</i> e torrado em diferentes condições de tempo e temperatura pelo método Rancimat.....	91
TABELA 13	Porcentagem de inibição da oxidação referente ao período de indução (em horas) para o antioxidante sintético BHT e para as frações de ácidos fenólicos de grãos de café (<i>Coffea arabica</i> , L.) <i>in natura</i> e torrado em diferentes condições de tempo e temperatura pelo método Rancimat.....	93
TABELA 14	Médias dos níveis de aceitação de bebidas de café (<i>Coffea arabica</i> , L.) submetido à torrefação em diferentes condições de tempo e temperatura.....	94
TABELA 15	Determinação do coeficiente de eficácia metabólica de animais do grupo controle e tratados com extrato aquoso de café (<i>Coffea arabica</i> , L) torrado a 180°C/10 min durante 30 dias.....	95
TABELA 16	Perfil de ácidos graxos do plasma dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min durante 30 dias.....	97
TABELA 17	Peroxidação lipídica (μmol MDA/mg de proteína) nos tecidos hepático, cardíaco, cerebral e plasmático dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

ABIC	Associação Brasileira das Indústrias de Café
ABTS ⁺	Radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AFIL	Ácidos fenólicos insolúveis ligados
AFL	Ácidos fenólicos livres
BHA	Butil hidroxi anisol
BHT	Butil hidroxi tolueno
BSA	Albumina sérica bovina
CEM	Coeficiente de eficiência metabólica
CG	Cromatografia gasosa
EAFS	Ésteres de ácidos fenólicos solúveis
FRAP	Poder antioxidante em redução férrica
F1 e F2	Fatores cinéticos
GY	Gray
HR	Taxa de risco
IC50	Concentração que inibe 50% da oxidação
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malonaldeído
μL	Micro litro
μMoL	Micro Molar
nm	Nanômetro
P.A.	Pró-análise
ppm	Parte por milhão
rpm	Rotações por minuto
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Tert butil hidroquinona
THF	Tetrahidrofurano
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
TRAP	Parâmetro armadilha radical total
γ	Radiação do tipo gama

RESUMO

A avaliação da atividade antioxidante de compostos fenólicos em vegetais tem sido estudada como alternativa ao uso de antioxidantes sintéticos como butil hidroxitolueno (BHT). No presente trabalho foi avaliada a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos (etéreo, etanólico e aquoso) e frações de ácidos fenólicos (livres, ésteres de ácidos fenólicos solúveis e ácidos fenólicos insolúveis ligados) do café *in natura* e torrado em diferentes condições de tempo (10 e 20 min) e temperatura (140°C, 160°C e 180°C). As análises *in vitro* foram realizadas através do sistema β -caroteno e ácido linoléico (que indica a inibição da oxidação em meio emulsionado) e pelo método do Rancimat (que indica a inibição da oxidação em meio lipídico). Em ambos os métodos alguns extratos e todas as frações de ácidos fenólicos apresentaram atividade antioxidante igual ou superior ao BHT nas mesmas concentrações. Independente das condições de torrefação aplicadas, o extrato aquoso apresentou a maior atividade antioxidante em função do maior conteúdo de fenólicos. Os fatores cinéticos obtidos demonstraram também resultados maiores que o BHT. O perfil de ácidos fenólicos das frações foi caracterizado por cromatografia gasosa sendo identificados os seguintes ácidos fenólicos: salicílico, ferúlico, caféico, sinápico, clorogênico, quínico, *p*-cumárico, gentísico e protocatequínico. Foi realizada a avaliação sensorial da infusão de café não havendo diferença estatística entre as amostras mais torradas cujas torras estão próximas das amostras comerciais ($p > 0,05$). Com base nesses dados a amostra torrada a 180°C/10 min foi utilizada na avaliação do potencial antioxidante *in vivo*. Para tanto, ratos Wistar foram suplementados por 30 dias com diferentes doses do extrato aquoso de café torrado (180°C/10 min). As doses ministradas foram eficientes para evitar a oxidação dos tecidos plasmático, hepático, cerebral e cardíaco quando avaliados pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) sendo observado efeito dose resposta em todos os tecidos exceto no cardíaco ($p < 0,05$). O perfil lipídico do plasma dos animais suplementados em relação ao grupo controle indicou também que o extrato aquoso de café foi eficiente para inibir a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados ($p < 0,05$). Os dados aqui apresentados sugerem o uso potencial do extrato aquoso de café como antioxidante tanto como aditivo quanto o seu consumo como bebida desde que o extrato aquoso apresentou a maior atividade antioxidante.

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

ABSTRACT

Evaluation of antioxidant activity of plant phenolic compounds has been studied as an alternative to the use of synthetic antioxidants, such as butyl hydroxy toluene (BHT). In this paper we evaluated the *in vitro* antioxidant capacity of coffee extracts (ether, ethanol and aqueous) and fractions (free phenolic acids, phenolic acids from soluble esters and insoluble bound phenolic acids) roasted for different periods of time (10 and 20 min) and at varying temperatures (140°C, 160°C and 180°C). *In vitro* analyses were made both by the β -carotene and linoleic acid system (that indicates oxidation inhibition in an emulsion) as well as by the Rancimat method (that indicates oxidation inhibition in lipid medium). Some extracts and all fractions presented antioxidant activity equal to or higher than BHT at the same concentrations. Aqueous extract had a higher antioxidant activity due to its higher phenolic content. Kinetic factors obtained were also higher than those of BHT. The fractions' phenolic acid profile was characterized by gaseous chromatography, identifying the following phenolic acids salicylic, ferulic, caffeic, synaptic, chlorogenic, quinic, *p*-coumaric, gentisic and protocatechinic. No statistic differences were obtained in sensorial evaluation of coffee infusion between more intensely roasted samples, which are close to those of commercial samples ($p > 0.05$). Based on these results the 180°C/10 min sample was used in evaluation of antioxidative potential *in vivo*. For this purpose Wistar rats received a daily dietary complement of different doses of roasted (180°C/10 min) coffee aqueous extract. Administered doses were efficient in avoiding oxidation of plasmatic, hepatic, cerebral and cardiac tissues as evaluated by the TBARS method (substances reactive to thiobarbituric acid) a dosis-response effect being observed for all but the cardiac tissue ($p < 0.05$). The plasmatic lipidic profile of supplemented animals also indicated efficiency in oxidation inhibition of poli-unsaturated fatty-acids as compared to control group results ($p < 0.05$). The data presented suggest the potential usefulness of aqueous coffee extract as an antioxidant, when administered as an additive as well as consumed as a beverage, since the aqueous extract had the highest antioxidative activity.

Keywords: coffee, antioxidants, free radicals, phenolic compounds, TBARS, Wistar rats.

1 INTRODUÇÃO

O café é uma importante fonte de divisas e riquezas e representa o segundo item de maior comercialização no mercado internacional, vindo logo após o petróleo, sendo o Brasil o maior produtor mundial (MOREIRA et al., 2001; BORRELLI et al., 2002; ENCARNAÇÃO e LIMA, 2003; NACIF, 2003). Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC), no ano de 2006 o Brasil exportou 27 milhões de sacas de café *in natura* e cinco milhões de sacas de café industrializado (<http://www.abic.com.br/exportacao.html>).

O sabor e o aroma de sua bebida conferem grande receptividade a este produto, cujo consumo se tornou um hábito mundial (MOREIRA et al., 2001). O café vem se revelando como um alimento funcional (NACIF, 2003). São considerados alimentos funcionais aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, possuem potencial para promover a saúde. Deve-se salientar que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (SANDERS, 1998).

Nos últimos anos, foram feitas diversas publicações sobre os efeitos farmacológicos dos compostos do café o que refletiu em crescente interesse pelo desenvolvimento de pesquisas sobre este produto. O café apresenta em sua composição substâncias como a cafeína e os ácidos clorogênicos. Durante a etapa de torrefação pela reação de Maillard há formação das melanoidinas e incorporação de parte dos ácidos clorogênicos em suas moléculas. Estes componentes do café exercem vários benefícios à saúde humana (DEL CASTILLO, AMES e GORDON, 2002).

Entre esses benefícios podem ser citadas as atividades biológicas apresentadas pelos compostos presentes no café: inibição da biossíntese dos leucotrienos, efeito anticarcinogênico, efeito antioxidante e ação antiinflamatória (BALASUBASHINI et al., 2004; OKAMURA et al., 2005; SOOBRATTEE et al., 2005; ANDERSEN et al., 2006; OZERCAN et al., 2006). Em estudos *in vivo* e epidemiológicos, caracterizados pelo consumo de alimentos fonte de antioxidantes e maiores concentrações plasmáticas destes compostos, verificou-se uma correlação inversa com a incidência de doenças crônicas não transmissíveis (CINTRA e MANCINI-FILHO, 2001).

Antioxidantes são compostos naturais ou sintéticos que, mesmo em pequenas concentrações em relação ao substrato são capazes de retardar ou inibir, de forma

significativa, a oxidação do mesmo. O estresse oxidativo ocorre, quando há desequilíbrio entre o sistema antioxidante de defesa e a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Havendo predomínio dessas substâncias no meio, elas reagem com proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e, principalmente, com os lipídios, causando alterações nos mecanismos de homeostase celular, podendo levar à perda de sua funcionalidade (SOARES, 2002).

A oxidação lipídica também apresenta implicações sobre a qualidade e valor comercial dos lipídios e dos seus produtos derivados, como alimentos, cosméticos e medicamentos (SILVA e NAVES, 2001). Assim, o emprego de antioxidantes em produtos industrializados e o consumo freqüente de alimentos que apresentam na sua composição substâncias naturais que inibem ou reduzem os processos oxidativos, estão relacionados, tanto com o aumento da vida de prateleira dos produtos alimentícios quanto com a melhoria da qualidade de vida da população.

Antioxidantes artificiais, como o butilidroxianisol (BHA), o butilidroxitolueno (BHT) e o terciobutilidroquinona (TBHQ), são freqüentemente empregados na indústria alimentícia, porém estudos com animais demonstraram que tais substâncias causam efeitos adversos à saúde (MANCINI-FILHO et al., 1998; ALMEIDA-DORIA e REGITANO-D'ARCE, 2000).

O emprego de antioxidantes em nível industrial é uma prática corrente e justifica o estímulo à pesquisa de novas fontes naturais destes compostos. Os critérios empregados na seleção e utilização de antioxidantes são a facilidade de obtenção e de emprego, baixo custo, ausência comprovada de efeitos nocivos à saúde, termo-resistência e neutralidade organoléptica (SILVA e NAVES, 2001).

Estudos epidemiológicos e experimentais realizados nas últimas décadas comprovaram a atividade antioxidante de produtos de origem vegetal, fontes de compostos fenólicos (NATELLA et al., 2002; OKAMURA et al., 2005).

Esta pesquisa realizada com café teve como objetivo avaliar o seu potencial como fonte alternativa de antioxidantes naturais para uso industrial, visando à preservação de compostos bioativos que estão relacionados com a prevenção do estresse oxidativo no organismo. Para isto foram realizados testes *in vitro* e *in vivo*, para verificar a atividade antioxidante de extratos e de frações de ácidos fenólicos, obtidos a partir de grãos de café (*Coffea arabica*, L.) *in natura* e submetidos à torrefação em diferentes condições de tempo e temperatura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipídios

Os lipídios são ingredientes chave para os aspectos sensoriais e fisiológicos dos alimentos e estão relacionados com a percepção do aroma, sabor e textura além de proporcionar a sensação de saciedade. Além disso, conferem valor nutritivo aos alimentos por serem a principal fonte de energia (9 kcal/g) e também a principal fonte dos ácidos graxos essenciais (ácido linoléico e α -linolênico) e das vitaminas A, D, E, K (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999).

Na fisiologia do organismo animal, os lipídios participam de diversas vias metabólicas e a deficiência dessas substâncias pode causar alterações na homeostase. Os ácidos graxos, ácido linoléico e α -linolênico são essenciais e são responsáveis pela biossíntese dos ácidos araquidônico, eicosapentaenóico e docosaexaenóico. São também responsáveis pela formação das prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina, compostos que participam da regulação da pressão arterial, frequência cardíaca, resposta imunológica, dos processos da coagulação sanguínea e do funcionamento do sistema nervoso central, além de serem integrantes da estrutura celular. Os eicosanóides derivados do ácido araquidônico (C20:4n-6) são potentes pró-inflamatórios e pró-agregatórios, opostos em comparação aos eicosanóides derivados do ácido eicosapentaenóico (C20:5n-3), protetores contra doenças coronarianas, hipertensão e doenças inflamatórias. A incorporação do ácido araquidônico aos fosfolipídios e subsequente biossíntese de eicosanóides ocorrem pela ação das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase (SANIBAL e MANCINI-FILHO, 2004).

Os lipídios também desempenham papéis fisiológicos importantes interagindo com as drogas lipofílicas, favorecendo o aproveitamento de vitaminas lipossolúveis e participam na formação e fluidez de membranas celulares (SIVIERI e OLIVEIRA, 2002).

Muito embora proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos sejam suscetíveis à oxidação, os ácidos graxos insaturados também são suscetíveis às reações de oxidação. Entretanto, os ácidos graxos insaturados são mais instáveis e, portanto mais propensos ao processo oxidativo.

2.2 Oxidação lipídica

O oxigênio, a luz, o calor, a atividade de água, o pH e íons metálicos com mais de um estado de valência como o cobalto, o cobre, o ferro, o manganês e o níquel, presentes no solo ou em equipamentos e utensílios metálicos e mesmo em alimentos, influenciam o processo de oxidação.

Agem como iniciadores e catalizadores das reações de oxidação originando hidroperóxidos que se decompõem em hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos. Estes compostos reduzem a qualidade dos alimentos por conferirem alterações de odor, sabor e textura, reduzem o valor nutricional pela degradação de ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis, além da eventual perda de suas características funcionais (NAWAR, 1996; ALMEIDA-DORIA e REGITANO-D'ARCE, 2000; PÉREZ-GALVÉS e MÍNGUEZ-MOSQUERA, 2004).

A oxidação lipídica é um fenômeno espontâneo e inevitável, sendo considerada a principal causa de deterioração de alimentos durante o processamento e armazenamento. Para evitar esse processo, a adição de antioxidantes tornou-se uma prática comum e necessária na indústria alimentícia, para preservar as características sensoriais e nutricionais, bem como prolongar a vida de prateleira dos produtos (HUANG e WANG, 2004; BOUAZIZ et al., 2005; VULCAIN et al., 2005).

Os ácidos graxos insaturados, particularmente os ácidos oléico, o linoléico, o α -linolênico e o araquidônico apresentam alta propensão à autooxidação, sendo a velocidade da reação aumentada pelo número de insaturações de cada molécula (PÉREZ-GALVÉS e MÍNGUEZ-MOSQUERA, 2004). Os fosfolipídios, presentes em membranas celulares, têm ácidos graxos poliinsaturados em sua composição e são igualmente suscetíveis à oxidação (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999).

A oxidação lipídica leva à formação de aromas e sabores desagradáveis em óleos e gorduras, no processo conhecido por rancificação. A oxidação nos alimentos pode ser mediada por mecanismos enzimáticos ou não enzimáticos. O sistema consiste na reação com o oxigênio molecular. A presença de oxigênio e altas temperaturas durante o processo de fritura levam à oxidação durante a fase de iniciação. Nesta fase pode haver a retirada de uma molécula de hidrogênio da cadeia de ácido graxo poliinsaturado e formação de um radical e/ou formação de um dieno conjugado por isomerização de posição ou ainda formação de ácido graxo trans por isomerização geométrica. Na fase de propagação, este radical vai reagir

com o oxigênio presente e formar um radical peroxil. Este radical, por sua vez, vai reagir com outra molécula de hidrogênio formando hidroperóxido e liberando um radical, que no processo em cadeia, vai reagir com o oxigênio. Na fase de terminação, os produtos radicalares vão reagir entre si e formar produtos não radicalares (NAWAR, 1996).

2.3 Estresse oxidativo

A oxidação lipídica também está relacionada com processo de envelhecimento, com alterações de membranas celulares e com o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis como as doenças cardiovasculares, os diversos tipos de câncer, o enfisema, a doença de Parkinson, a catarata, o diabetes mellitus, a doença de Alzheimer, os processos inflamatórios e as doenças auto-imunes (DAGLIA et al., 2000).

A adição de antioxidantes confere proteção não somente ao alimento, mas também ao organismo animal, uma vez que, quando os antioxidantes são ingeridos, combatem radicais livres e suas repercussões, contribuindo para redução do risco das patologias anteriormente citadas (VULCAIN et al., 2005).

Todas as estruturas atômicas e moleculares podem formar radicais livres e sua reatividade depende da conformação molecular. Os radicais livres, portanto, podem ser formados nas vitaminas, nos carboidratos, nas proteínas, nas bases nucleicas e nos lipídios. Nestes últimos, os ácidos graxos poliinsaturados que os constituem são muito suscetíveis à formação dos radicais livres pela densidade eletrônica das duplas ligações. Os radicais livres são formados durante processos normais e patológicos e são caracterizados como estruturas que apresentam um ou mais elétrons não pareados ocupando orbitais atômicos ou moleculares (SOARES, 2002).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio apresentam elevada reatividade e podem se apresentar como radicais: hidroxil ($\text{OH}^\bullet$), peroxila ($\text{RO}_2^\bullet$), alcooxila ($\text{RO}^\bullet$), hidroperoxila ($\text{HO}_2^\bullet$), íon superóxido ($\text{O}_2^\bullet$), óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$). O ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), ozônio (O_3) e o peroxinitrito (ONOO) são espécies não radicalares, que podem participar de reações mediadas pelos radicais livres (MANCINI-FILHO, 2006).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas em condições fisiológicas normais do metabolismo aeróbico resultantes de diversos processos bioquímicos como atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e presença de peroxidases, presença de metais de transição no interior da célula e do sistema de transporte de elétrons e também por macrófagos ativados.

As fontes exógenas geradoras de radicais livres são: exposição a agentes externos como dieta, tabaco, solventes orgânicos, pesticidas, radiação eletromagnética do tipo gama, xenobióticos e poluentes (SOARES, 2002).

Na busca pela estabilidade, os radicais livres reagem com outras moléculas do organismo como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, formando outros radicais livres numa reação em cadeia (BETTERDGE, 2000; SU et al., 2007).

O organismo por sua vez, tenta manter a homeostase através de mecanismos fisiológicos de defesa. Inicialmente, a célula atua para livrar-se do agente agressor, impedindo sua ação. Este mecanismo é realizado através das enzimas glutathione redutase (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px), transferrina, pela vitamina E e pelo ácido ascórbico. O desequilíbrio entre a geração de radicais livres e o sistema de defesa antioxidante caracteriza o estresse oxidativo, podendo causar injúria tecidual (SOARES, 2002).

Os ácidos graxos poliinsaturados e os fosfolipídios contidos nas membranas celulares são responsáveis pela sua fluidez. A presença de insaturações confere instabilidade a estas moléculas, predispondo-as à oxidação, podendo ocorrer perda da funcionalidade devido a alterações nos mecanismos de homeostase celular. A propagação em cadeia dos radicais livres intensifica o dano tecidual, podendo prejudicar sistemas enzimáticos, a expressão gênica, mecanismos de segundo mensageiro, redução da fluidez da membrana e da permeabilidade de íons e conseqüente diminuição da funcionalidade celular (JARDINI, 2005). Existem evidências de que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e os radicais livres podem estar envolvidos em mais de cinquenta doenças. Já foi comprovado o papel de ambos no desenvolvimento da doença de Parkinson, acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, catarata, câncer e aterosclerose (**FIGURA 1**).

FIGURA 1 Patologias e danos celulares causados pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (SHAHIDI, 2000, SHAHIDI e NACKZ, 2004).

Em estudos epidemiológicos realizados nas últimas décadas, foi verificado que o consumo regular de alimentos com agentes protetores, como por exemplo, os antioxidantes, reduzem consideravelmente o risco de diversas patologias principalmente as doenças crônicas não transmissíveis (DAGLIA et al., 2000; DUTHIE et al., 2005; MOREIRA et al., 2005; HUANG, OU e PRIOR, 2005; MANCINI-FILHO, 2006).

2.4 Antioxidantes

Antioxidantes são compostos que, quando presentes em pequenas concentrações, retardam ou inibem a oxidação do substrato (DEL CARLO et al., 2004). Os antioxidantes podem ser naturais ou sintéticos.

Os antioxidantes sintéticos butil hidroxitolueno (BHT), butil hidroxianisol (BHA) e terciobutil hidroquinona (TBHQ) são os antioxidantes mais empregados na indústria alimentícia por apresentarem alta estabilidade e baixo custo. No entanto, como já foi comentado, seu uso em alimentos tem sido gradativamente reduzido em razão de suspeitas sobre sua participação na promoção de efeitos deletérios ao organismo, além da rejeição do consumidor por aditivos sintéticos (TSAKNIS e LALAS, 2005). O BHA pode induzir hipertrofia hepática, redução do crescimento e desenvolvimento de

câncer. Já o BHT apresentou efeitos tóxicos para o fígado, pulmão, rins e afetou o ganho de peso em ratos (SHAHIDI, 2000).

Em pesquisas com o BHT em ratos foram verificados efeitos tóxicos para o fígado, pulmão, rins, além de redução do ganho de peso (SHAHIDI, 2000; HUANG e WANG, 2004). Na maioria dos países, inclusive o Brasil, a legislação determina a aplicação de antioxidantes sintéticos, isolados ou combinados, na concentração máxima de 200 ppm (SOTERO, 2002).

A preferência do consumidor por aditivos naturais tem estimulado a realização de estudos, visando a identificação de antioxidantes de fontes naturais para aplicação em produtos alimentícios (VULCAIN et al., 2005). Assim, diversos trabalhos têm sido realizados para identificar a atividade antioxidante de extratos obtidos de especiarias, leguminosas, cereais e frutas, tanto em estudos epidemiológicos quanto em experimentais realizados nas últimas décadas (NATELLA et al., 2002; SOTERO, 2002; GIADA, 2005).

O β -caroteno, o ácido ascórbico, o α -tocoferol, os ácidos fenólicos e outros compostos são antioxidantes naturais. Verificou-se que possuem a propriedade de eliminar o oxigênio singlete, doar átomos de hidrogênio, sequestrar íons metálicos e decompor peróxidos (NOVOA et al., 2001; SOARES, 2002; PROESTOS et al., 2005; SOOBRATTEE et al., 2005; SANTOS et al., 2006).

As moléculas típicas de antioxidantes são derivadas das formas isoméricas dos polifenóis flavonas, isoflavonas, flavonóis, catequinas, cumarinas, ácidos fenólicos e outras substâncias encontradas em vegetais (MARINOVA e YANISHILIEVA, 1994).

Registros históricos comprovam que as civilizações antigas já praticavam o hábito de consumir alimentos para fins profiláticos e terapêuticos, adicionando ervas em preparações culinárias não somente pela sua ação flavorizante, mas também pelos seus efeitos medicinais e propriedades anti-sépticas (ALMEIDA-DORIA e REGITANO-D'ARCE, 2000). Os dados mais antigos deste comportamento alimentar tiveram origem na China há cerca de 5000 anos atrás (REPETTO e LIESUY, 2002).

O café, objeto deste trabalho, também já foi objeto de estudos quanto à sua capacidade antioxidante como referem os estudos de Daglia et al., 2000; de Natella et al., 2002; de Yanagimoto et al., 2004 e de Stalmach et al., 2006. Uma vez identificada a atividade antioxidante de produtos vegetais, é importante pesquisar quais os fatores que influenciam esta propriedade.

2.5 Café

O café foi descoberto nas montanhas da província de Keffa, atual Etiópia, no século VI e levado para a Arábia e de lá para Europa por volta de 1500. A transferência de mudas de café do continente Europeu para a América Central e do Sul ocorreu por volta de 1700 chegando ao Brasil em 1727 (ILLY, 2002; BONOMO et al., 2004; YANAGIMOTO et al., 2004). A palavra café tem origem na palavra árabe “qahwa” que significa vinho. Por tal razão, quando o café foi levado da Etiópia para Europa, no século XIV, foi chamado de vinho da Arábia (http://portal.mec.gov.br/setec/arquivos/pdf/publica_setec_cafe.pdf). O seu cultivo gera e gerou um grande impacto social e econômico e ocupa um lugar de destaque na história econômica e social do país.

O café pertence à família *Rubiaceae* e ao gênero *Coffea*. Existem descritas aproximadamente 100 espécies do gênero *Coffea*, mas somente a *Coffea arabica* e a *Coffea canephora*, conhecida como Robusta ou como Conilon são cultivadas.

A espécie Arábica, oriunda de regiões montanhosas, é uma árvore delicada, de produção entre pequena e média e tem um porte de 5 a 6 m de altura e requer clima temperado. A árvore da espécie Robusta por sua vez é caracterizada por ser muito produtiva e resistente a doenças. A planta se desenvolve bem em climas quentes e úmidos e pode atingir até 12 m de altura (ILLY, 2002).

Somente as espécies Arábica e Robusta têm importância econômica (MAZZAFERA et al., 1998; MORGANO et al., 2002; BONOMO et al., 2004). A espécie Arábica é considerada economicamente mais importante do que a espécie Robusta sendo que a produção mundial destas espécies corresponde a 70 e 30% respectivamente (LIN et al., 2005).

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo e representa um importante item no comércio internacional (DAGLIA et al., 2000; RECHNER et al., 2001; BORRELLI et al., 2002; KUMAZAWA e MASUDA, 2003). A produção e o processamento do café causam um considerável impacto sócio-econômico em função de mais de 25 milhões de empregos gerados em todo o mundo (LIN et al., 2005).

No Brasil, o café constitui um importante produto de exportação, sendo o país um dos maiores representantes do comércio mundial de café e também um grande

consumidor do produto (MORGANO et al., 2002). Segundo a ABIC as exportações do ano de 2006 somam US\$1,25 bilhão (<http://www.abic.com.br/exportacao.html>).

Visando preservar esta situação de mercado, o setor de café tenta manter o ritmo de “marketing” e modernização da indústria de bebidas implementando estratégias mercadológicas que estimulem o consumo de café e seus derivados. Neste contexto, a inovação em tecnologias e produtos e a melhoria contínua de sua qualidade constituem elementos decisivos para alcançar e sustentar vantagens competitivas e, assim, favorecer o crescimento econômico, a geração de riqueza, a qualidade de vida da sociedade e a satisfação dos consumidores (ROCHA e FERREIRA, 2001).

Segundo Gadelha, Quental e Fialho (2003), a área de saúde constitui um dos espaços econômicos mais dinâmicos de acumulação de capital e de inovação, cujo entendimento, se mostra essencial para o planejamento de políticas de promoção e desenvolvimento socioeconômico. Isto considerado, esta dinâmica de mercado representa um panorama favorável à integração da indústria de alimentos e indústria farmacêutica para o desenvolvimento de produtos agregados a benefícios sobre a saúde.

É cada vez maior a parcela da sociedade que busca constantemente melhor qualidade de vida. A conscientização sobre a importância deste comportamento vem sendo estimulada pelo maior acesso às informações, pela freqüente divulgação de conhecimentos sobre saúde nos meios de comunicação e nos produtos alimentícios e por ações governamentais e não governamentais de incentivo à promoção da saúde. A comunidade científica, apoiada por estas ações, verificou e enfatizou, através de vários estudos, a relevância da nutrição na redução do risco e controle de diversas patologias. A população, cada vez mais consciente dos benefícios gerados pela prática de hábitos saudáveis, tem adquirido um perfil de consumo identificado pela demanda de produtos com características sensoriais agradáveis vinculadas a efeitos salutareos.

Segundo a ABIC, uma pesquisa realizada pela Funcafé desde 2003 mostra que está havendo um aumento no consumo de café pela população brasileira e a própria ABIC está desenvolvendo pesquisas para tentar comprovar os benefícios da bebida (http://www.abic.com.br/noticias/nota_tendencias.html).

O consumo de café representa um hábito mundial e sua bebida é uma das mais consumidas no mundo. O sabor e o aroma do café são atrativos que justificam e

estimulam a grande aceitação e consumo desta bebida. Pesquisas recentes apontam efeitos fisiológicos benéficos do consumo de café atribuídos a diversos compostos nele presentes entre os quais se encontram os compostos fenólicos (NATELLA et al., 2002; SOMOZA et al., 2003; OKAMURA et al., 2005; ARAUJO e MANCINI-FILHO, 2006).

Além de pesquisas sobre consumo, outras têm sido feitas para determinar componentes do café e suas respectivas funções na fisiologia vegetal dos grãos, na determinação das características sensoriais e dos efeitos associados à saúde humana, bem como o desenvolvimento de produtos a partir destas substâncias (GUERRERO e SUÁREZ, 2001; MOREIRA et al., 2001; MORGANO et al., 2002; PROESTOS et al., 2005; ANDERSEN et al., 2006). O café é utilizado em preparações do tipo expresso, “gourmet”, “cappuccino”, “frappuccino”, na produção de balas e dele ainda pode se extrair um óleo normalmente utilizado como aditivo na indústria alimentícia e na indústria cosmética (MORGANO et al., 2002). Entre os fatores que podem interferir na composição e qualidade do café estão a espécie e a variedade, maturação dos grãos e os processos de torrefação, armazenamento e preparo (GUERRERO e SUÁREZ, 2001; MOREIRA et al., 2001; IWAI et al., 2004; STALMACH et al., 2006).

Os cafés crus, dependendo da variedade considerada apresentam teores de 8,6 a 12,6% de proteínas, 12,3 a 14,0% de lipídios e 3,5 a 4,5% de minerais. Como parte da composição mineral do café destacam-se Ca, K, Mg, Na, P, Co, Cr, Cu, Fe Mn, Zn (MORGANO et al., 2002). Além destes nutrientes o café também contém fitoquímicos como ácidos fenólicos, cafeína e melanoidinas. A composição de grãos de café cru em porcentagem de base seca para as variedades Arábica e Robusta corresponde, respectivamente, a 12 - 18% e 9 - 13% de lipídios, 3,0 - 4,2 % e 4,0 - 4,5 % de minerais, 5,5 - 8,0 % e 7 - 10 % de ácidos clorogênicos, 6 - 8 % e 5 - 7 % de oligossacarídeos, 50 - 55 % e 37 - 47 % de polissacarídeos, 0,9 - 1,2 % e 1,6 - 2,4 % de cafeína. A composição de alguns compostos não difere entre as variedades consideradas e correspondem a 2 % de aminoácidos, 11 - 13 % de proteína e 1,5 - 2,0 % de ácidos alifáticos (SALDAÑA, MAZZAFERA e MOHAMED, 1997).

O café *in natura*, os grãos torrados e a bebida preparada são misturas complexas formadas por várias substâncias de ocorrência natural ou derivadas pelo processo de torrefação (DAGLIA et al., 2000). Esta etapa da cadeia produtiva é feita pela exposição dos grãos verdes ao ar aquecido durante curto intervalo de tempo,

suficiente para liberar a água livre e ligada. Os grãos secos são aquecidos a uma temperatura que varia de 200 - 240°C por 10 - 15 min para promover reações de pirólise, caramelização e reação de Maillard que irão resultar na formação de compostos que atribuem cor, aroma e sabor ao café (DAGLIA et al., 2000; AMSTALDEN, LEITE e MENEZES, 2001).

2.5.1 Atividade antioxidante das melanoidinas

O processamento de alimentos induz a uma série de transformações bioquímicas entre elas a reação de Maillard (MORALES e BABBEL, 2002; MORALES, 2002). Entre os produtos dessa reação estão as melanoidinas polímeros hidrossolúveis de coloração parda que representam uns dos principais componentes da bebida à base de café. Representam 25% da matéria seca do café, exercem um importante papel no desenvolvimento de aroma e sabor de alimentos e bebidas e estão amplamente distribuídas em pães, carnes, malte, mel, chocolate e café.

Durante a reação de Maillard um carboidrato com extremidade redutora condensa-se com um composto que tenha um grupo amino livre. Durante a torrefação do café, parte de seus compostos fenólicos são incorporados às melanoidinas (DAGLIA et al., 2000; BORRELLI et al., 2002; MORALES, 2002; ADAMS et al., 2005). Os ácidos clorogênicos doam um grupo carbonil para as melanoidinas no primeiro estágio da reação de Maillard. Muitos estudos têm sido feitos para caracterizar a estrutura e as propriedades químicas das melanoidinas, mas nenhuma foi completamente caracterizada até o momento (BORRELLI et al., 2002; MORALES, 2002; ADAMS et al., 2005).

O interesse sobre esses compostos tem aumentado devido ao seu efeito antioxidante cujos mecanismos de ação são quelar metais para formar complexos inativos, interromper a reação em cadeia doando um átomo de hidrogênio, reduzindo hidroperóxidos a produtos não radicalares e capturando radical hidroxil (DAGLIA et al., 2000; BORRELLI et al., 2002; MORALES e BABBEL, 2002; MORALES, 2002; ADAMS et al., 2005; DELGADO-ANDRADE, RUFÍAN-HENARES e MORALES, 2005).

Del Castillo, Ames e Gordon (2002), avaliaram a atividade antioxidante de extratos de grãos de café submetidos a diferentes graus de torrefação. Foram obtidas as torras clara, média e escura. Em relação às torras clara e média, apesar

da diminuição do conteúdo de ácidos clorogênicos, a atividade antioxidante foi maior na torra média (45,2%) do que na torra clara (18,9%) em comparação ao café *in natura*. Entretanto, não aumentou a atividade antioxidante da torra escura em relação a torra média. Os autores sugerem que a formação de melanoidinas com capacidade antioxidante ocorre somente em uma fase da torrefação de café. As condições aplicadas na torra escura causam degradação parcial de ácidos clorogênicos, o que leva à redução da atividade antioxidante do grau de torrefação escura em relação à torrefação média.

Nicoli et al. (1999) verificaram pelo método Rancimat que a bebida de café inibiu a lipoperoxidação, sendo que a maior inibição foi observada na torrefação média.

Daglia et al. (2000) avaliaram a atividade antioxidante de café utilizando um ensaio *ex vivo*. Os autores verificaram que todas as amostras torradas conferiram proteção contra a lipoperoxidação de microssomos em fígado de ratos equivalente a 24 - 62% em relação à amostra *in natura*.

Duarte et al. (2005) avaliaram a inibição da lipoperoxidação em cérebro de ratos. A avaliação foi feita *ex vivo* e os homogenatos foram misturados com bebida de café preparada com grãos submetidos ao grau de torra clara, média e escura. Os autores também observaram uma correlação inversa entre a capacidade da bebida de café de inibir a lipoperoxidação de cérebro de rato e o grau de torrefação dos grãos de café.

2.5.2 Atividade antioxidante da cafeína

A cafeína é uma metilxantina contida nos grãos de café cujos teores, no caso da bebida, são influenciados pelo tipo do produto (torrado ou instantâneo, descafeinado ou comum) e o processo utilizado no seu preparo (CAMARGO e TOLEDO, 1998; CARREGARO et al., 2001).

O conteúdo de cafeína nas sementes da espécie Robusta é maior do que nas sementes da Arábica. O café da variedade Robusta é geralmente usado na fabricação de café instantâneo, enquanto que o café Arábica, é usado na obtenção de café em pó torrado (JAMES, 1991).

Em pesquisa realizada por Camargo e Toledo (1998), verificou-se que a quantidade de cafeína extraída foi 19 a 30 % superior à obtida da bebida preparada

com pó das mesmas marcas que não tenham sido submetidas à fervura. Os teores médios de cafeína do café expresso são relativamente maiores, visto que neste tipo de preparação a quantidade de pó utilizada é praticamente o dobro do café tipo caseiro.

Doses excessivas de cafeína podem causar irritabilidade, cefaléia, insônia, diarreia e taquicardia. A dose letal para um adulto de 70 kg é cerca de 10 g. Isto equivale a 100 xícaras de café ou 200 latas de Coca-Cola ou 50 kg de chocolate (BRENELLI, 2003). Assim, presume-se que, provavelmente, a ocorrência de intoxicações causadas por cafeína tem origem medicamentosa e não alimentar.

Entre as funções farmacológicas das metilxantinas no organismo humano são citadas a estimulação do sistema nervoso central e cardiovascular, o aumento da taxa metabólica, o efeito diurético e a capacidade antioxidante (GEORGE, HEBBAR e KESAVAN, 1999; RABELLO et al., 2000; CARREGARO et al., 2001; BRENELLI, 2003). A capacidade antioxidante da cafeína é exercida pelo mecanismo de captação de radicais hidroxil e oxigênio singlete e reação com elétrons (GEORGE, HEBBAR e KESAVAN, 1999).

Pesquisadores testaram o efeito antioxidante da cafeína na prevenção do dano oxidativo em microsossomos de fígado de ratos. A lesão oxidativa foi induzida pelos radicais hidroxil ($\text{OH}^\bullet$), peroxil ($\text{ROO}^\bullet$) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). A cafeína apresentou efetiva inibição sobre a peroxidação lipídica, em concentrações milimolares, contra as três espécies reativas do metabolismo de oxigênio. A ordem decrescente da atividade inibitória foi igual a: $\text{OH}^\bullet > \text{O}_2 > \text{ROO}^\bullet$. A ação antioxidante da cafeína foi semelhante a da glutathione e significativamente maior do que do ácido ascórbico (DEVASAGAYAM et al., 1996).

Em pesquisas com macacos, foram administradas doses de 80 ou 100 mg/kg de peso corporal, 60 minutos antes dos animais serem expostos a doses letais de γ -radiação (7.5 Gy). Houve sobrevivência de 70 e 63%, respectivamente, em relação às doses citadas em contraste com 100% de mortalidade no grupo controle (GEORGE, HEBBAR e KESAVAN, 1999). Estes mesmos pesquisadores relatam que em estudos *in vitro* a cafeína protegeu células mamárias e medulas ósseas de macacas expostas à radiação.

A atividade antioxidante da cafeína e de seus metabólitos foi avaliada em concentrações fisiológicas (40 $\mu\text{mol/L}$) empregando o método ORAC. A capacidade antioxidante também foi avaliada pelo método de TBARS e de oxidação da LDL

(lipoproteína de baixa densidade) humana. Todos os compostos avaliados reduziram significativamente os níveis de TBARS e de dienos conjugados produzidos durante a peroxidação da LDL humana (LEE, 2000).

2.5.3 Atividade antioxidante de compostos heterocíclicos

Muitos compostos heterocíclicos têm sido descritos em vários alimentos processados como, por exemplo, o café no qual já foram identificados e quantificados mais de 300 compostos incluindo pirróis, furanos, tiazóis, tiofenos imidazólicos e pirazinas. Esses compostos são formados durante a reação de Maillard, têm baixo peso molecular, conferem odor e sabor a alimentos torrados e apresentam atividade antioxidante (YANAGIMOTO et al., 2002; YANAGIMOTO et al., 2004).

Fuster et al. (2000) avaliaram a atividade antioxidante de compostos heterocíclicos voláteis contidos em extratos de café pelo método de inibição da oxidação do hexanal. O 2-acetilpirrol, o 1-metilpirrol e o pirrol apresentaram uma atividade antioxidante equivalente a 98, 87 e 78% respectivamente na concentração de 500 µg/mL por um período de mais de 30 dias. Em relação ao 2-acetilpirrol, ao 2-metilfurano e ao 2-metiltiofeno nas concentrações de 500, 200 e 100 µg/mL e furanos na concentração de 500 µg/mL foram observadas atividades antioxidantes comparáveis ao antioxidante sintético butil hidroxitolueno na concentração de 50 µg/mL.

Os benefícios do consumo de café foram avaliados através da identificação de compostos antioxidantes em frações obtidas a partir da bebida de café comercial “blends”. A análise das frações por cromatografia gasosa com espectrometria de massa identificou a presença de compostos heterocíclicos com capacidade antioxidante incluindo furanos, pirróis e maltol. A inibição da lipoperoxidação pelas sete frações obtidas a partir da solução aquosa foi avaliada pelo método de TBARS na concentração de 300 µg/mL e apresentaram porcentagens de inibição entre 10 e 90% (YANAGIMOTO et al., 2004).

As substâncias descritas nos itens de 2.5.1 a 2.5.3 não foram analisadas pois o enfoque desse trabalho foi avaliar especificamente a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos do café *in natura* e torrado em diferentes condições de tempo e

temperatura pois a esses compostos tem sido atribuído o elevado potencial antioxidante encontrado em vegetais.

2.5.4 Atividade antioxidante dos ácidos clorogênicos

As plantas vasculares sintetizam uma grande variedade de moléculas orgânicas denominadas como metabólitos secundários (ROBBINS, 2003). Compostos fenólicos estão distribuídos em praticamente todo o reino vegetal, podendo ser encontrados em diversas partes das plantas em quantidades significativas.

Os ácidos fenólicos correspondem a um terço da ingestão diária de polifenóis cujas principais fontes alimentares são as bebidas como vinho, chás, sucos de frutas (exceto suco de laranja) e café (SCALBERT e WILLIANSO, 2000; OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, 2001; RECHNER et al., 2001). Entre os compostos fenólicos contidos no café como já destacado estão o ácido caféico, o ácido clorogênico e outros derivados do ácido cafeoilquínico (DAGLIA et al., 2000). Estes compostos também estão presentes na maçã, pêra, alcachofra, berinjela e suco de frutas cítricas. Porém, sua principal fonte é o café (SCALBERT e WILLIANSO, 2000; OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, 2001; RECHNER et al., 2001; NARDINI et al., 2002).

Os ácidos fenólicos são classificados em cinco grandes grupos, sendo que quatro destes são flavonóides e o quinto representa os ácidos hidroxicinâmicos (OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, 2001; RECHNER et al., 2001; NARDINI et al., 2002). Os ácidos clorogênicos são os derivados hidroxicinâmicos mais abundantes e de maior distribuição nos alimentos (NARDINI et al., 2002; GONTHIER et al., 2003).

O grupo dos ácidos clorogênicos representa um conjunto de compostos fenólicos de ocorrência natural nos alimentos, formado principalmente pela esterificação do ácido quínico com os ácidos cinâmico, caféico, ferúlico ou pelo ácido *p*-cumárico (AZUMA al., 2000).

O ácido caféico é o representante fenólico mais freqüentemente encontrado nos alimentos, tanto na forma livre, quanto esterificado com o ácido clorogênico (ácido *5-o-cafeoilquínico*); sua forma mais abundante na natureza (SHAHIDI e NACKZ, 2004).

Entre os ácidos clorogênicos contidos no café, o *5-o-cafeoilquínico* é o mais abundante. O café apresenta em sua composição 4,3 - 7,2% de ácidos cafeoilquínico, 0,3 - 1,2% de feruloilquínico, 0,8 - 2,5% de ácidos dicafeoilquínico (NATELLA et al., 2002; IWAI et al., 2004).

Alguns estudos têm indicado a relação entre a qualidade do café e seu conteúdo em ácidos clorogênicos, uma vez que estes compostos apresentam reconhecida importância na formação de pigmentos e do sabor (ANDRADE et al., 1998; GUERRERO e SUÁREZ, 2001; MOREIRA et al., 2005).

Diversos estudos foram feitos para a determinação dos teores de ácidos clorogênicos no café. Nestes trabalhos foram encontrados valores de 5,8; 0,87 e 0,25 g% de ácidos cafeoilquínico, dicafeoilquínico e 5-feruloilquínico, respectivamente, na variedade Arábica e 6,8; 1,4 e 0,6 g %, respectivamente, na variedade Robusta. Em todas as pesquisas o ácido *5-o-cafeoilquínico* (ácido clorogênico) foi predominante (TRUGO e MACRAE, 1984; ANDRADE et al., 1998; GUERRERO e SUÁREZ, 2001; MOREIRA et al., 2005).

Segundo Saldaña, Mazzafera e Mohamed (1997) o conteúdo total de ácido clorogênico na variedade Arábica é de 5,5 - 8,0% e 7,0 - 10,0% na variedade Robusta. Segundo Iwai et al. (2004), o café contém considerável quantidade de ácidos hidroxicinâmicos.

Considerando o grande consumo diário de café por uma significativa parcela da população, este alimento pode ser considerado um dos principais fornecedores de compostos fenólicos para o organismo.

Uma porção de 200 mL de café fresco preparado com grãos da variedade Arábica contém de 70 - 200 mg de ácido clorogênico (CLIFFORD, 1999). A ingestão diária de ácido clorogênico pelos consumidores de café é estimada em 0,5 - 1g/d e menor que 100 mg/d em pessoas que não possuem o hábito de consumir a bebida (OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, 2001; NARDINI et al., 2002; GONTHIER et al., 2003). De acordo com Natella et al. (2002), uma xícara de café pode conter de 200 - 550 mg de compostos fenólicos. Uma porção de café preparada com 10 g de pó fornece de 15 a 325 mg de ácidos clorogênicos.

Dependendo do consumo diário de café e de outras fontes de derivados hidroxicinâmicos, a ingestão destes fitoquímicos pode alcançar valores de 500 - 800 mg dos quais 70% seria proveniente do café (RECHNER et al., 2001).

2.5.4.1 Biodisponibilidade de ácidos clorogênicos

Os mecanismos de absorção, metabolismo e biodisponibilidade de antioxidantes fenólicos constituem objeto de inúmeras pesquisas principalmente devido à sua ampla distribuição nos componentes da dieta humana e pelos efeitos fisiológicos atribuídos a eles (ZHAO, EGASHIRA e SANADA, 2005). A estrutura química dos polifenóis determina a taxa de sua absorção e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade. Wolfram et al. (1995) realizaram experimentos com ratos e observaram através de testes *in vitro* e *in vivo* que os ácidos fenólicos são absorvidos no trato gastrointestinal.

Embora o ácido clorogênico seja hidrolisado por ação de enzimas bacterianas, este também pode ser absorvido na forma intacta (OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, 2001). Pesquisas realizadas por estes mesmos autores possibilitaram verificar a absorção do ácido caféico e do ácido clorogênico no intestino delgado. O estudo foi desenvolvido com a participação de indivíduos ileostomizados, sadios, de ambos os sexos, que ingeriram, em dias diferentes, doses de ácido caféico e ácido clorogênico. Estas substâncias foram analisadas no fluido intestinal e na urina de 24 horas e verificou-se uma absorção de 33% do ácido clorogênico e 95% de ácido caféico. Entretanto, apenas traços de ácido clorogênico e 11% de ácido caféico foram excretados na urina, indicando seu provável metabolismo pós-absortivo. Assim, 67% dos derivados hidroxicinâmicos ingeridos alcançam o cólon onde irão ser metabolizados e também irão influenciar a flora microbiana intestinal.

O aproveitamento destes fitoquímicos pelo organismo humano pode ser otimizado pela clivagem do ácido clorogênico mediante a ação de esterases provenientes da mucosa do intestino grosso e do metabolismo da flora microbiana (SCALBERT e WILLIANSO, 2000). O ácido caféico, liberado pela clivagem enzimática do ácido clorogênico e seus metabólitos produzidos pela flora intestinal são facilmente absorvidos pelo intestino grosso e podem ser metabolizados pelo fígado (SCALBERT e WILLIANSO, 2000; OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, 2001).

2.6 Perspectivas para o uso de antioxidantes

2.6.1 Perspectivas para o uso de antioxidantes na indústria

Nicoli et al. (1997) verificaram que, apesar da perda natural de antioxidantes durante tratamentos térmicos, a capacidade antioxidante de derivados de café e tomate foram mantidas ou até aumentadas em função da quantidade de melanoidinas formadas. Este efeito foi mais acentuado no café. Houve um aumento ainda maior, quando se comparou a capacidade antioxidante do café coado com grãos torrados do que com o café coado com grãos *in natura* no qual a atividade antioxidante é exercida pela presença de compostos fenólicos. Embora o café torrado tenha uma atividade antioxidante maior do que o café *in natura*; quando se aplica uma intensidade de torrefação acentuada (torra escura) observa-se uma diminuição da atividade antioxidante desses grãos em relação aos submetidos a torrefação moderada.

Em pesquisa realizada por Iwai et al. (2004), o ácido 5-cafeoilquínico foi isolado do café. A atividade antioxidante deste ácido fenólico foi testada pelo método DPPH comparando sua atividade com o ácido ascórbico e o α -tocoferol. O ácido 5-cafeoilquínico apresentou atividade superior à dos antioxidantes estudados. No DPPH o ácido 5-cafeoilquínico apresentou uma $IC_{50} = 10,2 \mu M$ enquanto o α -tocoferol e o ácido ascórbico tiveram $IC_{50} = 9,8 \mu M$ e $7,8 \mu M$ respectivamente.

2.6.2 Antioxidantes e câncer

A atividade antimutagênica de substâncias inerentes a alguns alimentos é exercida através da capacidade antioxidante, da indução de sistemas enzimáticos envolvidos na detoxificação de xenobióticos e da inativação de carcinógenos (FAIST e ERBERSDOBLER, 2001). Ambas as fases do processo de carcinogênese são caracterizadas por um estado oxidativo crônico, especialmente na etapa de promoção. Além disso, a fase de iniciação está associada a um dano irreversível no material genético da célula que, muitas vezes, é resultante da ação de radicais livres. Desse modo, os antioxidantes poderiam reduzir o risco de câncer inibindo

danos oxidativos no DNA (SILVA e NAVES, 2001). Segundo Gonthier et al. (2003), o café tem a propriedade de inibir dano oxidativo do DNA.

A ação quimiopreventiva também ocorre pela indução de sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo de xenobióticos e na conjugação de seus metabólitos para otimizar sua excreção. Entre os mais potentes indutores destas enzimas estão substâncias antioxidantes como os compostos fenólicos (FAIST e ERBERSDOBLER, 2001; KWEON, WANG e SUNG, 2001). Segundo Zheng e Wang (2003), os ácidos fenólicos apresentam atividade antioxidante e anticarcinogênica.

Okamura et al. (2005) citam que o café tem a capacidade de modular sistemas enzimáticos. Ainda segundo estes autores, em diversos estudos epidemiológicos foi observado uma relação direta entre consumo de café e redução do risco de alguns tipos de câncer entre eles o carcinoma de cólon. Resultados de outros estudos feitos com animais evidenciaram e reafirmaram o efeito anticarcinogênico do café e sua ação estimuladora sobre enzimas hepáticas (citocromo P450 1A2, UDP-glucuronosil transferases e glutathione S-transferases) que atuam na detoxificação durante a carcinogênese.

Os mesmos autores testaram o efeito do café nas reações de conjugação em células da linhagem Caco-2. Estas células foram suplementadas com 200 μ M de 1-naftol que atua como acceptor de sulfato e diferentes doses de café com valor máximo de 5%. As medidas de deposição de 1-naftil sulfato e glicuronídeo (produtos das reações de conjugação) no meio de cultura foram feitas por HPLC após 24 h. Foi observada acentuada redução nas reações de sulfo-conjugação (< 50% em relação ao controle) nas células tratadas com café (IC_{50} = 4,3%). A inibição ocorreu com uma relação dose dependente. O café também foi eficaz na inibição da atividade da sulfotransferase (SULT) contra o 1-naftol *in vitro* (IC_{50} = 5,1%). Não foi verificada inibição das reações de glucuronidação (conjugação com ácido glicurônico) e da atividade da enzima UDP-glucuronosil transferase (UGT) *in vitro*. Em trabalhos anteriores a bioativação da carcinogênese foi atribuída às reações de sulfoconjugação. Assim, a atividade inibitória do café nas reações citadas pode ser a explicação para a redução de risco de câncer verificada em estudos epidemiológicos.

A associação inversa entre o consumo de café e a incidência de câncer no cólon, referida em alguns estudos epidemiológicos pode ser explicada, em parte, pela presença de ácido clorogênico (OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, 2001). Em um

estudo populacional realizado no Japão pesquisou-se a associação entre hábito de beber café e a redução do risco de câncer hepático. A redução do risco foi medida pela taxa de risco (HR= taxa de risco). Indivíduos que consumiam café diariamente tiveram uma redução do risco de carcinoma hepático em relação aos que raramente ingeriam a bebida (HR= 0.49). Verificou-se uma redução do risco com o aumento do consumo de café. Comparados aos indivíduos que nunca ingeriam café, aqueles que consumiam de 1 - 2 xícaras/dia tiveram uma taxa de risco de HR= 0,52, 3 - 4 xícaras/dia (HR= 0,48) e uma ingestão de pelo menos cinco xícaras/dia foi relacionada a uma taxa de risco de HR= 0,24. A pesquisa teve duração de 10 anos e neste período foi registrado que o risco de câncer hepático no grupo que ingeria café raramente foi de 547,2 casos/10.000 pessoas, mas foi de apenas 214,6 casos/10,000 pessoas para o grupo que ingeria café diariamente (INOUE et al., 2005).

Azuma et al. (2000) pesquisaram a composição das folhas de *Corchorus olitoris* L., um vegetal com intensa capacidade antioxidativa, e verificaram que o ácido clorogênico é o antioxidante predominante. Em estudos anteriores, foi descrito que os ácidos clorogênicos inibem a carcinogênese e aumentam a capacidade do sistema de defesa antioxidante *in vivo*. O ácido clorogênico exerce efeitos anticarcinogênicos no epitélio do intestino grosso, do fígado e da língua (GONTHIER et al., 2003).

2.6.3 Antioxidantes, doenças cardiovasculares e desordens neurológicas

O radical hidroxil ($\text{OH}^{\bullet}$) é freqüentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação. Entretanto, estudos recentes indicam que o ferro também desempenha papel determinante na iniciação deste processo, sendo necessária uma relação equimolar $\text{Fe}^{+++}:\text{Fe}^{++}$ no meio, para que ocorra a lipoperoxidação.

A oxidação da LDL estimula a internalização de colesterol nos macrófagos que se convertem em células espumosas e se depositam no sistema circulatório contribuindo para a formação da placa de ateroma, ocorrência de acidentes cardiovasculares e morte celular. Além disso, os macrófagos ativados liberam radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e enzimas hidrolíticas. O processo pode ser catalisado pela presença de ferro (SILVA e NAVES, 2001).

O sistema nervoso central é particularmente sensível aos efeitos tóxicos do estresse oxidativo devido à grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados que compõe a bainha de mielina e às funções essenciais que elas desempenham (BRAUGHLER e HALL, 1989). O papel do ferro neste tipo de agressão é demonstrado pela diminuição da degeneração cerebral pós-trauma em animais experimentais recebendo quelante de ferro (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). É possível que a quelação do ferro liberado após o trauma iniba a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio catalisada por este metal.

Algumas doenças freqüentes na velhice como a doença de Parkinson, o acidente vascular cerebral, a doença de Alzheimer, a esclerose múltipla e a catarata foram caracterizadas como conseqüentes ao estresse oxidativo (SILVA e NAVES, 2001).

Apesar da etiologia da doença de Parkinson e de suas desordens neurodegenerativas ainda não serem totalmente esclarecidas, recentes evidências de experimentos com animais indicaram que alterações das funções do ferro no metabolismo celular, a indução do estresse oxidativo pelo ferro e a formação de radicais livres são os principais fatores patogênicos da doença de Parkinson. Os efeitos degenerativos resultantes da ação destes fatores podem levar à morte celular e a manifestação de distúrbios bioquímicos de relevância clínica (JELLINGER, 1999).

Os fatores de risco para as doenças de Parkinson e de Alzheimer são os mesmos relacionados aos processos de aterogênese e doenças relacionadas: idade, hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia, tabagismo, doenças cérebro e cardiovasculares, entre outros (CARAMELLI e BARBOSA, 2002).

Embora não se saiba se a acumulação de ferro no cérebro e o estresse oxidativo sejam causas ou conseqüências deste processo patológico, atualmente, a farmacoterapia aplicada no tratamento da doença de Parkinson e a outras patologias relacionadas ao estresse oxidativo inclui estratégias neuroprotetoras através da administração de antioxidantes. Esta prática tem sido recomendada para o alívio dos sinais e sintomas destas doenças e também para a redução do risco dessas patologias (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Outras considerações a serem feitas para justificar a terapia dos antioxidantes são os diversos estudos *in vitro*, experimentos com animais e estudos epidemiológicos, onde o consumo de fontes naturais de antioxidante e maiores

concentrações plasmáticas tiveram correlação inversa com a incidência de câncer, especialmente do trato gastrointestinal, doenças cardiovasculares, doença de Alzheimer, hipertensão arterial (AZUMA et al., 2000; CINTRA e MANCINI-FILHO, 2001).

Antioxidantes agem como seqüestrantes de compostos redutores, radicais livres, oxigênio singlete e como supressores de metais pró-oxidantes como cobre e ferro (ALMEIDA-DORIA e REGITANO-D'ARCE, 2000).

O café apresenta atividade antioxidante três vezes maior do que o vinho tinto e cinco vezes superior ao chá verde (MOREIRA et al., 2005). Estes autores realizaram trabalho em que foi empregado o método FRAP para avaliar a atividade antioxidante do café Arábica e Robusta nos níveis de torra clara, média e escura em pó e solúvel. As amostras também foram testadas na forma normal e descafeinada. Foi observado que a capacidade do café em reduzir o ferro foi maior nas amostras moídas do que nas amostras na forma solúvel. Esta relação também foi verificada para a variedade Robusta em relação à Arábica. Houve uma forte correlação ($r > 0.91$) entre o valor da atividade redutora das amostras e o conteúdo de ácidos clorogênicos. A atividade redutora das amostras diminuiu proporcionalmente com a intensidade da torra e não houve diferença significativamente estatística quanto a atividade redutora das amostras convencional e descafeinada, demonstrando com isto que a cafeína não participa deste processo.

Os potenciais efeitos salutareos dos ácidos hidroxicinâmicos e de seus derivados estão relacionados à sua capacidade antioxidante. Diversos estudos registram a capacidade destes compostos de reduzir o risco de oxidação da LDL e diminuir a aterogênese. Segundo Andreassen et al. (2001) a capacidade de inibir a oxidação da LDL humana pelos ácidos hidroxicinâmicos em ordem decrescente foi a seguinte: ácido caféico > ácido sinápico > ácido ferúlico > ácido *p*-cumárico. Segundo Gonthier et al. (2003), o café aumenta a resistência da LDL à lipoperoxidação.

Macheix, Fleuriet e Billot (1990) pesquisaram a atividade antioxidante de extratos de sementes de vários frutos e verificaram que os compostos fenólicos presentes nestes vegetais são os derivados hidroxilados do ácido benzóico e ácido cinâmico. A comparação da atividade antioxidante desses compostos mostrou que ela foi maior nos ácidos caféico, clorogênico, ferúlico, sináptico e *p*-cumárico, presentes em altas concentrações no café, do que nos derivados do ácido benzóico como o ácido *p*-hidroxibenzóico, vanílico e siríngico (LARSON, 1988).

De acordo com Daglia et al. (2000), tanto o café *in natura* quanto o café torrefeito têm atividade antioxidante e inibem a lipoperoxidação.

A partir das considerações feitas conclui-se que o café, devido a sua composição diversificada de substâncias antioxidantes, representa uma alternativa promissora a ser aplicada na redução do risco e tratamento das doenças crônicas não transmissíveis.

2.7 Análise sensorial

Da produção ao consumo, o café passa por um longo ciclo durante o qual a composição química de seus grãos pode ser afetada por fatores genéticos, tratamentos culturais, características do ambiente de cultivo, processos de secagem, fermentação, torrefação, moagem e envase que influenciam o aroma, o sabor e atividade antioxidante da bebida preparada a partir dele (FAVARIN et al., 2004; SILVA et al., 2004).

A torrefação afeta de forma consistente o teor de fenólicos e a formação das melanoidinas. A torra moderada acentua esta característica, porém, feita de maneira intensa, exerce efeito negativo sobre a atividade antioxidante dos produtos submetidos a este processamento (CHARURIN, AMES e DEL CASTILLO, 2002). Os cafés brasileiros caracterizam-se por uma torrefação excessiva (cerca de 220°C por 12 a 15 min) para o café Arábica o que confere ao produto baixa qualidade de bebida. A abertura comercial e a procura do consumidor nacional por um produto de melhor qualidade trazem a necessidade de aprimoramento do padrão nacional de torrefação (MOURA et al., 2003). A demanda por café diferenciado intensificou-se a partir da década de 90, criando novas oportunidades e estimulando a relação entre o cafeicultor e o cliente (FAVARIN et al., 2004).

Visando manter o ritmo de “marketing” e modernização da indústria de bebidas, o setor de café promove estratégias mercadológicas buscando identificar e atender os anseios dos consumidores em relação a seus produtos e derivados. Neste contexto, a inovação em tecnologias e produtos e a melhoria contínua de sua qualidade constituem elementos decisivos para alcançar e sustentar vantagens competitivas e, assim, favorecer o crescimento econômico e a satisfação dos consumidores (ROCHA e FERREIRA, 2001). As técnicas de análise sensorial têm grande aplicação para se determinar a aceitação de um produto novo ou que foi

melhorado. Testes de aceitação caracterizam uma atitude positiva diante do consumo real de um alimento, atitude essa demonstrada por algum grau de gostar (SILVA et al., 2004).

A determinação da aceitação pelo consumidor é fundamental no processo de desenvolvimento ou melhoramento de produtos (DANTAS et al., 2004). Assim, a análise sensorial representa um importante instrumento para estimar a aceitação do produto pelos consumidores.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a composição e avaliar a atividade antioxidante de café (*Coffea arabica*, L.) e submetido a diferentes condições de torrefação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição química do café *in natura* e torrado em diferentes condições de tempo e temperatura.
- Determinar o perfil de ácidos graxos da fração lipídica das respectivas amostras.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos etéreo, etanólico e aquoso e das frações de ácidos fenólicos livres, ésteres de ácidos fenólicos solúveis e ácidos fenólicos insolúveis ligados obtidos dos grãos de café *in natura* e torrados em diferentes condições de tempo e temperatura.
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos com atividade antioxidante presentes nas frações de ácidos fenólicos das amostras estudadas.
- Realizar avaliação sensorial da bebida de café preparada com grãos submetidos a diferentes condições de torra.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vivo* do extrato de maior atividade antioxidante *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Animais

Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade Albinus Rodentia, *MAMMALIA*) da linhagem Wistar Hannover – WH – IQ/FCF, recém desmamados com peso médio $51\text{g} \pm 1,29$ procedentes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas em ambiente com as seguintes condições: temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade $55 \pm 10\%$, 15 - 20 trocas de ar/hora, luminosidade 12 horas luz/12 horas escuro segundo as determinações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (1991).

4.1.2 Amostras

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

4.1.3 Reagentes

SIGMA-ALDRICH: ácido bórico, β -caroteno, ácido linoléico (99% de pureza), ácido heptadecanóico H-3500, ácido salicílico, ácido cinâmico, ácido vanílico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido *o*-cumárico, ácido protocatequínico, ácido quínico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido caféico, ácido sinápico, ácido clorogênico, ácido *t*-cinâmico, ácido elágico, padrão catequina (98% de pureza), antioxidante sintético butil hidroxi tolueno, padrão interno para determinação do perfil de ácidos fenólicos (metil éster de ácido heptadecanoato C17:0), mistura de padrões de metil ésteres (C4:0 a C24:0) para determinação do perfil de ácidos graxos, emulsificante Tween 40 (Monopalmitato de polioxietilenosorbitana), N,O-bis

(trimetilsilil)-acetamida (BSA), 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), ácido tiobarbitúrico (TBA), cloreto de sódio, albumina sérica bovina, heparina.

Merck: reagente Folin-Ciocalteu, ácido bórico, bicarbonato de sódio, hexano, tetrahidrofurano, metanol, acetato de etila, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, sulfato de sódio anidro, n-butanol, sulfato de cobre penta hidratado, sulfato de sódio anidro, carbonato de sódio, reativo de Bradford, éter etílico, ácido sulfúrico, clorofórmio, éter de petróleo, etanol absoluto, acetona, fosfato de sódio monobásico anidro, fosfato de sódio dibásico anidro.

O óleo refinado de soja sem antioxidante gentilmente cedido pela empresa Cargil Agrícola S/A (unidade Mairinque – S.P.).

4.2 Métodos

4.2.1 Torrefação do café

FIGURA 2 Processamento das amostras.

A amostra de café foi dividida em sete porções iguais sendo que somente uma delas não foi submetida à torrefação (controle). A torrefação das demais porções foi

feita em intensidade média empregando-se tempos de 10 e 20 minutos e temperaturas de 140, 160 e 180°C (DAGLIA et al., 2000).

As amostras foram torradas no ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos – Campinas - SP) utilizando uma torradora de prova da marca Probat modelo BRZZ ilustrada na **FIGURA 3**.

FIGURA 3 Torradora de prova para processamento de café.

4.2.2 Obtenção do pó de café

As amostras foram moídas à temperatura ambiente, em moinho de facas, e peneiradas (Tamis de malha 32 mesh). Em seguida, o material foi acondicionado em frascos de vidro, cobertos com papel alumínio, sob atmosfera de nitrogênio e armazenados a –20°C até a realização das análises.

4.2.3 Determinação da composição centesimal

As análises da composição centesimal do pó de café foram feitas em triplicata e determinadas conforme descrito abaixo:

As determinações de umidade, lipídios, proteínas e resíduo mineral fixo foram feitas segundo a AOAC (2000).

A determinação de glicídios totais foi obtida pela diferença entre 100 e o somatório das determinações de umidade, lipídios, proteína e resíduo mineral fixo. Consideram-se como glicídios todos os carboidratos.

4.2.4 Determinação do perfil de ácidos graxos dos grãos de café

Inicialmente, foi feita a obtenção da fração lipídica e, posteriormente, este material foi esterificado para ser analisado por cromatografia gasosa.

A obtenção da fração lipídica das amostras foi feita segundo o método descrito por Folch, Lees e Stanley (1957).

Pesou-se 1 g do pó de café e adicionou-se 10 mL de metanol, homogeneizando-se a mistura por 1 minuto em homogeneizador à temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se 20 mL de clorofórmio a solução que foi novamente homogeneizada por 2 minutos. Aguardou-se a separação de fases e o sobrenadante foi filtrado a vácuo utilizando funil de Büchner e coletado em proveta de 250 mL com tampa. O resíduo foi homogeneizado com 30 mL de uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1 v/v) por 3 minutos, seguida de filtração a vácuo do sobrenadante. Fez-se nova extração com mais 30 mL da mistura clorofórmio:metanol, seguida de filtração a vácuo. Adicionou-se solução de KCL 0,88% em um volume equivalente a 1/4 do volume do filtrado. A mistura foi agitada manualmente e deixada em repouso para haver separação de fases. Em seguida, a fase superior foi aspirada a vácuo com pipeta Pasteur e desprezada. O volume da fase inferior foi medido e 1/4 deste valor foi adicionado de uma solução de metanol: água (1:1 v/v). A mistura foi novamente agitada e deixada em repouso para separação de fases. A fase superior foi aspirada a vácuo e eliminada e a fase inferior foi filtrada em sulfato de sódio anidro e rotaevaporada a 35°C para evaporação do solvente. A fração lipídica foi ressuspensa em 5 mL de clorofórmio, acondicionada em frasco âmbar, sob atmosfera de nitrogênio e armazenada em congelador a -20°C.

4.2.4.1 Esterificação e identificação de ácidos graxos

A determinação do perfil de ácidos graxos que compõem a fração lipídica do pó de café foi feita seguindo-se o método de Hartman e Lago (1973). O método consiste na esterificação e análise dos ácidos graxos por cromatografia gasosa.

Uma alíquota da fração lipídica obtida no **ITEM 4.2.4** equivalente a 50 mg do conteúdo lipídico foi coletada em um tubo de esterificação e evaporada com nitrogênio. Em seguida, foram adicionados 2 mL de hidróxido de sódio 0,5 N metanólico e o material foi colocado em banho fervente (100°C) por 5 minutos. Após esfriar, a amostra foi acrescida de 6 mL de mistura de esterificação e colocada em banho fervente por 3 minutos. Após atingir temperatura ambiente, adicionaram-se 5 mL de cloreto de sódio saturado ao tubo e o mesmo foi agitado. Após separação de fases, os ésteres metílicos contidos na fase superior foram transferidos para outro tubo e adicionados de 2 mL de hexano P.A.. A fase superior (orgânica) foi transferida para outro tubo com auxílio de pipeta Pasteur. O processo de extração a partir da fase inferior foi repetido por mais duas vezes. Às fases superiores coletadas foram adicionados 5 mL de solução saturada de cloreto de sódio, agitado e deixado em repouso para haver separação de fases. A fase superior foi transferida para um balão do rotaevaporador e evaporada até a secura a 35°C. O conteúdo lipídico foi ressuspenso em 1 mL de hexano P.A. para ser injetado no cromatógrafo.

4.2.4.2 Análise do perfil de ácidos graxos dos grãos de café por cromatografia gasosa

A identificação dos ácidos graxos que constituem a fração lipídica dos grãos de café Arábica foi feita por cromatografia gasosa utilizando aparelho da marca Shimadzu GC, modelo 17A (Kyoto – Japão), com detector de ionização de chama conectado a um integrador CG (Shimadzu, modelo CBM 101). Os parâmetros foram controlados através do software Workstation Class GC10. A identificação dos ácidos graxos das amostras foi realizada com base na comparação dos tempos de retenção com padrões de ácidos graxos (Sigma) determinados nas mesmas condições. A quantificação foi realizada com base na porcentagem de área dos picos. As análises foram feitas em triplicata.

As condições cromatográficas adotadas foram as seguintes:

- Coluna cromatográfica de sílica fundida Supelcowax 10, de 30 metros de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno,
- Gás de arraste: Hélio (fluxo de 1 mL/minuto),

- Programação da temperatura da coluna:
 - Coluna: aquecimento a 1°C/minuto de 170°C até 225°C permanecendo nessa temperatura por 10 minutos,
 - Temperatura do injetor: 250°C,
 - Temperatura do detector: 270°C,
 - Volume de injeção da amostra: 1 µL (leitura feita em triplicata).
- Razão de divisão da amostra no injetor: 1:50

4.2.5 Obtenção de extratos dos grãos de café

A obtenção dos extratos dos grãos de café foi realizada através do processo de extração seqüencial utilizando solventes em ordem crescente de polaridade (éter etílico, álcool etílico, água destilada) segundo Gómez (2003), porém partindo de 5 g de amostra. O processo está descrito na **FIGURA 4**. Este procedimento foi empregado para as amostras de café *in natura* e torradas a 140°C/10 min, 140°C/20 min, 160°C/10 min, 160°C/20 min, 180°C/10 min e 180°C/20 min.

Para obtenção dos extratos de cada amostra, foram pesados 5 g de pó de café não desengordurado e adicionado de 100 mL de éter etílico. Esta solução foi mantida sob agitação por 1 hora, a temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi filtrada a vácuo utilizando funil de Büchner e papel de filtro. Ao filtrado adicionou-se éter etílico para completar o volume para 100 mL. O resíduo ficou em temperatura ambiente para evaporação do solvente e, em seguida, foi utilizado para obtenção seqüencial do extrato etanólico e aquoso na proporção de 1:20 amostra: solvente seguindo os mesmos passos empregados na obtenção do extrato etéreo. Os extratos foram acondicionados em frascos âmbar, em atmosfera de nitrogênio e armazenados a -20°C.

FIGURA 4 Esquema de obtenção dos extratos etéreo, etanólico e aquoso do pó de café (*Coffea arabica*, L.) (GÓMEZ, 2003).

4.2.6 Obtenção das frações de ácidos fenólicos dos grãos de café

A obtenção de frações de ácidos fenólicos livres, ésteres de ácidos fenólicos solúveis e ácidos fenólicos insolúveis ligados foi realizada segundo o método descrito por Krygier, Sosulski e Hogge (1982) e por Dabrowski e Sosulski (1984). O processo está descrito na **FIGURA 5**.

FIGURA 5 Esquema de obtenção das frações de ácidos fenólicos livres, ésteres de ácidos fenólicos solúveis e ácidos fenólicos insolúveis ligados de grãos de café (*Coffea arabica*, L.) (SOTERO, 2002).

4.2.6.1 Obtenção de ácidos fenólicos livres (AFL)

Para a extração de ácidos fenólicos livres pesou-se 1 g de cada amostra (previamente desengordurada), adicionaram-se 20 mL de tetrahidrofurano e homogenizou-se por 1 minuto em vortex. A mistura foi deixada em repouso e a fase superior foi aspirada e filtrada em sulfato de sódio anidro sendo coletada em balão de rotaevaporador protegido da luz. A extração foi repetida mais 5 vezes. O volume total do filtrado foi rotaevaporado a 40°C, ressuspenso em 10 mL de tetrahidrofurano, acondicionado em atmosfera de nitrogênio e armazenado em congelador a -20°C até o momento das análises. O resíduo dos ácidos fenólicos livres foi usado para obtenção das frações de ésteres de ácidos fenólicos solúveis e fração de ácidos fenólicos insolúveis ligados.

4.2.6.2 Tratamento do resíduo dos ácidos fenólicos livres

O resíduo dos ácidos fenólicos livres foi submetido a 6 extrações com adição de 20 mL da mistura metanol:acetona:água (7:7:6) em cada extração, homogeneizando-se por 5 minutos com vortex. A cada extração o sobrenadante foi recolhido em balão de rotaevaporador protegido da luz. Ao final das 6 extrações, a mistura dos seis sobrenadantes foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C em centrífuga refrigerada.

4.2.6.3 Obtenção de ésteres de ácidos fenólicos solúveis (EAFS)

A obtenção dos ésteres de ácidos fenólicos solúveis foi feita a partir do sobrenadante obtido no **ITEM 4.2.6.2**. O volume foi rotaevaporado até a fase aquosa em balão protegido da luz a 40°C. O volume da fase aquosa foi medido e acrescido de igual volume de solução de hidróxido de sódio 4 N. A mistura foi colocada sob agitação, à temperatura ambiente, com adição constante de nitrogênio, protegido da luz, durante 3 horas. Após a hidrólise alcalina, o pH foi ajustado para 2,0 com adição de ácido clorídrico 6 N.

O sobrenadante obtido foi coletado em funil de separação e foram feitas 6 extrações adicionando-se 30 mL de hexano a amostra. A mistura foi agitada e, após

repouso e separação nítida de fases, a fase superior (hexânica) foi descartada. A fase inferior foi transferida para o funil e adicionaram-se mais 30 mL de hexano para realização de nova extração. Após 6 extrações, o volume final da fase inferior foi medido e acrescentou-se igual volume de uma mistura de éter etílico:acetato de etila: tetrahidrofurano (1:1:1), utilizando funil de separação. O funil foi agitado e deixado em repouso e a fase superior foi coletada em um béquer (amostra), e a fase inferior foi utilizada para uma nova extração com mesmo volume da mistura de éter etílico:acetato de etila: tetrahidrofurano (1:1:1) usado na primeira extração. Foram feitas 6 extrações. Ao final, todo o volume da fase superior coletado foi filtrado com sulfato de sódio anidro em balão de rotaevaporador, protegido da luz e evaporado em rotaevaporador a 40°C. O resíduo obtido foi ressuspenso em 10 mL de tetrahidrofurano, acondicionado em atmosfera de nitrogênio e armazenado em congelador a -20°C até o momento das análises.

4.2.6.4 Obtenção de ácidos fenólicos insolúveis ligados (AFIL)

A obtenção dos ácidos fenólicos insolúveis ligados foi feita a partir do resíduo de obtido no **ITEM 4.2.6.2** ao qual foram adicionados 20 mL de hidróxido de sódio 4 N para realização de hidrólise alcalina. A mistura foi colocada sob agitação, à temperatura ambiente, com adição constante de nitrogênio, protegido da luz, durante 3 horas. Após a hidrólise alcalina, o pH foi ajustado para 2,0 com adição de ácido clorídrico 6 N, seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 10 min a 4°C.

O sobrenadante obtido foi coletado em funil de separação e foram feitas 6 extrações. Adicionaram-se à amostra 30 mL de hexano. A mistura foi agitada duas vezes. Após repouso e separação nítida de fases, a fase superior (hexânica) foi descartada. A fase inferior foi transferida para o funil e adicionaram-se mais 30 mL de hexano para realização de nova extração. Após 6 extrações, o volume final da fase inferior foi medido e acrescentou-se igual volume de uma mistura de éter etílico:acetato de etila: tetrahidrofurano (1:1:1) utilizando-se funil de separação. O funil foi agitado, deixado em repouso e a fase superior foi coletada em um béquer (amostra). A fase inferior foi utilizada para uma nova extração com mesmo volume da mistura de éter etílico:acetato de etila: tetrahidrofurano (1:1:1) usado na primeira extração. Foram feitas 6 extrações. Ao final, todo o volume da fase superior coletado

foi filtrado com sulfato de sódio anidro em balão de rotaevaporador protegido da luz e evaporado em rotaevaporador a 40°C. O resíduo obtido foi ressuspensão em 10 mL de tetrahidrofurano, acondicionado em atmosfera de nitrogênio e armazenado em congelador a -20°C até o momento das análises.

4.2.7 Determinação de fenólicos totais

O método é baseado na redução do reagente de Folin-Ciocalteu que detecta compostos com base no poder redutor de seus grupamentos hidroxila, apresentando ao final uma coloração azul. É um método inespecífico, pois sofre interferência de compostos não fenólicos que apresentam capacidade redutora tais como vitamina C, açúcares, aminoácidos.

Apresenta como vantagens o baixo custo, a boa reprodutibilidade e a simplicidade de aplicação sendo considerado por isto uma análise de rotina. O seu uso também é indicado por um ser um método bastante citado por diferentes autores (HUANG, OU e PRIOR, 2005; PRIOR, WU e SCHAICH, 2005).

A concentração de fenólicos totais presentes nos extratos e frações fenólicas obtidos a partir do pó de café foi estimada segundo o método espectrofotométrico descrito por Swain e Hillis (1959) utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e a catequina como padrão.

Foi preparada uma solução de catequina (1 mg/mL em metanol) para a construção da curva padrão utilizando-se alíquotas que variam de 0,015 µL a 0,075 µL. Estes volumes foram completados para 500 µL com metanol, e as medidas de suas absorbâncias foram usadas para construção da curva padrão. Para as amostras (extratos e frações) foram pipetados volumes que variaram de 60 µL a 500 µL completados, quando necessário, para 500 µL com o solvente apropriado (água destilada para as frações e o solvente correspondente a cada tipo de extrato). As análises foram feitas em triplicata. Foi preparado um branco onde a alíquota da amostra foi substituída por 0,5 mL de metanol. Às alíquotas de catequina e das amostras adicionaram-se em seqüência a todos os tubos 0,5 mL de metanol, 7 mL de H₂O destilada, 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Após três minutos, adicionou-se 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio. Os tubos foram agitados e, após 1 hora, a leitura foi efetuada em espectrofotômetro em comprimento

de onda de 725 nm. Os cálculos da concentração de fenólicos totais foram feitos do seguinte modo:

$$K = \frac{A}{C}$$

K= constante da curva-padrão

A = absorvância

C= concentração

Inicialmente foi calculada a média de K, e a partir desta, a concentração da amostra, expressa como mg/g.

4.2.8 Identificação dos compostos fenólicos nas frações de ácidos fenólicos

A identificação dos ácidos fenólicos livres, dos ésteres de ácidos fenólicos solúveis e dos ácidos fenólicos insolúveis ligados nas amostras estudadas foi realizada empregando-se a metodologia descrita por Dabrowski e Sosulski (1984).

Obtenção dos padrões de ácidos fenólicos: Os padrões dos ácidos fenólicos utilizados no cromatógrafo a gás por espectrometria de massa para identificação dos compostos fenólicos presentes nas amostras em estudo foram obtidos da Sigma.

Derivatização das amostras: Antes de serem analisadas por cromatografia a gás as amostras foram evaporadas sob atmosfera de nitrogênio e submetidas à derivatização. Esse processo de silinização foi feito para esterificar os ácidos fenólicos permitindo a análise por cromatografia a gás.

Para cada amostra foram pipetados 250 µL em vials que foram evaporados com nitrogênio e adicionados com 100 µL de padrão interno (éster metila de ácido heptadecanóico). A mistura foi evaporada sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida a amostra foi derivatizada com 200 µL de N, O-BIS (Trimetilsilil) acetamida (BSA). Em seguida a amostra foi incubada a 60°C por 30 min e, logo após, a amostra foi injetada no cromatógrafo.

As determinações foram feitas utilizando cromatógrafo a gás GC Shimadzu QP 5000, equipado com detector de ionização de chama. A separação foi feita em coluna capilar de sílica fundida – J&W (5% fenil - metilpolisiloxano - 30m x 0,25mm x 0,25 nm de diâmetro).

As condições para a análise dos ácidos fenólicos por cromatografia obedeceram a seguinte programação:

- Gradiente de temperatura: iniciou-se com 150°C, mantendo-se a temperatura durante 3 minutos. Finalizado este período, a temperatura foi programada para aumentar, aquecendo 5°C/minuto, até 300°C, mantendo-se a temperatura por mais 3 minutos.
- Temperatura da câmara injetora: 310°C
- Temperatura do detector: 320°C
- Gás de arraste: He
- Fluxo: 1 mL/min
- Razão de divisão da amostra no injetor (Split): 1/50
- Volume de injeção: 1 µL

As áreas dos picos foram calculadas por um integrador GC Workstation Class-GC-10 (Shimadzu). Os ácidos fenólicos foram identificados comparando os tempos de retenção com os dos padrões Sigma e baseando-se no padrão interno (éster metila de ácido heptadecanóico). A quantificação dos ácidos fenólicos foi feita por padronização interna, e os resultados foram expressos em mg/g de amostra.

Os cromatogramas dos padrões de ácidos fenólicos e das frações de ácidos fenólicos do café torrado a 160°C/20 min estão apresentados nos **ANEXOS 1 e 2**.

4.2.9 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico

A determinação da atividade antioxidante foi realizada através do sistema β -caroteno e ácido linoléico, segundo Marco (1968) e modificado por Miller (1971). O princípio do método é a medida da oxidação do β -caroteno induzida pelos produtos da oxidação do ácido linoléico, oxigênio e temperatura. Esta medida é expressa pelo

decaimento da densidade óptica da solução de β -caroteno (GIADA e MANCINI-FILHO, 2004; TZAQ et al., 2005). As concentrações empregadas para as amostras foram 50, 100 e 200 ppm. Estas determinações foram feitas utilizando um controle (sem antioxidante) e um padrão positivo BHT. O eventual efeito sinergista foi testado associando-se os extratos e o BHT em concentrações 50% menores que as usadas isoladamente.

Aos volumes das amostras, do BHT e do controle foram adicionados 5 mL da emulsão de β -caroteno. Os tubos foram tampados, agitados e as leituras das absorbâncias foram feitas a cada 15 minutos durante 2 horas, sendo que, após a primeira leitura, os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C. As determinações da atividade antioxidante do branco, do BHT e das amostras foram realizadas em triplicata.

A emulsão de β -caroteno foi preparada da seguinte forma: 20 μ L de solução de β -caroteno (20 mg/mL em clorofórmio), 40 μ L de ácido linoléico, 12 gotas (20 mg) de Tween 40 e 1,5 mL de clorofórmio. Após homogeneização da mistura, evaporou-se o solvente em atmosfera de nitrogênio e adicionaram-se 150 mL de água destilada (previamente submetida a oxigenação por 30 minutos) ou o suficiente para ajustar a absorbância da emulsão entre 0,6 e 0,7 em um comprimento de onda de 470 nm. Constatou-se a limpidez da emulsão ao final do preparo.

As porcentagens de inibição da oxidação foram calculadas com base na média do decaimento da densidade óptica do controle (D.O. inicial – D.O. final). O valor obtido é considerando como 100% de oxidação. O valor médio da queda na leitura da densidade óptica das amostras foi correlacionado com o controle e estabelecida a porcentagem de inibição da oxidação, subtraindo-se a porcentagem de oxidação de cada amostra de 100. Os cálculos foram feitos seguindo-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = \frac{X^1 (D.O. \text{ inicial} - D.O. \text{ final}) \text{ amostra}}{X^2 (D.O. \text{ inicial} - D.O. \text{ final}) \text{ controle}} \times 100$$

$$\% \text{ de atividade antioxidante} = 100 - \% \text{ de Oxidação}$$

Onde:

DO = densidade óptica

¹ $\bar{X}$ da diferença das absorbâncias de cada amostra (Abs. am_i – Abs. am_f)

² $\bar{X}$ da diferença das absorbâncias de cada controle (Abs. c_i – Abs. c_f)

A atividade antioxidante dos extratos e frações também foi analisada a partir do método das tangentes de dois intervalos das curvas cinéticas conforme método descrito por Yanishlieva e Marinova (1995). O fator F1 (fator de estabilização) foi calculado pela diferença da densidade óptica no intervalo entre os 15 e os 45 minutos da análise da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico. A relação entre as tangentes das curvas da solução padrão e do controle expressa a eficiência do antioxidante. O fator F2 (fator de proteção) foi calculado pela diferença da absorbância observada no período entre os 75 e 105 minutos da análise (**FIGURA 6**).

O fator F1 se refere à capacidade do antioxidante de bloquear as reações em cadeia causadas pelos radicais peróxidos. A efetividade do fator F1 está relacionada à capacidade da amostra de atuar como antioxidante primário doando hidrogênio para estabilizar os radicais livres e inibir ou retardar o processo de oxidação. Já o fator F2 representa a possibilidade do antioxidante de participar de outras reações como da decomposição dos hidroperóxidos, formando espécies radicalares que acelerem o processo oxidativo do sistema. Os valores de F2 indicam o potencial da amostra de atuar como antioxidante secundário, ou seja, de atuar com produtos da oxidação formados em estágios mais avançados do processo oxidativo como peróxidos decompondo-os ou estabilizando-os.

O trecho da curva correspondente ao período entre 75 e 105 minutos decorridos do início da reação é usado para medir a possibilidade do antioxidante participar das reações de formação de aldeídos, cetonas, hidroxiácidos, hidrocarbonetos e polímeros que são designados produtos secundários, já que são formados na etapa de propagação do processo oxidativo. A eficiência da atividade antioxidante está relacionada a valores de F1 e F2 com valor máximo igual a 1 (YANISHILIEVA e MARINOVA, 1995).

Quanto menores os valores de F1 e F2 maior a eficiência dos antioxidantes da amostra. Os valores de F2 tendem a ser maiores do que os de F1, e valores

maiores que um indicam que os antioxidantes contidos na amostra não têm uma atividade antioxidante satisfatória (YAHISHLIEVA e MARINOVA, 1995).

Os valores de F1 e F2 foram calculados a partir da seguinte equação (**FIGURA 6**).

FIGURA 6 Modelo de curva de decaimento obtida no sistema β -caroteno e ácido linoléico, para obtenção das tangentes e cálculo dos fatores cinéticos F1 e F2, onde (a) e (A) são os catetos opostos, obtidos através da diferença das absorvâncias (da amostra e do controle, respectivamente); (b) e (B) são os catetos adjacentes, obtidos através das diferenças entre os tempos (respectivamente, da amostra e do controle), de acordo com o fator cinético calculado.

$$F1 = \frac{\text{Tangente extrato } (\Delta \text{Absorvância no intervalo entre 15 - 45 min da curva})}{\text{Tangente controle } (\Delta \text{Absorvância no intervalo entre 15 - 45 min da curva})}$$

$$F2 = \frac{\text{Tangente extrato } (\Delta \text{Absorvância no intervalo entre 75 - 105 min da curva})}{\text{Tangente controle } (\Delta \text{Absorvância no intervalo entre 75 - 105 min da curva})}$$

NASCIMENTO et al., (2006)

4.2.10 Determinação da atividade antioxidante pelo método do Rancimat

A atividade antioxidante dos extratos e das frações de ácidos fenólicos obtidas a partir dos grãos de café foi determinada em meio lipídico mediante a aplicação do método Rancimat, que utiliza a medida do período de indução da oxidação do óleo

de soja sem antioxidante e óleo de soja adicionado dos extratos ou das frações de ácidos fenólicos ou de BHT (SOTERO, 2002).

O princípio do teste consiste na exposição do óleo a altas temperaturas e adição de oxigênio induzindo a autooxidação e formação de ácidos orgânicos voláteis, que são dissolvidos na água causando um aumento de sua condutimetria. A medida deste aumento é usada no cálculo do tempo de indução ou tempo de estabilidade de óleos e gorduras (VÁGI et al., 2005).

O aparelho utilizado foi Rancimat modelo 743, marca Metrohm (Herisau – Suíça), ligado ao programa PC: 743 Rancimat 1.0. O óleo de soja sem adição de antioxidante usado como substrato oxidativo foi fornecido pela empresa Cargill Agrícola S.A..

Os volumes dos extratos e das frações de ácidos fenólicos foram calculados com base no peso seco das amostras, para que as suas concentrações, quando adicionadas ao substrato (óleo de soja sem antioxidante), fossem iguais a 100 e 200 ppm, considerando 5 g de óleo. As amostras foram testadas juntamente com um branco ou controle negativo (óleo puro) e com antioxidante padrão BHT que foi usado nas mesmas concentrações da amostra.

O BHT foi pesado em um erlenmeyer de 50 mL com óleo de soja. As amostras foram pipetadas em um erlenmeyer de 50 mL juntamente com o óleo de soja. As amostras e os padrões foram sonicados por 15 minutos e, em seguida, foram pesados 5 g de cada mistura em tubos sendo feita triplicata para o BHT e para a amostra. Também foram pesados 5 g de óleo puro (branco) porém com apenas duas replicatas. Os tubos contendo a amostra, o branco e o BHT, além dos tubos coletores contendo 60 mL de água ultrapura (MiliQ) foram conectados ao aparelho, e procederam-se as análises para obtenção da curva de condutividade x tempo, a partir da qual se calculou o período de indução. A programação adotada para realização do teste foi a seguinte:

- Fluxo de oxigênio: 20L/h
- Temperatura: 110°C, $\Delta T = 1,5^\circ\text{C}$

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da oxidação em relação ao branco e foram calculados a partir da seguinte fórmula:

$$\% IO = 100 - \frac{(PI \text{ amostra})}{(PI \text{ branco})} \times 100$$

Onde:

%IO = porcentagem de inibição da oxidação

% PI = Período de indução (horas)

PI amostra = Período de indução do óleo de soja + amostra (extrato ou fração ou BHT)

PI controle = Período de indução do óleo de soja puro

4.2.11 Análise sensorial

Durante a torrefação do café, os valores de tempo e temperatura podem variar em função do grau de torra desejado, do torrador utilizado, da variedade do café, da idade e da umidade. Os grãos de café Arábica geralmente são torrados a 220°C por 12 - 15 min e os de café Robusta a 225 - 300°C por 22 - 28 min. Os cafés brasileiros geralmente são submetidos à torrefação excessiva (180°C/19 – 20 min) e isso leva à redução da qualidade de sua bebida (MOURA et al., 2003).

Considerando que em nossa pesquisa o café foi submetido a uma torra mais branda que a do padrão brasileiro, seu aroma, sua cor e seu sabor podem ter adquirido diferenças que talvez influenciem na aceitação da bebida preparada com estes grãos. Em vista disto, foi feita a avaliação sensorial da bebida preparada a partir de grãos submetidos a diferentes condições de torra, visando verificar o grau de aceitação destes produtos. A boa aceitação das bebidas irá favorecer o consumo do café torrado nas condições testadas e contribuirá para redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis.

Após testes *in vitro* para verificar a atividade antioxidante, foram selecionadas as amostras torradas a 140°C/20 min; a 160°C/20 min e a 180°C/10 min por apresentarem as maiores porcentagens de inibição da oxidação. Estas amostras então foram submetidas à avaliação sensorial.

4.2.11.1 Recrutamento dos provadores

Para realização da análise sensorial o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo conforme **ANEXO 3**.

O teste de avaliação sensorial de café foi realizado no Laboratório de Análise Sensorial da FCF/USP – São Paulo-SP. A realização da análise sensorial de café teve duração de apenas um dia e foi realizada nos horários de 9 às 12 h e de 13 às 17 h.

Participaram 80 provadores não treinados. Estes foram selecionados sem restrição de sexo e idade. O critério de inclusão dos indivíduos que participaram da pesquisa foi o hábito de consumir a bebida, e os critérios de exclusão foram a alegação de não ter o hábito de consumir café e de apresentar sintomas desagradáveis após a ingestão da bebida. O convite para participação da pesquisa foi feito pessoalmente a alunos, professores e funcionários da FCF/USP de São Paulo. Além disso, foram afixados cartazes na entrada de cada departamento da FCF divulgando a realização da análise sensorial de café.

Os participantes foram atendidos em cabines individuais onde, inicialmente, eles foram orientados sobre as condições da pesquisa e leitura e endosso do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido caso estivessem de acordo (**ANEXO 4**). Em seguida, foram servidas porções de 50 mL de bebidas preparadas com café torrado a 140°C/20 min, café torrado a 160°C/20 min e café torrado a 180°C/10 min de forma monádica e aleatória (**ANEXO 5**) (MONTEIRO, 2002).

4.2.11.2 Condições do teste, preparo e apresentação das amostras

De acordo com a recomendação da ABIC e de marcas comerciais de café 100% Arábica, encontradas em supermercados de grande porte situados na cidade de São Paulo - S.P., as amostras foram preparadas com água mineral e pó de café na proporção de 10 %, ou seja, 100 g de pó/L de água mineral. A infusão foi obtida utilizando-se coador de papel, sendo acondicionada em garrafa térmica com capacidade de 1 litro. Foram preparados 1 L de infusão de cada nível de torra/vez e

a bebida foi consumida em um período máximo de 1 hora após o preparo, para que ela fosse servida sempre a $\pm 70^{\circ}\text{C}$. Uma porção de 50 mL de cada bebida foi servida em copos de plástico, codificadas com um número de três dígitos. A bebida foi servida juntamente com sachês de açúcar refinado e adoçante tipo aspartame para adoçar o café de acordo com a preferência, biscoito tipo água e 80 mL de água mineral à temperatura ambiente, para que o provador retirasse a interferência de sabor entre as degustações da bebida.

4.2.12 Ensaio biológico

4.2.12.1 Definição do tratamento a ser administrado no procedimento experimental com animais de laboratório

Para escolha do tratamento a ser administrado aos animais foram feitas as seguintes considerações:

- Os extratos aquosos apresentaram atividade antioxidante *in vitro* superior aos extratos etanólico e etéreo.
- Não houve diferença significativa entre a atividade antioxidante *in vitro* do extrato aquoso de café torrado a $160^{\circ}\text{C}/20$ min e o café torrado a $180^{\circ}\text{C}/10$ min na concentração de 200 ppm ($p < 0,05$).
- Estas amostras também não diferiram quanto à aceitação na avaliação sensorial ($p < 0,05$).

Assim, o café torrado a $180^{\circ}\text{C}/10$ min foi selecionado para avaliar sua atividade antioxidante *in vivo*.

Em estudos epidemiológicos desenvolvidos durante aproximadamente dez anos, foi verificada uma redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e câncer hepático. Em todos os casos foi observado efeito dose-resposta com um resultado melhor para aqueles que consumiam pelo menos quatro xícaras de café/dia (HONJO et al., 2001; INOUE et al., 2005; VAN DAM e HU, 2005; ANDERSEN et al., 2006). A medida e a concentração das porções de café podem variar substancialmente entre países bem como entre regiões do mesmo país. A medida padrão da porção de café nos Estados Unidos é de aproximadamente 250 mL, enquanto que na Europa varia entre

125 - 150 mL e, embora o volume seja bem menor, sua proporção pó:água é bem maior (VAN DAM e HU, 2005). Nos estudos realizados por Andersen et al. (2006) e por Lopez-Garcia et al. (2006) a porção de café foi equivalente a uma xícara de 237 mL.

Para estabelecer as dosagens de café a ser ministradas aos animais levou-se em conta o consumo diário de cinco xícaras de 200 mL por um homem de 70 Kg. Se o café for preparado segundo a recomendação da ABIC, tem-se o uso de 100 g de pó/L de água. A partir disso, calculou-se o consumo equivalente para um rato de 50 g. Esta quantidade foi ajustada para um volume de 200 µL. Foi preparado um extrato aquoso com proporção pó:água de 100 g/L que foi fornecida aos animais nas seguintes doses:

TABELA 1 Identificação dos grupos de animais do experimento

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

4.2.12.2 Procedimento experimental com animais de laboratório

O projeto de pesquisa com animais foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Experimentação Animal da FCF/USP (**ANEXO 4**).

O experimento teve duração de 30 dias. Após o desmame foi feito um período de adaptação de 4 dias antes do início do tratamento.

Os animais foram pesados a cada três dias. O consumo da ração e o peso dos animais foram monitorados a cada três dias para realização da curva de ganho de peso e crescimento. O coeficiente de eficiência metabólica foi obtido através da fórmula (AL-OTHMAN et al., 1998):

$$CEM = \frac{\text{ganho de peso do animal (g)}}{\text{consumo de ração (g)}}$$

Os ratos foram divididos, aleatoriamente, em 5 grupos ($n = 8$). A suplementação dos animais foi feita diariamente, durante 30 dias e consistiu na administração, por gavagem, de extrato aquoso de café nas doses apresentadas na **TABELA 1**. O volume foi corrigido a cada três dias em função do peso corpóreo ($200 \mu\text{L}/50\text{g}$ de peso corporal).

Ao final dos 30 dias de tratamento, os ratos foram sacrificados por decapitação. O sangue foi coletado em tubo contendo $50 \mu\text{L}$ de heparina e centrifugado a 3000 rpm, a 5°C por 15 min para coleta do plasma. Também foram coletados o cérebro, o fígado e o coração. Os tecidos foram acondicionados, individualmente, em papel alumínio e colocados em recipiente contendo nitrogênio líquido. O plasma coletado e as outras amostras biológicas foram armazenados em congelador a -80°C até o momento das análises.

4.2.12.3 Caracterização da fração lipídica do plasma dos animais

A avaliação da capacidade antioxidante *in vivo* foi avaliada através da determinação do perfil de ácidos graxos do plasma dos animais de todos os grupos experimentais. Para tanto, as frações lipídicas do plasma foram obtidas e esterificadas conforme descrito nos **ITENS 4.2.4 a 4.2.4.2**.

4.2.12.4 Medida da lipoperoxidação pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foram determinadas as porcentagens de inibição da lipoperoxidação nos tecidos cerebral, cardíaco, hepático e no plasma dos animais do grupo controle e dos grupos tratados com extrato aquoso do café torrado a $180^\circ\text{C}/10$ min através da medida das concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) segundo metodologia descrita por Winterbourn, Gutteridge e Halliwell (1985). Esse método se baseia na avaliação da lipoperoxidação, mediante a medida da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA). Durante a reação, o malonaldeído (MDA) reage com o ácido tiobarbitúrico formando uma coloração avermelhada. A concentração do MDA é medida por espectrofotometria e relacionada à quantidade de proteína (WINTERBOURN, GUTTERIDGE e HALLIWELL, 1985).

Para tanto, foram obtidos homogenatos dos tecidos analisados pesando-se $0,6 \pm 0,01$ g de tecido e adicionando-se tampão fosfato de sódio (10 mM), pH= 7,4 na proporção de 1:10 (p/v). A mistura foi homogeneizada em aparelho Turrax e centrifugada a 10.000 rpm, por dez minutos a temperatura de 4°C. Alíquotas de 500 µL do sobrenadante (preparado com tampão fosfato) ou do plasma foram usadas em tubo de ensaio e acrescentaram-se 500 µL de HCL a 25% (v/v), 45 µL de BHT etanólico 2% (p/v) e 500 µL de TBA 1% (p/v) em NaOH 0,05M. Esta mistura foi homogeneizada em agitador de tubos. Os tubos foram tampados e mantidos em banho-maria fervente por dez minutos. Durante o banho-maria se desenvolveu uma coloração avermelhada.

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

Os resultados foram expressos em µMol de equivalentes de MDA/mg de proteína.

4.2.12.5 Quantificação de proteínas nos tecidos

A determinação do conteúdo de proteínas nos homogenatos dos tecidos cerebral, cardíaco, hepático e plasmático foi realizada segundo o método de Bradford (1985). Alíquotas de 20 µL do homogenato do tecido analisado ou do plasma foram completados para 1 mL com água destilada e adicionadas de 100 µL de reagente de Bradford. A mistura foi agitada, e após dez minutos, foram realizadas as leituras das absorbâncias a um comprimento de onda de 595 nm. O branco foi preparado substituindo a amostra por igual volume de água. Foi feita uma curva padrão de proteína com solução padrão de albumina bovina sérica.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Composição centesimal

Os resultados das determinações da composição centesimal do café *in natura* e café torrado a 140°C/20 min, a 160°C/20 min e a 180°C/10 min são apresentados na **TABELA 2**.

TABELA 2 Composição centesimal do pó de café (*Coffea arabica*, L.) *in natura* e torrado em diferentes condições de tempo e temperatura

Determinações (%)	Café <i>in natura</i>	Café torrado		
		140°C/20 min	160°C/20 min	180°C/10 min
Umidade	7,66 ± 0,04	1,72 ± 0,08	0,94 ± 0,09	1,01 ± 0,14
Lipídios	10,18 ± 0,09	12,29 ± 0,06	13,34 ± 0,10	13,67 ± 0,14
Proteína	16,45 ± 0,02	17,93 ± 0,05	17,97 ± 0,11	18,58 ± 0,10
Resíduo mineral fixo	3,77 ± 0,00	4,22 ± 0,01	4,58 ± 0,01	4,75 ± 0,01
Glicídios por diferença	60,22	63,84	63,17	61,99

Cada valor corresponde a média ± desvio-padrão, n= 3.

De acordo com os dados apresentados na **TABELA 2**, pode-se observar uma intensa diminuição nos teores de umidade das amostras torradas em comparação com o café *in natura*.

Conforme se pode verificar, os grãos de café são compostos majoritariamente por glicídios e também apresentaram quantidades moderadas de lipídios e de proteínas.

6.2 Determinação do perfil de ácidos graxos dos grãos de café

Os resultados da determinação do perfil de ácidos graxos dos grãos de café *in natura* e café torrado a 140°C/20 min, a 160°C/20 min e a 180°C/10 min são apresentados na **TABELA 3**.

Foram identificados treze ácidos graxos, e a porcentagem média apresentada pelas amostras foi de aproximadamente 45% para os saturados, 9% para os monoinsaturados e 46% para os poliinsaturados (**TABELA 3**). As amostras apresentaram teores moderados de lipídios totais (média de 10% no café *in natura*) e de ácidos graxos insaturados (média de 54% entre as amostras).

TABELA 3 Composição de ácidos graxos do óleo de grãos de café (*Coffea arabica*, L.) *in natura* e torrados em diferentes condições de tempo e temperatura

Ácidos Graxos (%)		Café <i>in natura</i>	Café torrado		
			140°C/20 min	160°C/20 min	180°C/10 min
C14:0	Mirístico	0,08 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,00
C16:0	Palmítico	32,74 ± 0,14	32,42 ± 0,30	32,42 ± 0,00	32,2 ± 0,18
C17:0	Margárico	0,10 ± 0,00	0,13 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,14 ± 0,02
C18:0	Estearico	7,93 ± 0,10	7,85 ± 0,11	7,85 ± 0,00	7,94 ± 0,10
C20:0	Araquídico	2,93 ± 0,02	2,83 ± 0,05	2,83 ± 0,00	2,97 ± 0,00
C22:0	Beênico	0,70 ± 0,01	0,67 ± 0,03	0,67 ± 0,00	0,64 ± 0,00
C24:0	Lignocérico	0,22 ± 0,04	0,21 ± 0,03	0,49 ± 0,00	0,6 ± 0,00
Σ Saturados		44,70	44,20	44,51	44,57
C16:1(n-7)	Palmitoléico	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,01
C18:1 (n-9)	Oléico	8,31 ± 0,06	7,66 ± 0,04	7,63 ± 0,00	7,74 ± 0,06
C18:1 (n-7)	Vacênico	0,46 ± 0,00	0,44 ± 0,01	0,44 ± 0,00	0,44 ± 0,00
C20:1(n-9)	Eicosenóico	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,26 ± 0,00
Σ Monoinsaturados		9,07	8,40	8,37	8,47
C18:2 (n-6)	Linoléico	44,33 ± 0,21	44,10 ± 0,51	44,10 ± 0,00	44,27 ± 0,27
C18:3 (n-3)	α-Linolênico	1,37 ± 0,01	1,43 ± 0,02	1,43 ± 0,00	1,40 ± 0,00
Σ Poliinsaturados		45,70	45,53	45,53	45,67
Total		99,47	98,13	98,41	98,71
n.i. = não identificados		0,53	1,87	1,59	1,29
Total		100,00	100,00	100,00	100,00

Cada valor corresponde à média da área do ácido graxo (%) ± desvio-padrão, n= 3.

Em vegetais com teores moderados de lipídios e, principalmente com predomínio de ácidos graxos poliinsaturados, geralmente há correlação positiva entre estas porcentagens e a atividade antioxidante. A presença de compostos antioxidantes é um mecanismo de defesa desenvolvido pelo vegetal, para proteger o seu conteúdo lipídico do processo oxidativo. Esta relação direta entre os teores de lipídios totais e de ácidos graxos insaturados com a atividade antioxidante é

verificada para o café. Ainda que estas informações não tenham sido citadas e correlacionadas em um mesmo trabalho, vários artigos sobre café citam isoladamente a presença de teores moderados de lipídios totais, de teores moderados de ácidos graxos insaturados e a comprovação da atividade antioxidante (NIKOLOVA-DAMYANOVA, VELIKOVA e JHAM, 1998; TURATTI, 2001; IWAI et al., 2004).

De acordo com os resultados mostrados, observa-se que em relação aos ácidos graxos saturados as amostras são compostas majoritariamente pelo ácido palmítico. Os teores de ácido esteárico também se destacam em todas as amostras. Os demais ácidos graxos saturados, exceto o araquídico, foram identificados em quantidades pequenas (< 1%). O ácido oléico se destaca em todas as amostras analisadas por corresponder a 90%, em média, do total de ácidos graxos monoinsaturados. O mesmo se observa para o ácido linoléico em relação aos ácidos graxos poliinsaturados que, dos 46% detectados, 97% são de ácido linoléico.

Os resultados obtidos nesta pesquisa são similares aos encontrados por Turatti (2001) que caracterizou o óleo de café Arábica *in natura* e torrado para aplicação na indústria de cosméticos. Os ácidos graxos encontrados em maior quantidade nesta pesquisa e no trabalho de Turatti (2001) foram respectivamente iguais a 32,74% contra 34,5% de ácido palmítico para o café *in natura* e 32,3% contra 33,7%, em média, deste mesmo ácido graxo para o café torrado. Também foram encontrados 7,93% contra 8,9% de ácido esteárico no café *in natura* e 7,85% contra 9,1% para o café torrado. Para o ácido graxo oléico foram encontrados 8,31% e 10,2% no café *in natura* e 7,66% contra 10,4% no café torrado. A porcentagem de ácido linoléico verificada foi igual a 44,33% e 40,3% no café *in natura* e 44,10% contra 41,0% no café torrado.

Nikolova-Damyanova, Velikova e Jham (1998) analisaram o perfil de ácidos graxos de café Arábica *in natura* cultivado no Brasil encontrando as seguintes porcentagens: 0,1% de mirístico, 38,3% de palmítico, 0,9% de palmitoléico, 9,6% de esteárico, 7,5% de oléico, 37,1% de linoléico, 1,2% de α -linolênico, 3,6% de araquídico, 0,9% de eicosenóico e 0,9% de beênico.

6.3 Conteúdo de fenólicos totais em café

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos nos vegetais incluindo frutos, legumes, grãos, gramíneas, verduras, sementes, ervas, especiarias e algas, podendo ser obtidos a partir de flores, folhas, raízes e cascas. Estes compostos constituem uma das principais classes de antioxidantes naturais (BIRCH et al., 2001; HASSIMOTO, GENOVESE e LAJOLO, 2005).

Assim, determinou-se o teor de compostos fenólicos totais dos diferentes extratos de café obtidos, a fim de correlacionar estes valores com os resultados da atividade antioxidante. Os valores das determinações dos compostos fenólicos totais dos extratos etéreo, etanólico e aquoso de café *in natura* e café torrado em diferentes condições de tempo e temperatura são apresentados na **TABELA 4**.

TABELA 4 Conteúdo de fenólicos totais (mg de fenólicos/g de amostra) dos extratos etéreo, etanólico e aquoso obtidos a partir de grãos de café (*Coffea arabica*, L.) *in natura* e torrados em diferentes condições de tempo e temperatura

Fenólicos totais	Amostras			
	Café <i>in natura</i>		Café torrado	
		140°C/20 min	160°C/20 min	180°C/10 min
Extrato Etéreo	1,90 ^{Bc} ± 0,05	1,70 ^{Ab} ± 0,12	1,60 ^{Ab} ± 0,15	2,00 ^{Cb} ± 0,06
Extrato Etanólico	1,17 ^{Cb} ± 0,01	0,86 ^{Aa} ± 0,04	0,81 ^{Aa} ± 0,05	0,92 ^{Ba} ± 0,04
Extrato Aquoso	0,24 ^{Aa} ± 0,02	2,68 ^{Cc} ± 0,01	2,54 ^{Bc} ± 0,07	2,55 ^{Bc} ± 0,04

^{a,b,c} Média ± desvio-padrão, n= 3, p< 0,05.

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

Letras minúsculas na mesma coluna indicam comparações entre os diferentes extratos da mesma amostra.

Letras maiúsculas, na mesma linha, indicam comparações entre as amostras para o mesmo extrato.

Conteúdo de fenólicos totais expresso como equivalentes de catequina.

De acordo com os dados expressos na **TABELA 4**, para todas as amostras analisadas, observou-se diferença significativa entre os conteúdos de fenólicos totais dos diferentes extratos (p< 0,05). Tal diferença, porém, não foi observada no mesmo extrato em relação à torra. Entre os extratos do café *in natura*, o etéreo apresentou o maior conteúdo de fenólicos totais, ou seja, 1,90 mg/g (p< 0,05). Em relação às demais amostras analisadas, observou-se que os conteúdos de fenólicos mais elevados estão contidos nos extratos aquosos.

Também foi feita a determinação do teor de fenólicos totais das diferentes frações de ácidos fenólicos de café obtidas a fim de correlacionar estes valores aos resultados da atividade antioxidante. Os teores de fenólicos totais das frações de

ácidos fenólicos de grãos de café *in natura* e café torrado em diferentes condições de tempo e temperatura são apresentados na **TABELA 5**.

TABELA 5 Conteúdo de fenólicos totais (mg de fenólicos/g de amostra) das frações de ácidos fenólicos presentes nos grãos de café (*Coffea arabica*, L.) *in natura* e torrados em diferentes condições de tempo e de temperatura

Fenólicos totais	Amostras			
	Café <i>in natura</i>	Café torrado		
		140°C/20 min	160°C/20 min	180°C/10 min
Ácidos fenólicos livres (AFL)	3,73 ± 0,09 ^{Bc}	3,51 ± 0,30 ^{Bc}	4,65 ± 0,18 ^{Cb}	3,11 ± 0,33 ^{Aa}
Ésteres de ácidos fenólicos solúveis (EAFS)	3,55 ± 0,05 ^{Bb}	2,94 ± 0,02 ^{Ab}	4,49 ± 0,09 ^{Cb}	4,65 ± 0,20 ^{Cb}
Ácidos fenólicos insolúveis ligados (AFIL)	2,42 ± 0,00 ^{Ba}	2,74 ± 0,05 ^{Ca}	1,66 ± 0,10 ^{Aa}	2,96 ± 0,01 ^{Da}

^{a,b,c} Média, n= 3, p< 0,05

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

Letras minúsculas na mesma coluna indicam comparações entre as diferentes frações da mesma amostra.

Letras maiúsculas, na mesma linha, indicam comparações entre as amostras para a mesma fração.

Conteúdo de fenólicos totais expresso como equivalente de catequina.

Comparando os teores de fenólicos totais das diferentes frações de ácidos fenólicos analisadas para cada amostra, verificou-se não haver diferença significativa entre os conteúdos de ácidos fenólicos livres (4,65 mg de fenólicos/g de amostra) e de ésteres de ácidos fenólicos solúveis (4,49 mg de fenólicos/g de amostra) do café torrado a 160°C/20 min (p> 0,05). No caso do café torrado a 180°C/10 min, os valores de ácidos fenólicos livres (3,11 mg de fenólicos/g de amostra) e ácidos fenólicos insolúveis ligados (2,96 mg de fenólicos/g de amostra) não diferiram significativamente (p> 0,05). Em relação ao café *in natura* e ao café torrado a 140°C/20 min, todos os valores encontrados para as diferentes frações de ácidos fenólicos analisados diferiram entre si (p< 0,05) (**TABELA 5**).

Com exceção do café torrado a 180°C/10 min, os teores de compostos fenólicos totais das frações de ácidos fenólicos livres, ésteres de ácidos fenólicos solúveis e ácidos fenólicos insolúveis ligados de cada amostra tiveram valores decrescentes entre si (p< 0,05) (**TABELA 5**).

Além da quantificação de fenólicos, também foi determinado o perfil de ácidos fenólicos das frações de café *in natura*, café torrado a 140°C/20 min, café torrado a

160°C/20 min e café torrado a 180°C/10 min por cromatografia gasosa e os resultados estão apresentados na **TABELA 6**.

TABELA 6 Perfil de compostos fenólicos (mg/g de amostra) contidos nas frações de ácidos fenólicos de café (*Coffea arabica*, L.) *in natura* e café torrado em diferentes condições de tempo e temperatura

COMPOSTO	FRAÇÃO											
	AFL				EAFS				AFIL			
	CIN	CT 1	CT 2	CT 3	CIN	CT 1	CT 2	CT 3	CIN	CT 1	CT 2	CT 3
Salicílico	24,54	23,39	24,62	24,79	13,40	14,03	38,38	18,18	9,92	11,77	17,54	12,04
Gentísico	0,05	-	0,03	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
Protocatequínico	0,06	-	-	-	-	4,11	-	3,99	-	-	-	0,21
Quínico	0,05	-	-	-	-	0,53	-	0,62	-	-	-	-
Ferúlico	0,83	-	-	-	0,31	1,09	0,09	1,40	-	-	0,04	0,09
Sinápico	0,09	0,18	0,10	0,15	0,12	0,10	0,19	0,18	0,08	0,10	0,07	0,08
Clorogênico	1,82	0,22	0,11	0,19	-	-	-	-	-	-	-	0,04
Caféico	-	-	0,04	0,02	0,04	16,22	8,06	9,42	-	0,04	0,03	1,35
<i>p</i> -cumárico	-	-	0,02	-	-	0,21	0,16	0,27	-	-	-	-
Cinâmico	-	-	0,02	-	-	-	-	0,12	-	-	-	-
Vanílico	-	-	0,02	-	-	-	-	0,20	-	-	-	-

Média, n= 3.

*CIN = Café *in natura*, CT 1 = Café torrado a 140°C/20 min, CT 2 = Café torrado a 160°C/20 min e CT 3 = Café torrado a 180°C/10 min.

**AFL (ácidos fenólicos livres), EAFS (ésteres de ácidos fenólicos solúveis), AFIL (ácidos fenólicos insolúveis ligados).

6.4 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de café pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico

Segundo Del Castillo, Ames e Gordon (2002), a atividade antioxidante dos grãos de café é influenciada pelo processo de torrefação e reduzida pelo grau de torra elevado. O grau de torra aplicado pode reduzir o conteúdo de ácidos clorogênicos, que, como visto anteriormente são compostos fenólicos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos com comprovada atividade antioxidante.

Inicialmente, foram avaliadas as atividades antioxidantes dos extratos, etéreo, etanólico e aquoso do café *in natura* e do café torrado a 140°C por 10 e 20 min, 160°C por 10 e 20 min e 180°C por 10 e 20 min, a fim de verificar em qual delas a

atividade antioxidante é mais preservada. Para tanto, foi empregado o sistema β -caroteno e ácido linoléico.

As porcentagens de inibição da oxidação dos extratos etéreos, etanólico e aquoso das diferentes amostras empregadas e do antioxidante padrão BHT são apresentadas na **TABELA 7**.

Para dar continuidade ao trabalho, foram selecionadas as amostras de café *in natura* e café torrado a 140°C/20 min, 160°C/20 min e 180°C/10 min. Os critérios de escolha foram o percentual de atividade antioxidante e a aparência (aroma e cor). Os extratos do café torrado a 140°C/10 min, embora tenham apresentado expressivos níveis de atividade antioxidante na maioria dos casos, quando comparados ao antioxidante padrão BHT nas mesmas concentrações, não foram selecionados, pois sua cor e aroma diferiram consideravelmente dos cafés comerciais e provavelmente não seria consumido como infusão.

As condições de torrefação selecionadas para dar continuidade ao trabalho foram repetidas com grãos de café da mesma procedência que aqueles usados na primeira torrefação. A atividade antioxidante dos extratos nas diferentes amostras analisadas apresentou a mesma tendência na primeira e na segunda torra. As amostras da segunda torrefação foram selecionadas para dar continuidade ao trabalho.

TABELA 7 Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos etéreo, etanólico e aquoso de café (*Coffea arabica*, L.) *in natura* e torrado em diferentes condições avaliada pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico

	BHT (ppm)			Amostra (ppm)			Amostra + BHT (ppm)		
	50	100	200	50	100	200	50	100	200
Extrato Etéreo									
Café <i>in natura</i>	86	90	92	25	48	72	83	85	89
Café Torrado 140°C/10 min	74	86	91	66	83	97	80	85	88
Café Torrado 140°C/20 min	75	85	90	39	76	85	63	70	83
Café Torrado 160°C/10 min	80	88	92	63	82	85	77	83	87
Café Torrado 160°C/20 min	79	87	91	44	78	85	74	76	82
Café Torrado 180°C/10 min	73	85	89	28	70	74	68	70	78
Café Torrado 180°C/20 min	81	87	91	32	42	65	71	77	83
Extrato Etanólico									
Café <i>in natura</i>	84	91	93	69	78	86	77	85	89
Café Torrado 140°C/10 min	82	88	92	57	71	77	69	78	85
Café Torrado 140°C/20 min	74	85	92	47	63	94	77	85	86
Café Torrado 160°C/10 min	77	87	91	48	66	75	62	74	79
Café Torrado 160°C/20 min	76	85	91	48	51	57	57	71	79
Café Torrado 180°C/10 min	80	88	93	67	74	80	67	78	85
Café Torrado 180°C/20 min	82	89	94	59	72	78	65	77	83
Extrato Aquoso									
Café <i>in natura</i>	73	82	87	9	24	38	59	76	85
Café Torrado 140°C/10 min	76	86	90	45	70	74	78	85	89
Café Torrado 140°C/20 min	74	82	90	47	77	81	62	81	88
Café Torrado 160°C/10 min	73	84	90	72	79	83	78	89	91
Café Torrado 160°C/20 min	75	85	90	75	80	88	82	89	93
Café Torrado 180°C/10 min	76	86	90	64	80	90	65	85	92
Café Torrado 180°C/20 min	67	78	87	25	53	66	65	76	81

Média, n= 3.

Na **TABELA 8** estão apresentados os valores referentes à atividade antioxidante dos extratos etéreo, etanólico e aquoso do café *in natura* e torrado a 140°C/20 min, 160°C/20 min e 180°C/10 min obtidos a partir da segunda torra.

Verificou-se que alguns extratos das diferentes amostras analisadas apresentaram atividade antioxidante igual ou superior ao antioxidante padrão BHT nas mesmas concentrações.

TABELA 8 Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos etéreo, etanólico e aquoso de café (*Coffea arabica*, L.) *in natura* e torrado em diferentes condições, amostras obtidas a partir da 2ª torra, avaliada pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico

	BHT (ppm)			Amostra (ppm)			Amostra + BHT (ppm)		
	50	100	200	50	100	200	50	100	200
Extrato Etéreo									
Café <i>in natura</i>	86 ^{aB}	90 ^{bB}	92 ^{cB}	25 ^{aA}	48 ^{bA}	72 ^{cA}	83 ^{aB}	85 ^{aB}	89 ^{aB}
Café Torrado 140°C/20 min	69 ^{aB}	81 ^{bB}	90 ^{cB}	33 ^{aA}	70 ^{bA}	80 ^{cA}	69 ^{aB}	73 ^{bA}	80 ^{cA}
Café Torrado 160°C/20 min	69 ^{aB}	81 ^{bB}	90 ^{cB}	43 ^{aA}	88 ^{bC}	90 ^{bB}	72 ^{aC}	75 ^{aA}	78 ^{bA}
Café Torrado 180°C/10 min	70 ^{aC}	82 ^{bB}	89 ^{cB}	31 ^{aA}	64 ^{bA}	68 ^{bA}	61 ^{aB}	67 ^{aA}	74 ^{bA}
Extrato Etanólico									
Café <i>in natura</i>	84 ^{aC}	91 ^{bC}	93 ^{cC}	69 ^{aA}	78 ^{bA}	86 ^{cA}	77 ^{aB}	85 ^{bB}	89 ^{cB}
Café Torrado 140°C/20 min	85 ^{aC}	89 ^{bB}	93 ^{cB}	47 ^{aA}	62 ^{bA}	91 ^{cB}	57 ^{aB}	66 ^{bA}	71 ^{cA}
Café Torrado 160°C/20 min	69 ^{aC}	81 ^{bC}	90 ^{cC}	49 ^{aB}	53 ^{aA}	60 ^{bA}	42 ^{aA}	68 ^{bB}	75 ^{cB}
Café Torrado 180°C/10 min	70 ^{aC}	82 ^{bC}	89 ^{cC}	17 ^{aA}	36 ^{bA}	54 ^{cA}	50 ^{aB}	60 ^{bB}	67 ^{cB}
Extrato Aquoso									
Café <i>in natura</i>	73 ^{aC}	82 ^{bC}	87 ^{cB}	9 ^{aA}	24 ^{bA}	38 ^{cA}	59 ^{aB}	76 ^{bB}	85 ^{cB}
Café Torrado 140°C/20 min	69 ^{aA}	81 ^{bA}	89 ^{cB}	73 ^{aB}	80 ^{bA}	86 ^{cA}	80 ^{aC}	85 ^{bB}	90 ^{cB}
Café Torrado 160°C/20 min	69 ^{aA}	81 ^{bA}	90 ^{cA}	83 ^{aC}	88 ^{bA}	90 ^{bA}	79 ^{aB}	88 ^{bA}	90 ^{bA}
Café Torrado 180°C/10 min	70 ^{aA}	82 ^{bB}	89 ^{cB}	62 ^{aA}	74 ^{bA}	82 ^{cA}	69 ^{aA}	83 ^{bB}	90 ^{cC}

^{a,b,c} Média, n= 3, p< 0,05.

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

Letras minúsculas na mesma linha indicam comparações entre as diferentes concentrações dentro de cada grupo (grupo 1= BHT, grupo 2= amostra e grupo 3= amostra + BHT).

Letras maiúsculas, na mesma coluna, indicam comparações entre as amostras na mesma concentração e para o mesmo extrato.

Os resultados expressos na **TABELA 8** permitem verificar que na maioria das amostras houve diferença estatisticamente significativa entre as porcentagens de atividade antioxidante, nas diferentes concentrações empregadas, para os extratos, para o antioxidante padrão BHT e para a associação BHT + extrato (p< 0,05).

Na maioria dos casos houve aumento não proporcional da atividade antioxidante com o aumento das concentrações empregadas (p< 0,05). Para todas as amostras a diferença foi sempre maior entre as concentrações de 50 e 100 ppm, e em todos os casos pode-se observar boa linearidade entre as concentrações aplicadas e as porcentagens de inibição observadas.

A exceção é feita para a associação BHT + extrato etéreo do café *in natura* cujas porcentagens de atividade antioxidante não diferiram, quando se aplicaram concentrações mais altas (p> 0,05).

Os extratos etéreos de todas as amostras testadas, quando comparados ao BHT nas mesmas concentrações, apresentaram porcentagens de inibição estatisticamente menores ($p < 0,05$). Entretanto, houve sinergismo para o extrato etéreo do café *in natura* em todas as concentrações testadas pois os valores de inibição da oxidação referentes a associação (BHT + extrato) foram estatisticamente maiores do que os valores do extrato isolado ($p < 0,05$) e, não houve diferença estatística entre a associação (BHT + extrato) e o BHT ($p > 0,05$).

Em relação aos extratos aquosos de todas as amostras na concentração de 200 ppm quando comparados tanto com a associação (BHT + extrato) quanto ao BHT também a 200 ppm, apresentaram porcentagens de inibição da oxidação estatisticamente iguais ou maiores caracterizando o efeito sinérgico.

Não foi verificado sinergismo para o extrato etanólico de nenhuma das amostras testadas.

Neste estudo não foi possível identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nos extratos analisados. Assim, não é possível explicar estes resultados atribuindo seus valores ao conteúdo e mecanismos de ação de um determinado composto.

Considerando o extrato aquoso, apenas o café *in natura* apresentou uma porcentagem de inibição da oxidação estatisticamente abaixo das demais amostras (38%) ($p < 0,05$). Estes resultados tiveram uma correlação positiva com o teor de fenólicos totais como pode ser visto na **TABELA 4**, ou seja, o extrato aquoso do café *in natura* apresentou uma menor atividade antioxidante em todas as concentrações empregadas e também apresentou o menor conteúdo de fenólicos totais ($p < 0,05$).

Quando se compara os resultados de fenólicos totais entre os extratos para cada amostra estudada, observa-se que, com exceção do café *in natura*, os extratos aquosos das demais amostras apresentaram concentrações mais altas destes compostos ($p < 0,05$) (**TABELA 4**). Além disto, observa-se que, quando os valores de inibição da oxidação de um mesmo extrato e na mesma concentração são comparados entre as diferentes amostras, novamente, com exceção do café *in natura*, os valores de inibição da oxidação do extrato aquoso das amostras torradas foram maiores do que dos outros extratos analisados. Isto foi observado em todas as concentrações aplicadas e estes resultados também apresentam uma correlação positiva com o teor de fenólicos totais dos extratos aquosos ($p < 0,05$).

Compostos fenólicos estão presentes nos vegetais na forma livre ou esterificados a moléculas de açúcares, proteínas e ao ácido quínico (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992; NARDINI et al., 2002; TSAO e DENG, 2004). Os ácidos hidroxicinâmicos raramente são encontrados na forma livre e geralmente ocorrem ligados a componentes da parede celular mediante ligações do tipo éster ou como glicosídeos. Café e maçã contêm alto conteúdo de ácidos fenólicos ligados, particularmente ácidos clorogênicos enquanto que na forma livre eles não estão presentes no café (NARDINI et al., 2002). Segundo Hassimoto, Genovese e Lajolo (2005), a capacidade antioxidante de compostos fenólicos é influenciada pelo sistema de oxidação, pela concentração e pelo grau de glicosilação. O grau de glicosilação dos compostos fenólicos e o tipo de açúcar afetam significativamente sua capacidade antioxidante (ZHENG e WANG, 2003). Em estudo realizado por Viljanen, Kivikari e Heinonen (2004), foi observado que a antocianina cianidina glicosilada com uma molécula de glicose foi mais eficiente na proteção da oxidação de lactoalbumina do que quando glicosilada com duas ou três moléculas de glicose.

Algumas formas de processamento térmico, pasteurização, fermentação e congelamento favorecem o rompimento destas ligações e liberação dos ácidos fenólicos (NARDINI et al., 2002; LIU, 2004; MANACH et al., 2004). Durante o processo de torra, as condições de tempo e temperatura aplicados podem romper as ligações entre os compostos fenólicos e as moléculas ligadas a eles, conferindo aos compostos resultantes uma estrutura com maior capacidade antioxidante. O menor conteúdo de fenólicos totais do extrato aquoso do café *in natura* e seu potencial antioxidante estatisticamente diferente das amostras torradas podem ser atribuídos à presença de compostos esterificados.

Karakaya e Tas (2001) avaliaram a atividade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais de alimentos comumente consumidos na Turquia. Os pesquisadores verificaram que tanto o café turco (fervido) quanto o café instantâneo tiveram uma correlação positiva entre o conteúdo de fenólicos e a atividade antioxidante ($r^2=0,95$). Tzao et al. (2005) também verificaram uma correlação positiva entre a atividade antioxidante de casca de maçã e o conteúdo de fenólicos. Neste trabalho porém, foi testado um extrato obtido com uma mistura etanol:água (1:1).

Sánchez-González, Jimenez-Escrig e Saura-Calixto (2005) avaliaram a atividade antioxidante de diferentes formas de preparo da bebida de café (expresso, filtrado e italiano) pelos métodos ABTS⁺ e FRAP. As atividades antioxidantes das

diferentes formas de preparo de café observadas foram semelhantes em ambos os métodos testados. Também foi verificada uma alta correlação entre o conteúdo de fenólicos totais e os valores determinados para o método FRAP e ABTS⁺ ($r = 0,98$, $p < 0,01$, $r = 0,99$, $p < 0,01$ respectivamente).

Giada (2005) observou resultados semelhantes pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico e pelo método FRAP empregados na avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de semente de girassol. O sistema β -caroteno e ácido linoléico tem a vantagem de permitir avaliar a cinética de inibição da oxidação.

Sabe-se que o tipo de solvente usado influencia a eficiência da extração de compostos fenólicos da amostra, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, favorecendo ou não a obtenção de extratos mais purificados e com diferentes potenciais de atividade antioxidante (MOURE et al., 2001).

A água é o solvente mais aplicado para isolamento de compostos fenólicos, uma vez que, além de ser um solvente barato e sem efeitos prejudiciais ao organismo animal, tem maior capacidade de extração destes compostos em comparação com outros solventes como éter, etanol, metanol e acetona. A maior eficiência da água em extrair compostos fenólicos é atribuída à sua alta polaridade e conseqüente facilidade em formar pontes de hidrogênio com as hidroxilas dos compostos fenólicos.

O café é rico em ácidos clorogênicos que são compostos fenólicos hidroxilados. O ácido *5-o-cafeoilquínico* está presente no café em alta concentração e é o ácido fenólico predominante no café. Este composto contém em sua estrutura duas hidroxilas uma na posição *meta* e a outra na posição *para* (NARDINI et al., 2002; KILMARTIN e HSU, 2003; FUJIOKA e SHIBAMOTO, 2006; STALMACH et al., 2006). Segundo Moure et al. (2001), a presença de hidroxila nas posições *orto* e *para* conferem uma boa atividade antioxidante ao composto fenólico. A maior atividade antioxidante apresentada pelos extratos aquosos das amostras torradas pode ser atribuída à dupla hidroxilação do composto majoritário do café, sendo uma delas localizada na posição *para*.

Assim, a maior concentração de fenólicos totais dos extratos aquosos e sua elevada atividade antioxidante também podem ser atribuídas à predominância deste composto no café (**FIGURA 7**).

FIGURA 7 Ácido 5-o-cafeoilquínico (KILMARTIM e HSU, 2003).

Com base nos resultados observados neste estudo, verificou-se que a maior polaridade da água em relação ao éter e etanol favoreceu a extração de fenólicos do café indicando ser o solvente mais eficiente para o isolamento de antioxidantes deste fruto. Esta constatação é importante uma vez que o café é diariamente consumido na forma de infusão pela maior parte da população mundial.

Verificou-se que não houve diferença estatística entre a porcentagem de inibição do extrato aquoso de café torrado a 160°C/20 min (90%) e a porcentagem de inibição do extrato etanólico do café torrado a 140°C/20 min (91%) avaliados na concentração de 200 ppm ($p < 0,05$). Verificou-se, outrossim, efeito sinérgico nos extratos aquosos de todas as amostras na concentração de 200 ppm.

Daglia et al. (2000) estudaram a capacidade antioxidante de amostras de café de vários países pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico. As amostras foram submetidas à torrefação em três intensidades: torra clara (100 - 180°C, 19 - 20 min, torra média (100 - 190°C, 19 - 20 min) e torra escura (100 - 210°C, 19 - 20 min). A amostra de café oriunda do Brasil, da espécie Arábica, submetida à torra clara teve uma atividade antioxidante de 82% após 30 min. Em nosso estudo, a amostra torrada a 180°C/10 min e avaliada pelo mesmo método teve uma atividade antioxidante de 82% (200 ppm) após 120 min.

Giada (2005) avaliou a atividade antioxidante dos extratos etanólico e aquoso da semente de girassol pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico utilizando o BHT como padrão positivo. Assim como em nosso estudo o extrato aquoso apresentou atividade antioxidante superior ao extrato etanólico em todas as concentrações testadas.

Com intuito de caracterizar melhor os mecanismos de ação antioxidante dos compostos fenólicos contidos nos diferentes extratos de café obtidos, foram feitas

curvas cinéticas do potencial de inibição da oxidação por estes extratos no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

Nos **GRÁFICOS de 1 a 12** estão apresentadas, respectivamente, as curvas cinéticas da atividade antioxidante dos extratos etéreo, etanólico e aquoso de café *in natura*, café torrado a 140°C/20 min, café torrado a 160°C/20 min e café torrado a 180°C/10 min.

Nos **GRÁFICOS de 1 a 4** estão apresentadas, respectivamente, as curvas cinéticas da atividade antioxidante dos extratos etéreo do café *in natura*, café torrado a 140°C/20 min, café torrado a 160°C/20 min e café torrado a 180°C/10 min. Verifica-se que a associação do extrato de todas as amostras analisadas com o BHT na concentração de 200 ppm foi superior às demais concentrações dos extratos e do BHT empregados isoladamente.

O café *in natura*, em todas as concentrações empregadas, apresentou atividade antioxidante inferior ao BHT empregado em concentrações equivalentes. Entretanto, quando associado ao BHT na proporção de 1:1, houve uma redução no declínio da curva. O decaimento da densidade óptica da associação extrato + BHT na concentração de 50 ppm coincidiu com a do BHT na mesma concentração. Já quando a mistura foi empregada na concentração de 200 ppm, a curva teve uma queda menor do que do BHT a 100 ppm.

Como pode ser observado nos **GRÁFICOS de 1 a 4**, as amostras torradas apresentaram um menor decaimento das curvas em comparação ao café *in natura*. Em todas elas, o extrato isolado ou associado ao BHT nas concentrações de 100 e 200 ppm teve uma queda da curva cinética igual ou menor do que das curvas do BHT nas concentrações de 50, 100 e 200 ppm. Todas as amostras quando associadas ao BHT nas concentrações de 100 e 200 ppm, tiveram atividade antioxidante superior a todas as concentrações do BHT utilizado isoladamente.

Nos **GRÁFICOS de 5 a 8**, estão apresentadas, respectivamente, as curvas cinéticas do potencial antioxidante dos extratos etanólicos do café *in natura* e café torrado a 140°C/20 min, café torrado a 160°C/20 min e café torrado a 180°C/10 min. Entre os extratos das amostras em estudo, observa-se que o café torrado a 180°C/10 min apresentou a maior diminuição da densidade óptica ao longo dos 120 min de análise da atividade antioxidante, visto que suas curvas cinéticas estão abaixo das curvas do BHT. O café *in natura* apresentou a maior atividade antioxidante quer analisado isoladamente quer associado ao BHT, sendo que em

todas as concentrações aplicadas suas atividades foram muito próximas as do BHT. Os extratos etanólicos das amostras torradas apresentaram curvas mais distribuídas no gráfico, registrando atividades antioxidantes menores que o BHT. Quando, porém, misturados ao BHT nas concentrações de 100 e 200 ppm, os extratos tiveram um incremento em suas atividades antioxidantes que fizeram com que a queda das curvas cinéticas se assemelhasse às apresentadas pelo BHT nas mesmas concentrações.

Nos **GRÁFICOS de 9 a 12** estão apresentadas as curvas da atividade antioxidante dos extratos aquosos do café *in natura* e café torrado a 140°C/20 min, café torrado a 160°C/20 min e café torrado a 180°C/10 min. O melhor resultado foi verificado para o café torrado a 160°C/20 min, visto que sua curva se encontra no ponto mais alto do gráfico em relação aos extratos das demais amostras torradas. Todas as amostras, quando associadas ao BHT nas concentrações de 100 e 200 ppm, apresentaram curvas cinéticas com menor declínio que as do BHT em concentrações iguais mostrando a elevação da capacidade protetora dos extratos, quando misturados ao BHT.

GRÁFICO 1 Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo de grãos de café *in natura* no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 2 Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo de grãos de café torrados a 140°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 3 Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo de grãos de café torrados a 160°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 4 Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etéreo de grãos de café torrados a 180°C/10 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 5 Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico de grãos de café *in natura* no sistema β -caroteno e ácido linolético.

GRÁFICO 6 Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico de grãos de café torrados a 140°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linolético.

GRÁFICO 7 Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico de grãos de café torrados a 160°C/20 min no sistema β-caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 8 Curva cinética do potencial antioxidante do extrato etanólico de grãos de café torrados a 180°C/10 min no sistema β-caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 9 Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso de grãos de café *in natura* no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 10 Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso de grãos de café torrados a 140°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 11 Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso de grãos de café torrados a 160°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 12 Curva cinética do potencial antioxidante do extrato aquoso de grãos de café torrados a 180°C/10 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

Utilizando os resultados das curvas cinéticas das atividades antioxidantes dos extratos etéreo, etanólico e aquoso do café *in natura*, café torrado a 140°C/20 min, café torrado a 160°C/20 min e café torrado a 180°C/10 min juntamente com o BHT apresentados nos **GRÁFICOS de 1 a 12** foram calculados os fatores cinéticos F1 e F2 calculados a partir das tangentes das curvas cinéticas (absorbância a 470 nm versus tempo em minutos). O fator F1 (fator de estabilização) foi calculado pela diferença da densidade óptica no intervalo entre os 15 e os 45 minutos da análise da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico. O fator F2 (fator de proteção) foi calculado pela diferença da absorbância observada no período entre os 75 e 105 minutos da análise.

Como visto acima o fator F1 se refere à capacidade do antioxidante em bloquear as reações em cadeia causadas pelos radicais peróxidos. A efetividade do fator F1 está relacionada à capacidade da amostra em atuar como antioxidante primário doando hidrogênio para estabilizar os radicais livres e inibir ou retardar o processo de oxidação.

Já o fator F2 representa a possibilidade do antioxidante em participar de outras reações como da decomposição dos hidroperóxidos. Os valores de F2 indicam o potencial da amostra para atuar como antioxidante secundário, ou seja, atuarem com produtos da oxidação formados em estágios mais avançados do processo oxidativo como peróxidos decompondo-os ou estabilizando-os.

Quanto menores os valores de F1 e F2 maior a eficiência dos antioxidantes da amostra. Os valores de F2 tendem a ser maiores do que os de F1 e valores maiores que um indicam que os antioxidantes contidos na amostra não têm uma atividade antioxidante satisfatória (YANISHLIEVA e MARINOVA, 1995).

O fator F1 pode ser considerado mais importante que F2, uma vez que atua nas etapas iniciais do processo oxidativo evitando alterações estruturais e funcionais de nutrientes e alterações sensoriais dos alimentos, além de evitar danos teciduais ao tecido animal causados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Por consenso, há uma preferência em prevenir problemas a tentar solucioná-los. Além disso, até que o fator F2 estabilize ou degrade os produtos das reações oxidativas, como por exemplo algum radical, esse radical pode já ter causado danos às estruturas celulares que terão de ser reparadas em função desta situação de estresse.

Os valores dos fatores cinéticos F1 e F2 calculados para o BHT e para os extratos etéreo, etanólico e aquoso do café *in natura*, café torrado a 140°C/20 min, café torrado a 160°C/20 min e café torrado a 180°C/10 min estão apresentados na **TABELA 9**.

TABELA 9 Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β -caroteno e ácido linoléico de extratos de café (*Coffea arabica*, L.)

Amostras	50 ppm		100 ppm		200 ppm	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2
BHT	0,13	0,86	0,08	0,64	0,04	0,45
Café in natura						
Extrato Etéreo	0,53	2,32	0,37	1,98	0,18	1,28
Extrato Etanólico	0,13	1,08	0,06	0,75	0,03	0,38
Extrato Aquoso	0,34	0,22	0,19	0,18	0,11	0,13
Extrato Etéreo + BHT	0,10	0,91	0,07	0,70	0,05	0,55
Extrato Etanólico + BHT	0,08	0,63	0,03	0,57	0,02	0,33
Extrato Aquoso + BHT	0,15	0,16	0,05	0,10	0,07	0,08
Café torrado 140°C/20 min						
Extrato Etéreo	0,42	2,67	0,19	2,00	0,05	2,14
Extrato Etanólico	0,23	3,75	0,16	2,60	0,04	0,73
Extrato Aquoso	0,13	1,51	0,07	1,29	0,06	0,17
Extrato Etéreo + BHT	0,16	2,33	0,10	2,10	0,09	0,65
Extrato Etanólico + BHT	0,18	3,42	0,13	2,76	0,09	1,02
Extrato Aquoso + BHT	0,11	1,83	0,08	0,93	0,02	0,95
Café torrado 160°C/20 min						
Extrato Etéreo	0,24	0,9	0,04	1,03	0,03	0,69
Extrato Etanólico	0,23	4,85	0,16	3,64	0,20	3,05
Extrato Aquoso	0,06	1,27	0,04	0,98	0,03	0,66
Extrato Etéreo + BHT	0,07	3,56	0,09	2,38	0,10	2,00
Extrato Etanólico + BHT	0,29	3,82	0,18	2,33	0,15	1,67
Extrato Aquoso + BHT	0,08	2,24	0,04	1,02	0,06	0,37
Café torrado 180°C/10 min						
Extrato Etéreo	0,45	1,52	0,10	0,38	0,19	1,14
Extrato Etanólico	0,45	3,14	0,33	2,72	0,23	2,14
Extrato Aquoso	0,18	3,49	0,12	2,29	0,09	1,44
Extrato Etéreo + BHT	0,25	3,55	0,15	3,62	0,13	1,34
Extrato Etanólico + BHT	0,24	2,19	0,20	1,82	0,16	1,33
Extrato Aquoso + BHT	0,15	2,61	0,08	1,34	0,04	0,46

F1 = fator cinético (fator de estabilização) e F2= fator cinético (fator de proteção)

De acordo com os valores dos fatores cinéticos expressos na **TABELA 9**, observa-se que, para todos os extratos de todas as amostras e em todas as concentrações aplicadas, o fator F1 apresentou valores menores do que 1 indicando que os compostos fenólicos antioxidantes presentes no café atuam graças ao mecanismo primário de doação de elétrons ou de átomos de hidrogênio inibindo ou desacelerando o processo oxidativo. Verifica-se, também que em praticamente todas as determinações, há uma relação inversa entre os valores de F1 e F2 com o aumento das concentrações empregadas, refletindo a estabilidade das amostras ao longo dos 120 minutos da reação do β -caroteno. O processo tornou-se mais eficiente, quando os extratos foram associados ao BHT.

Os menores valores de F1 nas concentrações de 50, 100 e 200 ppm foram observados para o extrato aquoso para as amostras torradas. O extrato aquoso de café torrado a 140°C/20 min e café torrado a 160°C/20 min, em todas as concentrações, e o extrato etéreo destas mesmas amostras na concentração de 200 ppm apresentaram fatores F1 iguais ou menores que o BHT em concentrações equivalentes. Estes resultados se correlacionam positivamente com o maior conteúdo de fenólicos totais para o extrato aquoso destas amostras seguido pelo extrato etéreo e também com as maiores porcentagens de atividade antioxidante de seus extratos na mesma ordem dos fenólicos totais de acordo com as **TABELAS 4 e 8** ($p < 0,05$).

Como citado anteriormente, o ácido *5-o-cafeoilquínico* é o ácido fenólico predominante no café e contém em sua estrutura duas hidroxilas uma na posição *meta* e a outra na posição *para* (KILMARTIN e HSU, 2003). O ácido caféico, também contém em sua estrutura duas hidroxilas uma na posição *meta* e a outra na posição *para* e está presente no café em grandes quantidades. Segundo Moure et al. (2001), a presença de hidroxila nas posições *orto* e *para* conferem uma boa atividade antioxidante ao composto fenólico. A presença de uma dupla hidroxilação nos compostos mais abundantes do café nas posições *orto* e *para* amplia a possibilidade de doação de átomos de hidrogênio para os radicais livres estabilizando-os e interrompendo a reação em cadeia. Após este fenômeno, a oxidação continua sendo retardada pelo deslocamento do elétron desemparelhado no anel fenólico. A ressonância confere maior estabilidade no processo oxidativo (ZHENG e WANG, 2003).

Os melhores resultados para o extrato etanólico isolado foram observados no café *in natura* em todas as concentrações empregadas. Estes valores de F1 foram iguais ou menores aos apresentados pelo BHT nas mesmas concentrações. Entre os três extratos desta amostra o extrato etanólico apresentou o maior potencial de inibição da oxidação e maior estabilidade na curva cinética como pode ser visto na **TABELA 8** e no **GRÁFICO 5** ($p < 0,05$).

Verifica-se que para todas as amostras, nas diferentes concentrações empregadas, a associação com o BHT conferiu uma redução tanto do fator F1 quanto do fator F2, tornando-os, na maioria dos casos, comparáveis aos obtidos com o BHT, caracterizando a ocorrência de sinergismo.

Na etapa de propagação, observou-se que na maioria dos extratos, os valores de F2 foram maiores do que 1, indicando que os antioxidantes do café, presentes nos diferentes extratos estudados, não foram efetivos na degradação e/ou estabilização de compostos formados nas fases avançadas do processo oxidativo (**TABELA 9**).

A associação dos extratos das diferentes amostras com o BHT acentuou a atividade antioxidante e reduziu os valores do fator F2, porém, a maioria deles permaneceu com valores superiores ao do BHT em concentrações correspondentes. A exceção foi feita para o café *in natura*, cujos extratos aquosos em todas as concentrações apresentaram valores de F2 menores do que os valores de F2 para o BHT nas mesmas concentrações. A eficiência dos compostos do café em atuar como antioxidante secundário para os extratos do café *in natura* se acentuou, quando estes foram associados ao BHT na proporção de 1:1 e se caracteriza pela redução nos valores do fator F2 (**TABELA 9**).

Nascimento et al. (2006) estudaram a atividade antioxidante da planta medicinal brasileira *Turnera ulmifolia*, L. popularmente conhecida como “Flor Guarujá” usada na medicina popular como antiinflamatório. A avaliação foi feita utilizando o sistema β -caroteno e ácido linoléico e o α -tocoferol como padrão positivo. A eficiência dos antioxidantes foi avaliada mediante o método das tangentes. O fator F1 indicou que o extrato hidroalcólico do vegetal estudado foi mais eficiente do que o antioxidante padrão, quando testado nas mesmas concentrações evidenciando conter antioxidantes primários eficientes. Na etapa de propagação, analisada pelos valores de F2, verificou-se que o extrato também apresentou atividade antioxidante significativamente superior à do α -tocoferol.

6.5 Avaliação da atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos de café pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico

A atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos foi avaliada pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico utilizando o antioxidante sintético BHT como referência nas mesmas concentrações. Inicialmente, a atividade antioxidante das frações fenólicas foi avaliada nas mesmas concentrações dos extratos (50, 100 e 200 ppm). Entretanto, como o fracionamento usado na obtenção das frações permite a obtenção de uma mistura de fenólicos mais purificada do que os extratos, não foi observada linearidade entre as porcentagens de inibição referentes às concentrações de 50, 100 e 200 ppm devido à saturação do sistema. A partir desses dados, optou-se por empregar concentrações cinco vezes menores como pode ser visto na **TABELA 10**.

As porcentagens de inibição da oxidação das frações de ácidos fenólicos livres, ésteres de ácidos fenólicos solúveis e ácidos fenólicos insolúveis ligados de café *in natura* e torrado, em diferentes condições, avaliados pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico são apresentadas na **TABELA 10**.

De acordo com os valores expressos na **TABELA 10**, observa-se que todas as frações das amostras analisadas apresentaram expressivas porcentagens de inibição da oxidação em comparação com o antioxidante padrão BHT usado nas mesmas concentrações. Os valores relativos à atividade antioxidante de todas as frações fenólicas analisadas para todas as amostras e em todas as concentrações empregadas diferiram significativamente do padrão BHT ($p < 0,05$).

Neste estudo, as amostras e o BHT foram comparados em concentrações que são até dez vezes menores que a concentração máxima usada pela indústria alimentícia (200 ppm) para antioxidantes. Mesmo em concentrações tão baixas as frações fenólicas de café, nas condições aplicadas, tiveram uma porcentagem de inibição da oxidação acentuadamente mais elevada do que o antioxidante de referência evidenciando a eficiência do café no combate à ação dos radicais livres ($p < 0,05$).

Apesar das frações terem sido utilizadas em concentrações baixas, não foi observada uma linearidade para as frações de ácidos fenólicos livres e também para a fração de ácidos fenólicos insolúveis ligados do café *in natura* e café torrado a 140°/20 min.

TABELA 10 Porcentagem de atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos livres, ésteres de ácidos fenólicos solúveis e ácidos fenólicos insolúveis ligados avaliada pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico

	BHT (ppm)			Amostra (ppm)			Amostra + BHT (ppm)		
	10	20	40	10	20	40	10	20	40
Ácidos fenólicos livres									
Café <i>in natura</i>	5 ^{aA}	24 ^{bA}	63 ^{cA}	76 ^{aC}	80 ^{bB}	82 ^{bB}	71 ^{aB}	77 ^{bB}	87 ^{cC}
Café Torrado 140°C/20 min	5 ^{aA}	24 ^{bA}	65 ^{cA}	74 ^{aB}	76 ^{aB}	81 ^{bB}	80 ^{aC}	83 ^{bC}	85 ^{cC}
Café Torrado 160°C/20 min	5 ^{aA}	23 ^{bA}	68 ^{cA}	71 ^{aB}	85 ^{bB}	89 ^{cB}	83 ^{aC}	87 ^{bC}	89 ^{cB}
Café Torrado 180°C/10 min	5 ^{aA}	24 ^{bA}	64 ^{cA}	62 ^{aB}	64 ^{aB}	95 ^{bB}	65 ^{aC}	81 ^{bC}	95 ^{cB}
Ésteres de ácidos fenólicos solúveis									
Café <i>in natura</i>	5 ^{aA}	23 ^{bA}	63 ^{cA}	60 ^{aC}	84 ^{bC}	91 ^{cC}	43 ^{aB}	60 ^{bB}	72 ^{cB}
Café Torrado 140°C/20 min	5 ^{aA}	24 ^{bA}	65 ^{cA}	36 ^{aC}	60 ^{bC}	76 ^{cB}	27 ^{aB}	48 ^{bB}	65 ^{cA}
Café Torrado 160°C/20 min	5 ^{aA}	25 ^{bA}	68 ^{cA}	71 ^{aC}	83 ^{bC}	99 ^{cC}	59 ^{aB}	68 ^{bB}	86 ^{cB}
Café Torrado 180°C/10 min	5 ^{aA}	24 ^{bA}	66 ^{cA}	64 ^{aB}	73 ^{bC}	84 ^{cB}	61 ^{aB}	67 ^{bB}	84 ^{cB}
Ácidos fenólicos insolúveis ligados									
Café <i>in natura</i>	6 ^{aA}	22 ^{bA}	63 ^{cA}	94 ^{aB}	98 ^{bC}	99 ^{bB}	91 ^{aB}	95 ^{bB}	97 ^{bB}
Café Torrado 140°C/20 min	5 ^{aA}	24 ^{bA}	66 ^{cA}	72 ^{aC}	74 ^{aB}	78 ^{bB}	69 ^{aB}	72 ^{bB}	74 ^{bB}
Café Torrado 160°C/20 min	5 ^{aA}	24 ^{bA}	68 ^{cA}	88 ^{aC}	95 ^{bC}	99 ^{cC}	81 ^{aB}	88 ^{bB}	96 ^{cB}
Café Torrado 180°C/10 min	5 ^{aA}	24 ^{bA}	67 ^{cA}	80 ^{aC}	86 ^{bC}	88 ^{cB}	75 ^{aB}	82 ^{bB}	88 ^{cB}

^{a,b,c} Média, n= 3, p< 0,05.

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

Letras minúsculas na mesma linha indicam comparações entre as diferentes concentrações dentro de cada grupo (grupo 1= BHT, grupo 2= amostra e grupo 3= amostra + BHT).

Letras maiúsculas, na mesma coluna, indicam comparações entre as amostras na mesma concentração e para a mesma fração.

De acordo com os resultados apresentados nas **TABELAS 5 e 10**, verificou-se que, embora as frações de ácidos fenólicos livres de todas as amostras tenham apresentado o maior conteúdo de fenólicos totais, elas não apresentaram as maiores porcentagens de atividade antioxidante (p< 0,05). Ainda em relação às frações de ácidos fenólicos livres, na **TABELA 6**, observa-se que esta fração, em todas as amostras, foi a que apresentou os teores de ácido salicílico mais elevados, indicando que este ácido não é o principal fenólico responsável pela atividade antioxidante do café *in natura* e torrado nas condições aplicadas neste estudo.

O ácido salicílico foi o fenólico presente em maior quantidade em todas as frações de todas as amostras. Com exceção dos ésteres de ácidos fenólicos solúveis do café torrado a 160°/20 min, as frações de ésteres de ácidos fenólicos solúveis e ácidos fenólicos insolúveis ligados das demais amostras apresentaram

um conteúdo de ácido salicílico estatisticamente menor que das frações de ácidos fenólicos livres ($p < 0,05$). Entretanto, a porcentagem de inibição da oxidação das frações de ácidos fenólicos insolúveis ligados foi estatisticamente maior que o das frações de ácidos fenólicos livres ($p < 0,05$) (**TABELA 10**).

Isto se deve ao fato de que, embora as frações de ácidos fenólicos livres tenham, em sua maioria, um perfil de ácidos fenólicos diversificado, os compostos estão presentes em pequenas quantidades (**TABELA 6**).

Na **TABELA 10**, constatou-se que a atividade antioxidante mais elevada foi verificada nas frações de ésteres de ácidos fenólicos solúveis e ácidos fenólicos insolúveis ligados do café torrado a 160°/20 min, ambas equivalentes a 99% na concentração de 40 ppm ($p > 0,05$). A fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis do café torrado a 160°/20 min em comparação à mesma fração das demais amostras, apresentou o maior conteúdo de fenólicos totais (4,49 mg/g de amostra) juntamente com o café torrado a 180°/10 min (4,65 mg/g de amostra) ($p < 0,05$) como pode ser visto na **TABELA 5**.

Em relação ao perfil de ácidos fenólicos identificados nessas frações e apresentados na **TABELA 6**, observa-se que a fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis do café torrado a 160°/20 min apresentou um conteúdo de ácido sinápico (0,19 mg/g de amostra) estatisticamente igual à mesma fração do café torrado a 180°/10 min (0,18 mg/g de amostra) e à fração de ácidos fenólicos livres do café torrado a 140°/20 min (0,18 mg/g de amostra) ($p < 0,05$). Verificou-se também na fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis do café torrado a 160°C/20 min quantidades significativas dos ácidos fenólicos ferúlico (0,09 mg/g de amostra), caféico (8,06 mg/g de amostra) e *p*-cumárico (0,16 mg/g de amostra).

Estes compostos, apesar de não estarem presentes de forma majoritária na fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis do café torrado a 160°/20 min, apresentam estruturas que lhes conferem mecanismos eficientes de atividade antioxidante.

Segundo Nenadis, Zhang e Tsimidou (2003), a capacidade antioxidante de um composto está relacionada à sua estrutura tanto no que se refere ao tipo quanto ao número de grupamentos substituintes do anel aromático.

As estruturas químicas de alguns ácidos fenólicos estão representadas na **FIGURA 8** (MANACH et al., 2004).

Ácidos hidrobenzóicos

$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$: Ácido protocatequínico
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Ácido gálico

Ácidos hidroxicinâmicos

$R_1 = OH$: Ácido cumárico
 $R_1 = R_2 = OH$: Ácido caféico
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$: Ácido ferúlico

Ácido clorogênico

FIGURA 8 Estrutura química de ácidos fenólicos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos

A capacidade antioxidante do composto fenólico está diretamente relacionada ao número e a posição das hidroxilas no anel fenólico. Compostos mais hidroxilados têm maior atividade antioxidante graças à maior disponibilidade de hidrogênio ou elétrons por estes grupamentos. Se houver grupamentos hidroxil em posições vizinhas, a capacidade antioxidante é ainda maior. O ácido caféico possui uma atividade antioxidante maior que o ácido ferúlico por ser dihidroxilado e por ter suas hidroxilas em posições sequenciais do anel fenólico. As hidroxilas nas posições *orto* e *para* aumentam a capacidade redutora do composto. Esta característica associada à presença de ligações duplas conjugadas favorece a ressonância tanto no anel fenólico quanto na cadeia lateral. O movimento é maior quando a hidroxila se localiza na posição *para* do que na posição *meta* pois permite a formação de maior número de estruturas canônicas de ressonância (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996; PANNALA et al, 2001; NENADIS, ZHANG e TSIMIDOU, 2003; MARINOVA e YANISHILIEVA, 2003; ZHENG e WANG, 2003; SOOBRATTEE et al.; 2005; YEOMANS, LINSEISEN e WOLFRAM, 2005).

A presença simultânea de vários compostos com características estruturais semelhantes e que lhes conferem uma forte capacidade antioxidante faz com que seu efeito de estabilização de radicais por ressonância e doação de hidrogênio seja ampliado. Estes compostos atuam sinergicamente por mecanismos de ação iguais e complementares caracterizando homo e heterosinergismo.

A presença da hidroxila na posição *para* associada à presença de duplas conjugadas do anel aromático e na cadeia lateral são características contidas nas estruturas tanto do ácido caféico, quanto do ácido ferúlico, do ácido sinápico e *p*-cumárico. Como já foi dito anteriormente, depois do ácido salicílico, estes são os compostos predominantes na fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis do café torrado a 160°C/20 min.

A substituição do anel aromático pelos grupamentos metoxi e hidroxil, que são doadores de elétron favorece a ressonância no anel aromático. Assim, o ácido sinápico tem uma maior capacidade de doação de elétron que o ácido ferúlico, uma vez que além de ter em comum uma hidroxila na posição *para*, ele é bissubstituído por grupamentos metoxi. Esta característica facilita a abstração do hidrogênio e amplia a velocidade de reação pois estende esta propriedade dos substituintes ao anel aromático através das duplas conjugadas que continuam até a cadeia lateral. Além disto, também contribui para estabilizar a formação do radical fenoxi (MILLER e RICE-EVANS, 1997; PANNALA et al, 2001; NENADIS, ZHANG e TSIMIDOU; 2003).

De acordo com os dados expressos nas **TABELAS 5 e 10**, é interessante observar que, apesar do conteúdo de fenólicos totais das frações de ésteres de ácidos fenólicos solúveis (4,49 mg/g) e frações de ácidos fenólicos insolúveis ligados (1,66 mg/g) do café torrado a 160°C/20 min diferirem estatisticamente, elas apresentaram a mesma porcentagem de atividade antioxidante ($p > 0,05$). De acordo com a **TABELA 6**, a fração de ácidos fenólicos insolúveis ligados do café torrado a 160°C/20 min contém um menor conteúdo de ácido salicílico (17,54 mg/g de amostra) e de ácido sinápico (0,07 mg/g de amostra). A igualdade estatística das porcentagens de atividade antioxidante pode estar relacionada ao fato de que o ácido sinápico por ter alta capacidade antioxidante, ter sido capaz de causar o mesmo efeito, mesmo em concentrações bem menores.

Yeh e Yen (2003) avaliaram a capacidade de derivados hidroxibenzóico e hidroxicinâmicos de seqüestrarem radicais livres empregando o método ABTS⁺. Este método avalia a capacidade do composto de atuar como antioxidante primário doando elétrons ou átomos de hidrogênio. Os pesquisadores verificaram que os derivados hidroxicinâmicos foram mais efetivos na estabilização do radical e que a ordem decrescente de estabilização do radical ABTS⁺ foi: ácido ferúlico > *p*-cumárico > sinápico > caféico > clorogênico. A presença do grupamento CH=C-COOH nos

ácidos cinâmicos aumenta sua eficiência em comparação ao grupo COOH dos ácidos benzóicos (MARINOVA e YANISHILIEVA, 2003; SOBRATTEE et al, 2005).

Embora tenham sido enfatizados os resultados das frações do café torrado a 160°C/20 min, é importante ressaltar que, todas as frações de todas as amostras, tiveram uma porcentagem de inibição da oxidação maior do que o padrão BHT nas mesmas concentrações. Quando as frações de todas as amostras foram associadas ao BHT na proporção de 1:1, houve sinergismo para a maioria das amostras na concentração de 40 ppm. Como o BHT isolado nestas concentrações apresentou porcentagens de inibição da oxidação estatisticamente menores, o efeito sinérgico deve ser atribuído principalmente às frações ($p < 0,05$).

Na natureza, os antioxidantes estão distribuídos nos vegetais de forma combinada e podem atuar de forma aditiva ou mesmo sinergicamente contra a oxidação (YEOMANS, LINSEISEN e WOLFRAM, 2005).

O BHT atua como antioxidante primário doando átomos de hidrogênio para estabilizar os radicais livres. Este é o principal mecanismo de ação dos compostos fenólicos presentes no café (derivados hidroxicinâmicos). Assim, verifica-se que o BHT e os fenólicos dos extratos e frações de café avaliados neste estudo atuam simultaneamente pelo mesmo mecanismo de ação caracterizando a ocorrência de um efeito sinergista do tipo homosinergismo. O efeito sinérgico amplia a estabilização de espécies radicalares.

Nos **GRÁFICOS de 13 a 24** estão apresentadas, respectivamente, as curvas cinéticas do potencial antioxidante das frações de ácidos fenólicos livres, ésteres de ácidos fenólicos solúveis e ácidos fenólicos insolúveis ligados de café *in natura* e café torrado a 140°C/20 min, café torrado a 160°C/20 min e café torrado a 180°C/10 min.

GRÁFICO 13 Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos livres de grãos de café *in natura* no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 14 Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos livres de grãos de café torrados a 140°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 15 Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos livres de grãos de café torrados a 160°C/20 min no sistema β-caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 16 Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos livres de grãos de café torrados a 180°C/10 min no sistema β-caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 17 Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis de grãos *in natura* no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 18 Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis de grãos de café torrados a 140°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 19 Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis de grãos de café torrados a 160°C/20 min no sistema β-caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 20 Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis de grãos de café torrados a 180°C/10 min no sistema β-caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 21 Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos insolúveis ligados de grãos *in natura* no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 22 Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos insolúveis ligados de grãos de café torrados a 140°C/20 min no sistema β -caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 23 Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ácidos fenólicos insolúveis ligados de grãos de café torrados a 160°C/10 min no sistema β-caroteno e ácido linoléico.

GRÁFICO 24 Curva cinética do potencial antioxidante da fração de ésteres de ácidos fenólicos insolúveis ligados de grãos de café torrados a 180°C/10 min no sistema β-caroteno e ácido linoléico.

Para todas as frações, amostras e concentrações, verifica-se que as curvas cinéticas das amostras isoladas ou associadas ao BHT se sobrepõem às curvas do BHT isolado ou se posicionam acima delas indicando a ocorrência de sinergismo. O menor decaimento da densidade óptica apresentado pelas frações, isoladas ou associadas ao BHT, ao longo dos 120 min de análise da atividade antioxidante indicam a alta estabilidade das mesmas durante o processo oxidativo.

As elevadas porcentagens de inibição da oxidação apresentadas por estas frações isoladas ou associadas ao BHT em baixas concentrações e o efeito sinérgico observado sugerem o uso do café como substituto, pelo menos parcialmente, ao BHT.

Os valores dos fatores cinéticos F1 e F2 calculados para o BHT e para as frações de ácidos fenólicos do café *in natura*, café torrado a 140°C/20 min, café torrado a 160°C/20 min e café torrado a 180°C/10 min estão apresentados na **TABELA 11**.

A efetividade do fator F1 está relacionada à capacidade da amostra em atuar como antioxidante primário doando hidrogênio, para estabilizar os radicais livres e inibir ou retardar o processo de oxidação.

Conforme os dados apresentados na **TABELA 11** verifica-se que em todas as frações de ácidos fenólicos de todas as amostras, os fatores cinéticos de estabilização (F1) tiveram valores menores do que 1. Observou-se, outrossim, um decréscimo desses valores em função do aumento das concentrações empregadas. Estes resultados evidenciam a alta capacidade de estabilização de radicais livres dos compostos fenólicos contidos no café, mostrando a eficiência dos mesmos em prolongar o período de indução da oxidação. Os fatores cinéticos F1 obtidos para todas as frações correlacionam-se positivamente com as porcentagens de inibição da oxidação verificadas na **TABELA 10**.

Em todas as frações de todas as amostras e em todas as concentrações, observou-se que os valores de F1 foram acentuadamente mais baixos que os apresentados pelo BHT em concentrações equivalentes, evidenciando a alta capacidade de estabilização de radicais livres dos compostos fenólicos do café *in natura* e torrado nas condições adotadas neste estudo.

Quando as frações foram associadas ao BHT em partes iguais, foi verificado efeito sinérgico para todas as frações, amostras e concentrações empregadas.

TABELA 11 Parâmetros cinéticos do potencial antioxidante no sistema β -caroteno e ácido linoléico de frações de ácidos fenólicos de café (*Coffea arabica*, L.)

AMOSTRA	10 ppm	20 ppm	40 ppm	10 ppm	20 ppm	40 ppm
	F1			F2		
BHT	1,08	0,57	0,30	0,93	0,65	0,54
Café in natura						
AFL	0,08	0,07	0,05	0,62	0,35	0,15
EAFS	0,11	0,01	0,01	1,69	0,61	0,14
AFIL	0,02	0,01	0,01	3,11	0,96	0,68
AFL+BHT	0,12	0,08	0,03	0,95	0,53	0,08
EAFS+BHT	0,28	0,18	0,09	1,18	0,66	0,75
AFIL+ BHT	0,04	0,04	0,02	2,50	1,14	0,86
Café torrado 140°C/20 min						
AFL	0,12	0,08	0,08	3,29	3,24	0,08
EAFS	0,31	0,16	0,10	4,92	3,53	2,63
AFIL	0,10	0,10	0,17	2,61	2,00	1,53
AFL + BHT	0,07	0,03	0,05	2,12	1,82	0,24
EAFS + BHT	0,35	0,22	0,14	2,12	1,82	0,43
AFIL + BHT	0,11	0,09	0,10	2,37	1,98	0,71
Café torrado 160°C/20 min						
AFL	0,19	0,09	0,02	2,70	2,04	2,02
EAFS	0,14	0,12	0,05	4,19	2,92	1,36
AFIL	0,05	0,04	0,05	1,36	0,89	0,36
AFL + BHT	0,08	0,06	0,11	1,24	0,93	0,85
EAFS + BHT	0,18	0,17	0,10	5,06	4,31	2,50
AFIL + BHT	0,08	0,05	0,05	1,78	1,18	0,82
Café torrado 180°C/10 min						
AFL	0,45	0,45	0,12	0,81	0,17	0,05
EAFS	0,29	0,23	0,16	0,36	0,31	0,12
AFIL	0,16	0,12	0,10	0,66	0,51	0,30
AFL + BHT	0,16	0,07	0,09	1,18	1,11	0,12
EAFS + BHT	0,53	0,35	0,02	0,42	0,27	0,13
AFIL + BHT	0,18	0,15	0,07	0,60	0,66	0,35

F1 = fator cinético (fator de estabilização) e F2= fator cinético (fator de proteção)

6.6 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de grãos de café pelo método do Rancimat (meio lipídico)

As porcentagens de inibição da oxidação referentes aos extratos de café *in natura* e café torrado em diferentes condições de tempo e temperatura avaliados pelo método Rancimat e comparados ao antioxidante padrão BHT são apresentadas na **TABELA 12**.

TABELA 12 Porcentagem de inibição da oxidação referente ao período de indução (em horas) para o antioxidante sintético BHT e para os extratos de café (*Coffea arabica*, L.) *in natura* e torrado em diferentes condições de tempo e temperatura pelo método Rancimat

AMOSTRA	% INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO	
	100 ppm	200 ppm
Branco	0,00	0,00
BHT	10,89 ± 3,23	14,62 ± 3,29
Café <i>in natura</i>	Etéreo	2,75 ± 0,63 ^{aA}
	Etanólico	21,10 ± 0,65 ^{aB}
	Aquoso	5,64 ± 0,56 ^{aA}
Café torrado 140°C/20 min	Etéreo	10,45 ± 0,94 ^{aB}
	Etanólico	17,18 ± 0,25 ^{aA}
	Aquoso	17,90 ± 0,27 ^{aB}
Café torrado 160°C/20 min	Etéreo	14,03 ± 1,09 ^{aC}
	Etanólico	22,40 ± 0,91 ^{aB}
	Aquoso	20,12 ± 1,00 ^{aB}
Café torrado 180°C/10 min	Etéreo	2,18 ± 0,88 ^{aA}
	Etanólico	20,10 ± 0,83 ^{aA}
	Aquoso	24,49 ± 0,55 ^{aC}

^{a,b,c} Média ± desvio-padrão, n=3, p< 0,05.

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

Letras minúsculas na mesma linha indicam comparações entre as concentrações para um mesmo extrato e para a mesma amostra.

Letras maiúsculas, na mesma coluna, indicam comparações entre as amostras para o mesmo extrato e para a mesma concentração.

De acordo com os resultados apresentados na **TABELA 12** verifica-se que, na concentração de 100 ppm, apenas as porcentagens de inibição da peroxidação dos extratos alcoólicos de todas as amostras e os extratos aquosos das amostras torradas foram estatisticamente maiores que a porcentagem de inibição da oxidação do BHT (p< 0,05).

Na concentração de 200 ppm, todos os extratos do café torrado a 160°/20 min foram mais eficientes que o BHT (10,89%) na inibição da oxidação ($p < 0,05$) (**TABELA 12**). Os teores de fenólicos totais dos extratos do café torrado a 160°C/20 min foram estatisticamente maiores do que os teores dos demais extratos. Apesar disso, as porcentagens de inibição desses extratos não tiveram diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Ainda considerando a **TABELA 12**, em todas as amostras verifica-se que o extrato etanólico apresentou porcentagens de inibição da oxidação estatisticamente iguais ou superiores aos dos outros extratos, apesar do seu menor conteúdo de fenólicos totais conforme descrito na **TABELA 4** ($p < 0,05$).

Ainda de acordo com a **TABELA 12**, observou-se que houve um aumento da porcentagem de inibição da oxidação com o aumento da concentração para a maioria dos extratos analisados. Apenas o extrato etéreo de café *in natura* apresentou porcentagem de inibição da oxidação estatisticamente menor que o BHT ($p < 0,05$).

Chen e Ho (1997) avaliaram a capacidade antioxidante dos ácidos fenólicos caféico, ferúlico, clorogênico através do método Rancimat. A adição destes compostos aumentou significativamente o período de indução da oxidação lipídica. A ordem decrescente de atividade antioxidante foi ácido caféico > α -tocoferol > clorogênico > BHT > ferúlico.

6.7 Avaliação da atividade antioxidante das frações de ácidos fenólicos de grãos de café pelo método do Rancimat (meio lipídico)

As porcentagens de inibição da oxidação para o BHT e para as frações de ácidos fenólicos de café *in natura* e de café torrado em diferentes condições de tempo e temperatura avaliados pelo método Rancimat são apresentadas na **TABELA 13**.

TABELA 13 Porcentagem de inibição da oxidação referente ao período de indução (em horas) para o antioxidante sintético BHT e para as frações de ácidos fenólicos de café (*Coffea arabica*, L.) *in natura* e torrado em diferentes condições de tempo e temperatura pelo método Rancimat

AMOSTRA		% INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO	
		100 ppm	200 ppm
Branco		0,00	0,00
	BHT	8,92 ± 2,11	12,82 ± 3,82
Café <i>in natura</i>	Ácidos fenólicos livres	27,36 ± 1,73 ^{aB}	29,71 ± 1,63 ^{bB}
	Ésteres de ácidos fenólicos solúveis	10,52 ± 1,04 ^{aA}	33,74 ± 1,63 ^{bA}
	Ácidos fenólicos insolúveis ligados	3,93 ± 0,50 ^{aA}	7,90 ± 0,86 ^{bA}
Café torrado 140°C/20 min	Ácidos fenólicos livres	16,22 ± 0,50 ^{aA}	20,45 ± 3,20 ^{bA}
	Ésteres de ácidos fenólicos solúveis	32,95 ± 1,57 ^{aD}	35,52 ± 1,11 ^{aB}
	Ácidos fenólicos insolúveis ligados	35,82 ± 0,35 ^{aD}	50,79 ± 1,10 ^{bD}
Café torrado 160°C/20 min	Ácidos fenólicos livres	25,47 ± 1,51 ^{aB}	33,11 ± 1,57 ^{bB}
	Ésteres de ácidos fenólicos solúveis	30,83 ± 3,48 ^{aC}	34,60 ± 1,98 ^{aA}
	Ácidos fenólicos insolúveis ligados	34,27 ± 0,14 ^{aC}	47,12 ± 0,50 ^{aC}
Café torrado 180°C/10 min	Ácidos fenólicos livres	28,13 ± 0,64 ^{aB}	30,89 ± 0,16 ^{bB}
	Ésteres de ácidos fenólicos solúveis	20,61 ± 1,28 ^{aB}	38,61 ± 0,65 ^{bC}
	Ácidos fenólicos insolúveis ligados	28,77 ± 1,52 ^{aB}	32,54 ± 1,42 ^{bB}

^{a,b,c} Média ± desvio-padrão, n= 3, p< 0,05

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

Letras minúsculas na mesma linha indicam comparações entre as concentrações da mesma fração e da mesma amostra.

Letras maiúsculas, na mesma coluna, indicam comparações entre as amostras para a mesma fração e concentração.

De acordo com os resultados apresentados na **TABELA 13**, verifica-se que, com exceção dos ácidos fenólicos insolúveis ligados do café *in natura* e dos ésteres de ácidos fenólicos solúveis do café *in natura*, as frações de todas as amostras apresentaram porcentagens de inibição acentuadamente maiores que o BHT nas mesmas concentrações (p< 0,05). O melhor resultado foi observado para os ácidos fenólicos insolúveis ligados de café torrado a 140°C/20 min (50,79%) em comparação ao BHT (12,8%) ambos a 200 ppm. Assim como no sistema β-caroteno e ácido linoléico, as frações de ácidos fenólicos apresentaram elevado potencial antioxidante em relação ao antioxidante sintético BHT, sugerindo o uso parcial destas frações na substituição deste composto.

6.8 Análise sensorial

Os resultados referentes à análise sensorial estão apresentados na **TABELA**

TABELA 14 Médias dos níveis de aceitação de bebidas de café (*Coffea arabica*, L.) submetido à torrefação em diferentes condições de tempo e temperatura

Amostras	Nível de aceitação
Café torrado 140°C/20 min	2,9 ^a
Café torrado 160°C/20 min	4,9 ^b
Café torrado 180°C/10 min	5,5 ^b

Média, N= 80, $p < 0,05$

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

Uma vez comprovada a atividade antioxidante das amostras em estudo, seu consumo poderá representar uma forma de contribuir com a diminuição do risco de doenças crônicas não transmissíveis como, por exemplo, doenças cardiovasculares, câncer e diabetes mellitus entre outras. Entretanto, além do possível efeito benéfico à saúde que a bebida preparada com estas amostras de café possa ter, é necessário que ela tenha boa aceitação do ponto de vista sensorial.

Logo, mudanças nas condições de torrefação justificam a avaliação da aceitação do produto. Considerando que em nossa pesquisa o café foi submetido a uma torra mais branda que a do padrão brasileiro (220°C por 12 – 15 min para café Arábica), seu aroma, sua cor e seu sabor podem ter adquirido diferenças que talvez influenciem na aceitação da bebida preparada com estes grãos (MOURA et al., 2003). No entanto, deve-se citar que nossa proposta visa destacar a presença no café de compostos com atividade antioxidante sem promover grandes modificações das características sensoriais. Tendo esses pressupostos, foi feita a avaliação sensorial da bebida preparada a partir de grãos submetidos a diferentes condições de torra visando verificar o grau de aceitação destes produtos.

De acordo com os resultados apresentados na **TABELA 14**, verifica-se uma diferença estatisticamente significativa entre os níveis de aceitação das amostras ($p < 0,05$). Pela comparação das médias, observa-se que o nível de aceitação da amostra torrada a 140°C/20 min (2,9) diferiu da amostra torrada a 160°C/20 min (4,9) e a 180°C/10 min (5,5). Não houve diferença significativa entre os níveis de aceitação para as amostras 160°C/20 min e 180°C/10 min, ($p > 0,05$), e ambas

tiveram menor aceitação por terem uma torra mais branda que a do padrão brasileiro.

6.9 Resultados do ensaio biológico

Durante o experimento não foram observados casos de morte ou de anormalidades entre os animais. Não foram observadas diferenças significativas entre os pesos dos órgãos coletados (fígado, rins, coração, cérebro), indicando que a suplementação diária durante 30 dias do extrato aquoso de café não provocou qualquer alteração aparente tanto no peso quanto nos órgãos dos animais.

6.9.1 Avaliação do coeficiente de eficácia metabólica

O Coeficiente de Eficiência Metabólica (CEM) e a evolução do ganho de peso dos animais estão dispostos na **TABELA 15** e no **GRÁFICO 14** respectivamente.

TABELA 15 Determinação do coeficiente de eficácia metabólica de animais do grupo controle e tratados com extrato aquoso de café (*Coffea arabica*, L.) torrado a 180°C/10 min durante 30 dias

	Controle	4 mg/g PC	2 mg/g PC	1 mg/g PC	0,5 mg/g PC
Peso inicial (g)	59,00 ± 5,30	58,10 ± 7,20	62,40 ± 4,50	62,00 ± 4,40	62,10 ± 5,40
Peso final (g)	252,40 ± 1,20	247,40 ± 0,10	244,20 ± 7,70	251,20 ± 6,00	252,40 ± 11,20
Consumo/dia (g)	17,15 ± 5,38	017,10 ± 4,06	17,37 ± 5,26	17,44 ± 5,83	17,57 ± 6,30
Consumo/mês (g)	514,37 ± 0,08	504,65 ± 1,35	521,05 ± 2,87	523,18 ± 2,61	527,17 ± 49,77
Ganho Peso (g)	193,40 ± 4,80	189,30 ± 1,90	181,80 ± 5,50	189,20 ± 7,00	190,30 ± 11,10
CEM	0,38 ± 0,05	0,33 ± 0,13	0,35 ± 0,04	0,36 ± 0,02	0,36 ± 0,04

Média ± desvio-padrão, n= 8, p< 0,05

O CEM corresponde a razão entre o consumo médio diário de ração e a média do ganho de peso diário dos animais. Como pode ser visto na **TABELA 15** e no **GRÁFICO 14**, não houve diferença significativa entre os valores de CEM dos diferentes grupos, indicando que os tratamentos aplicados não prejudicaram a eficiência metabólica dos animais.

GRÁFICO 25 Evolução do ganho de peso de animais do grupo controle e suplementados com extrato aquoso de café (*Coffea arabica*, L) torrado a 180°C/10 min durante 30 dias.

6.9.2 Avaliação do perfil de ácidos graxos do tecido plasmático

Na **TABELA 16** são apresentados os perfis de ácidos graxos do plasma dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min.

TABELA 16 Perfil de ácidos graxos do plasma dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min durante 30 dias

AG/Animal	Controle	4 mg/g PC	2 mg/g PC	1 mg/g PC	0,5 mg/g PC
C12:0	0,48	0,26	0,28	0,22	0,22
C14:0	1,06	1,23	0,85	0,97	0,97
C16:0	19,48	19,31	18,38	21,40	21,40
C17:0	0,45	0,52	0,46	0,46	0,46
C18:0	8,95	8,92	8,82	7,67	7,67
C20:0	0,26	0,25	0,26	0,21	0,21
C24:0	0,43	0,41	0,29	0,33	0,33
Σ saturados	31,03^a	31,51^a	30,72^a	31,27^a	31,27^a

AG/Animal	Controle	4 mg/g PC	2 mg/g PC	1 mg/g PC	0,5 mg/g PC
C16:1	1,26	0,99	0,80	1,55	1,55
C18:1c	17,18	16,33	17,41	14,45	14,45
C20:1	0,28	0,20	0,27	0,13	0,13
Σ monoinsaturados	18,72^b	17,52^b	18,48^b	16,07^a	16,07^a

AG/Animal	Controle	4 mg/g PC	2 mg/g PC	1 mg/g PC	0,5 mg/g PC
C18:2c	23,79	24,13	23,34	26,50	26,50
C18:3	0,63	0,64	0,83	1,12	1,12
C20:4	17,53	21,85	19,16	20,65	15,65
C20:5	0,49	0,30	0,31	0,68	0,68
C22:5	0,40	0,30	0,26	0,49	0,49
C22:6	1,66	1,63	1,54	1,77	1,77
Σ poliinsaturados	41,31^a	48,85^c	44,50^b	44,50^b	46,21^b
n.d.	8,94	2,12	6,3	8,16	6,45

Média, n = 8, p < 0,05, n.d. = não detectado.

Pelos dados expressos na **TABELA 16**, verifica-se que o total de ácidos graxos poliinsaturados do plasma dos animais tratados com extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min aumentou significativamente em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). A diferença foi o aumento significativo dos percentuais do ácido graxo C20:4 sendo que não houve diferença significativa apenas entre os **GRUPOS 2 mg/g PC e 1 mg/g PC** ($p > 0,05$). Verifica-se que todas as doses administradas foram efetivas na proteção destes ácidos graxos e que o efeito foi dose resposta ($p < 0,05$). Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos nos vegetais com a finalidade de protegê-los dos processos oxidativos. Há um paralelismo entre esta capacidade antioxidante dos referidos compostos e a inibição da oxidação do colesterol e dos

ácidos graxos poliinsaturados, que estão diretamente relacionados à fisiopatologia das doenças cardiovasculares (MANCINI-FILHO, 2006).

6.9.3 Avaliação da atividade antioxidante *in vivo* pelo método de TBARS

O índice de peroxidação lipídica no tecido hepático, cardíaco, cerebral e no plasma dos animais do grupo controle e dos animais tratados com o extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min estão apresentados na **TABELA 17**.

TABELA 17 Peroxidação lipídica (umol MDA/mg de proteína) nos tecidos hepático, cardíaco, cerebral e plasmático dos animais dos grupos controle e experimentais tratados com extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min

	Controle	4 mg/g PC	2 mg/g PC	1 mg/g PC	0,5 mg/g PC
Plasma	0,10 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,01 ^c	0,07 ± 0,01 ^{b**}	0,06 ± 0,01 ^b	0,07 ± 0,01 ^b
Fígado	0,19 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,01 ^c	0,15 ± 0,02 ^b	0,16 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,03 ^a
Cérebro	1,47 ± 0,0 ^a	1,02 ± 0,14 ^b	1,51 ± 0,13 ^a	1,43 ± 0,20 ^a	1,33 ± 0,13 ^a
Coração	1,31 ± 0,10 ^a	0,95 ± 0,09 ^b	0,87 ± 0,08 ^b	0,91 ± 0,05 ^b	0,87 ± 0,04 ^b

Média ± desvio-padrão, n= 8.

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

O excesso de espécies reativas no organismo pode causar alterações estruturais e funcionais a componentes da parede celular, levando à mudança de sua funcionalidade. Estas alterações estão envolvidas na fisiopatologia de várias doenças crônicas não transmissíveis como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, diabetes, vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares entre outras. Antioxidantes da dieta podem contribuir para o combate aos radicais livres e para proteção de componentes celulares como material genético, proteínas e lipídios contidos em membranas (SU et al., 2007).

Os benefícios do consumo regular de café para a saúde são atribuídos à presença de compostos fenólicos do grupo dos ácidos clorogênicos os quais têm comprovada ação antioxidante *in vitro* e *in vivo* (FUJIOKA e SHIBAMOTO, 2006). As altas concentrações de ácido caféico nos grãos de café e suas características estruturais como por exemplo a presença de duas hidroxilas, favorece sua extração

pela água e sua atividade antioxidante (YEOMANS, LINSEISEN e WOLFRAM, 2005; SOOBATTEE et al., 2005; JUNG et al., 2006).

Fujioka e Shibamoto (2006) identificaram ácidos clorogênicos em bebida de café preparada com produto comercial demonstrando a eficiência da água em extrair estes compostos. Estes compostos hidrossolúveis do café são parcialmente absorvidos e conduzidos à corrente sanguínea e a maior parte deles permanece no estômago. Ainda segundo estes autores, os ácidos clorogênicos, principalmente devido à sua capacidade hidrofílica, permanecem estáveis no pH= 2 do estômago sendo posteriormente metabolizados pela flora colônica.

Nardini et al. (2002) avaliaram a absorção de compostos fenólicos do café em humanos. Somente após a hidrólise alcalina da infusão de café foram detectados ácidos fenólicos não esterificados entre eles o ácido ferúlico (142,8 µg/mL) e o *p*-cumárico (14,0 µg/mL) além de alta concentração de ácido caféico (830,0 µg/mL). Amostras de plasma foram coletadas após uma e duas horas da ingestão da bebida. Verificou-se que a administração de café resultou em aumento da concentração plasmática de ácido caféico cujo pico de absorção ocorreu após uma hora. Como o ácido caféico está presente no café somente na forma esterificada, o conteúdo deste composto na forma livre detectada no plasma é proveniente da hidrólise do ácido clorogênico pela flora colônica.

Natella et al. (2002) observaram um aumento da capacidade antioxidante do plasma de humanos após ingestão de 200 mL de café empregando o método TRAP. Este método se baseia na redução da fluorescência de um radical. As amostras plasmáticas tiveram um aumento da atividade antioxidante com um pico de ação de 1,53 mM ROO[•] Equiv após 1 hora em comparação ao valor 1,45 mM ROO[•] Equiv antes da ingestão da bebida.

No presente estudo, verificou-se que o consumo freqüente de café torrado a 180°C/10 min foi efetivo em reduzir a produção de TBARS no plasma. De acordo com os dados expressos na **TABELA 17**, a redução do índice de lipoperoxidação do plasma dos animais do **GRUPO 1** (0,03 µMOL MDA/mg proteína), tratados com a maior dose (4 mg/kg de peso corporal), foi ainda mais acentuada e diferiu estatisticamente em comparação aos demais grupos experimentais (**GRUPO 2**= 0,07 µMOL MDA/mg proteína, **GRUPO 3**= 0,06 µMOL MDA/mg proteína e **GRUPO 4**= 0,07 µMOL MDA/mg proteína) ($p < 0,05$).

Estes dados se correlacionam com os resultados do perfil de ácidos graxos apresentados na **TABELA 16**. O aumento da porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados no plasma e a diminuição significativa dos níveis de TBARS mostram o efeito inibidor da oxidação exercido pelos fenólicos presentes no extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min.

De acordo com os trabalhos de Natella et al. (2002), Nardini et al. (2002) e de Fujioka e Shibamoto (2006) citados anteriormente, os ácidos clorogênicos estão presentes na bebida de café e são capazes de serem absorvidos e exercem sua atividade antioxidante nos tecidos animais. A redução dos níveis de TBARS observadas em todos os tecidos animais em nosso estudo pode ser atribuída à presença destes compostos no extrato aquoso de café administrado aos animais dos grupos experimentais.

Melo et al. (2003) empregaram o método de TBARS para avaliar a atividade antioxidante dos extratos aquoso e etérico de coentro no plasma e fígado de ratos suplementados por um período de trinta e sessenta dias. O extrato aquoso teve uma porcentagem de inibição da oxidação melhor no plasma e o extrato etéreo teve maior atividade no homogenato de fígado. Os níveis de TBARS observados durante o tratamento por sessenta dias foram estatisticamente superiores aos observados em animais tratados por trinta dias. Ainda segundo estes autores, o principal fenólico presente no coentro é o ácido caféico. Devido aos seus mecanismos de ação antioxidante anteriormente citados, parte do efeito de inibição da oxidação nos tecidos animais pode ser atribuída ao seu conteúdo na amostra.

Pelos dados expressos na **TABELA 17** verifica-se que houve diferença estatística entre o índice de lipoperoxidação no tecido hepático. A maior proteção do extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min no tecido hepático foi observada nos animais do **GRUPO 1** (0,13 µMOL MDA/mg de proteína) tratado com a maior dose (4 mg/kg de peso corporal). O **GRUPO 2** (0,15 µMOL MDA/mg de proteína) tratado com a dose de 2 mg/kg de peso corporal apresentou um maior nível hepático de TBARS em relação ao **GRUPO 1** mostrando haver o efeito dose resposta.

Ozercan et al. (2006) avaliaram o efeito antioxidante do café instantâneo (IC) na redução do risco de dano hepático causado pelo efeito agudo de tetracloreto de carbono (CCL₄) em ratos. O café foi adicionado à água que era servida *ad libitum* diariamente numa proporção inicial de 25% (bebida pronta feita com 2 g de pó) até 100% ao final do experimento. Após setenta dias de tratamento, os animais foram

sacrificados e foi feita coleta de plasma e fígado para determinação dos níveis de TBARS. Os níveis de malonaldeído no plasma diferiram significativamente entre os grupos tratado e não tratados na ordem de 3,7 nmol/mL (CCL4) > 2,37 nmol/L (CCL4 + IC) > 1,57 nmol/mL (IC) = 1,49 nmol/mL (C) ($p < 0,05$). Também foi verificada diferença estatística entre os valores de TBARS no tecido hepático na ordem de 110,18 nmol/g de tecido (CCL4) > 98,32 nmol/g de tecido (CCL4 + IC) > 53,56 nmol/g de tecido (IC) = 50,17 nmol/g de tecido (C). Observou-se, igualmente, que o tratamento com café instantâneo aumentou significativamente os níveis de antioxidantes totais no plasma (0,88 mmol/eq.L) do grupo (CCL4 + IC) em relação ao grupo não tratado (CCL4) (0,76 mmol/eq.L) ($p < 0,05$). Estes resultados tiveram correlação positiva com a redução de necrose e inflamação no grupo (CCL4 + IC) em relação ao grupo (CCL4) ($p < 0,05$).

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

Jung et al. (2006) avaliaram a propriedade antioxidante do ácido caféico em camundongos diabéticos. A lipoperoxidação lipídica foi avaliada pela determinação de TBARS no fígado e nos eritrócitos. Os níveis de TBARS verificados no fígado dos animais tratados (2,49 nmol/g de tecido) e dos animais do grupo controle (4,88 nmo/g de tecido) diferiram estatisticamente ($p < 0,01$). As propriedades antioxidantes foram verificadas também entre os valores de TBARS determinados nos eritrócitos dos animais tratados (2,27 nmol/g de tecido) e dos animais do grupo controle (2,68 nmol/g de tecido) ($p < 0,05$).

De acordo com a **TABELA 17**, verifica-se que apenas o índice de peroxidação do tecido cerebral do **GRUPO 1** (1,02 μ MOL MDA/mg de proteína), tratado com a maior dose (4 mg/kg de peso corporal) diferiu estatisticamente em relação ao grupo controle (1,47 μ MOL MDA/mg de proteína).

A atividade antioxidante do extrato aquoso de algas *Bryothamnion triquetrum* foi avaliada pelo método do ácido tiobarbitúrico utilizando cérebro de ratas (NOVOA et

al., 2001). Verificou-se uma concentração inibitória média da lipoperoxidação (IC_{50})= 23,9 μ g/mL de extrato. A atividade antioxidante foi correlacionada com o elevado conteúdo de compostos fenólicos (8,08 mg/g de extrato liofilizado). Foram identificados os ácidos fenólicos *trans*-cinâmico, *p*-cumárico e ferúlico.

Os dados expressos na **TABELA 17** permitem verificar que o tratamento dos ratos com extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min resultou em aumento da inibição da oxidação ($p < 0,05$). O índice de lipoperoxidação no tecido cardíaco dos animais de todos os grupos tratados com o extrato aquoso torrado a 180°C/10 min diferiu estatisticamente do grupo controle. Não foi observado efeito dose resposta do tratamento com o extrato aquoso torrado a 180°C/10 min neste tecido.

Abdel-Wahab et al. (2003) avaliaram a capacidade do ácido *p*-cumárico (PC) de inibir a lipoperoxidação do tecido cardíaco de ratos induzida pelo fármaco doxorubicina (DOX). Após cinco dias de tratamento com uma dose oral de 100 mg/kg de ácido *p*-cumárico, os autores verificaram que o tratamento resultou em uma diminuição significativa do conteúdo de malonaldeído (55,6 mmol/g proteína) do tecido cardíaco dos animais do grupo (PC + DOX) em relação ao grupo (DOX) (86,3 mmol/g proteína) ($p < 0,05$). Os resultados obtidos neste estudo comprovaram a eficiência do ácido *p*-cumárico no combate a lipoperoxidação do tecido cardíaco.

Moreira e Mancini-Filho (2004) testaram uma mistura de especiarias (canela, mostarda e erva-doce) ricas em compostos fenólicos na inibição da lipoperoxidação em cérebro, fígado e plasma de ratos. Foram identificados no chá os ácidos fenólicos catecol, salicílico, ferúlico e caféico. A inibição da lipoperoxidação foi verificada em todos os tecidos de todos os grupos experimentais e diferiu estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$).

Em todos os trabalhos acima citados foi testada a capacidade de inibição da lipoperoxidação em tecidos animais por ácidos clorogênicos ou por extratos que continham estes compostos fenólicos. Assim, como o café é a principal fonte de ácidos clorogênicos, a inibição da lipoperoxidação dos tecidos dos animais verificada neste estudo pode ser atribuída a estes compostos. Além disto, seus mecanismos de ação antioxidante anteriormente citados também justificam os resultados de TBARS observados.

7 Conclusões

Os extratos e as frações de ácidos fenólicos do café *in natura* e das amostras de café torrado, quando comparados ao antioxidante padrão butilidroxitolueno, apresentaram expressiva atividade antioxidante quando avaliadas pelo sistema β -caroteno e ácido linoléico e pelo método do Rancimat.

Foram identificados nessas frações os ácidos fenólicos salicílico, ferúlico, caféico, sinápico, clorogênico, quínico, *p*-cumárico, gentísico, protocatequínico. A elevada atividade antioxidante destas frações é atribuída à presença desses compostos. Destaque-se aqui a superioridade da atividade antioxidante das frações obtidas do café frente ao antioxidante sintético BHT.

Em relação à avaliação sensorial da bebida de café foi observada aceitação somente para as amostras mais torradas, sendo que os níveis de aceitação não diferiram significativamente. Optou-se pela torrefação a 180°C/10 min para a realização do ensaio biológico tendo em vista ser esta a mais próxima da torrefação comercial.

Houve correlação entre os parâmetros *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso do café torrado a 180°C/10 min.

Pelo ganho de peso dos animais tratados com extrato aquoso de café torrado 180°C/10 min, nas diferentes doses administradas, foi verificado que os animais tratados se desenvolveram normalmente em comparação aos animais do grupo controle.

O perfil de ácidos graxos do plasma indicou que o extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min teve um efeito protetor sobre os ácidos graxos poliinsaturados do plasma dos grupos tratados em relação ao controle.

O método de TBARS mostrou-se sensível para a determinação dos níveis de oxidação nos tecidos animais. Os compostos presentes no extrato aquoso de café torrado a 180°C/10 min foram capazes de inibir a oxidação em todos os tecidos

animais analisados. O melhor resultado foi observado para os tecidos plasmático e hepático pois houve efeito dose resposta.

Os dados obtidos permitem indicar que os componentes do café aqui descritos guardam um potencial uso como antioxidantes industriais.

9 REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, M.H.; EL-MAHDY, M.A.; ABD-ELLAH, M.F.; HELAL, G.K.; KHALIFA, F.; HAMDIA, F.M.A Influence of *p*-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. **Pharmacological Research**, v.48, p.461-465, 2003.
- ADAMS, AN, BORRELLI, R.C., FOGLIANO, V., DE KIMPE, N. Thermal degradation studies of food melanoidins., **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4136-4142, 2005.
- ALMEIDA-DORIA, R.F.; REGITANO-D'ARCE, A.B. Antioxidant activity of Rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n.2, p.197-203, 2000.
- AL-OTHTMAN, A.A., AL-SHAGRAWI, R.A., HEWEDI, F.M., HAMDIA, M.M. Plasma total, lipoprotein cholesterol, organs cholesterol and growth performance in rats fed dietary gum Arabic. **Food Chemistry**, v. 62, n.1, p.69-72, 1998.
- AMES, J.M.; WYNNE, A.; HOFMANN, A.; PLOS, S.; GIBSON, G.R. The effect of a model melanoidin mixture on faecal bacterial populations *in vitro*. **British Journal Nutrition**, v.82, n.6, p.489-495, 2003.
- AMSTALDEM, L.C., LEITE, F., MENEZES, H.C. Identificação de voláteis de café através de cromatografia gasosa de alta resolução/espectrometria de massas empregando um amostrador automático de "Headspace". **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.1, p.123-128, 2001.
- ANDERSEN, L.F., JACOBS JR., D.R., CARLSEN, M.H., BLOMHOFF, R. Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardiovascular diseases in the Iowa women's health study, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.83, p.1039-1046, 2006.
- ANDRADE, P.B., LEITÃO, R., SEABRA, R.M., OLIVEIRA, M.B., FERREIRA, M.A. 3,4-dimethoxycinnamic acid levels as a tool for differentiation of *Coffea canephora* var. Robusta and *Coffea Arabica*. **Food Chemistry**, v.61, n.4, p.511-514, 1998.
- ANDREASEN, M.F., LANDBO, A., CHRISTENSEN, L.P., HANSEN, A., MEYER, A.S. Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale*, L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.4090-4096, 2001.
- ARAUJO, F.A.; MANCINI-FILHO, J. Compostos bioativos do café e seus benefícios à saúde. **Higiene Alimentar**, v.20, n.143, p.60-65, 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Notícias ABIC Disponível em <http://www.abic.com.br/exportacao.html> Acesso em 24 out. 2006.

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Exportações ABIC Disponível em <http://www.abic.com.br/noticias/nota/tendencias.html>. Acesso em 24 out. 2006.
- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17 ed., v.II, Capítulo 30, Whashington: AOAC, 2000. p.5.
- AZUMA, K., IPPOUSHI, K., NAKAYAMA, M., ITO, H., HIGASHIO, H., TERAQ, J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p.5496-5500, 2000.
- BALASUBASHINI, M.S.; RUKKUMANI, R.; VISWANATHAN, P.; MENON, V.P. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v.18, p.310-314, 2004.
- BETTERIDGE, D.J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v.49, n.2, Suppl. 1, p. 3-8, 2000.
- BIRCH, A.E.; FENNER, G.P.; WATKINS, R.; BOYD, C.A. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.49, p.4502-4507, 2001.
- BONOMO, P.; CRUZ, C.D.; VIANA, J.M.S.; PEREIRA, A.A.; OLIVEIRA, V.R.; CARNEIRO, P.C.S. Avaliação de progênies obtidas de cruzamentos de descendentes do Híbrido de Timor com as cultivares Catuaí vermelho e Catuaí amarelo. **Bragantia**, v.63, n.2, p.207-219, 2004.
- BORRELLI, R.C., VISCONTI, A., MENNELLA, C., ANESE, M., FOGLIANO, V., Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n. 22, p.6527-6533, 2002.
- BOUAZIZ, M.; GRAYER, R.J.; MONIQUE, S.J.; SIMMONDS, M.D.; SAYADI, S. Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar chemlali growing in Tunisia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.236-241, 2005.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.677-685, 1985.
- BRAUGHLER, J.M., HALL, E.D., Central nervous system trauma and stroke: Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.6, p.289-301, 1989.
- BRENELLI, E.C.S. Extração de cafeína em bebidas estimulantes: uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Química Nova**, v.26, n.1, p.136-138, 2003.

- CAMARGO, M.C.R., TOLEDO, M.C.F. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, p.421-424, 1998.
- CARAMELLI, P.C.; BARBOSA, M.T. Como diagnosticar as quatro causas mais frequentes de demência? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.24, supl.1, p.7-10, 2002.
- CARREGARO, A.B., WOODS, W.E., TOBIN, T., QUEIROZ-NETO, A. Comparison of the quantification of caffeine in human plasma by gas chromatography and ELISA. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v.34, n.6, p.821-824, 2001.
- CHARURIN, P.; AMES, J.M.; DEL CASTILLO, M.D. Antioxidant activity of coffee model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3751-3756, 2002.
- CHEN, J.H., HO, C. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.2374-2378, 1997.
- CINTRA, R.M.G.; MANCINI-FILHO, J. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos *in vitro* e *in vivo*. **Nutrire**, v.22, p.49-62, 2001.
- CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, n.3, p.362-372, 1999.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - COBEA Os princípios éticos da experimentação animal. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. 1991.
- DABROWSKI, K.J.; SOSULSKI, F.W. Quantification of free and hydrolysable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.32, p.123-127, 1984.
- DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; GREGOTTI, C.; BERTE, F.; GAZZANI, G. *In vitro* antioxidant and *ex vivo* protective activities of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1449-1454, 2000.
- DANTAS; M.I.S., MINIM, V.P.R., ROLF PUSCHMANN; R., CARNEIRO; J.D.S., BARBOSA, R.L. Mapa de preferência de couve minimamente processada. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.1, p.101-103, 2004.
- DE ANGELIS, R.C. **Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 317p. 2006.

- DEL CARLO, M.; SACCHETTI, G.; DI MATTIA, C.; COMPAGNONE, D.; MASTROCOLA, D.; LIBERATORE, L.; CICHELLI, A. Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4072-4079, 2004.
- DEL CASTILLO, M.D., AMES, J.M., GORDON, M.H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.3698-3703, 2002.
- DELGADO-ANDRADE, C., RUFIÁN-HENARES, J.A., MORALES, F.J. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.7832-7836, 2005.
- DEVASAGAYAM, TP., KAMAT, JP, MOHAN, H, KESAVAN, P.C. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.13, n.1, p.63-70, 1996.
- DUARTE, S.M.S.; ABREU, C.M.P.; MENEZES, H.C.; SANTOS, M.H.; GOUVÊA, C.M.C.P. Effect of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.2, p.387-393, 2005.
- DUTHIE, S.J.; GARDNER, P.T.; MORRICE, P.C.; WOOD, S.G.; PIRIE, L.; BESTWICK, C.C.; MILNE, L.; DUTHIE, G.G. DNA stability and lipid peroxidation in vitamin E-deficient rats *in vivo* and colon cells *in vitro*: modulation by the dietary anthocyanin, cyanidin-3-glycoside. **European Journal of Nutrition**, v.44, p.195-203, 2005.
- DUVE, K.J.; WHITE, P.J. Extraction and identification of antioxidants in oats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.61, n.6, p.365-370, 1991.
- ENCARNAÇÃO, R.O.; LIMA, D.R. **Café & saúde humana**. Brasília: EMBRAPA Café, 2003. 64p. (Documentos, n.1).
- FAIST, V.; ERBERSDOBLER, H.F. Metabolic transit and *in vivo* effects of melanoidins a precursor compounds deriving from the Maillard reaction. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v.45, p.1-12, 2001.
- FAVARIN, J.L.; VILLELA, A.L.G.; MORAES, M.H.D.; CHAMMA, H.M.C.P.; COSTA, J.D.; DOURADO-NETO, D. Qualidade da bebida de café de frutos cereja submetidos a diferentes manejos pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.2, p.187-192, 2004.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.

- FUJIOKA, K.; SHIBAMOTO, T. Quantitation of volatiles and nonvolatiles acids in an extract from coffee beverages: correlation with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.16, p.6054-6058, 2006.
- FUSTER, M.D., MITCHELL, A.E., OCHI, H., SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.5600-5603, 2000.
- GADELHA, C.A.G.; QUENTAL, C.; FIALHO, B.C. Saúde e inovação: uma abordagem sistêmica das indústrias de saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n.1, p.47-59, 2003.
- GEORGE, K.C., HEBBAR, S.A., KALE, S.P., KESAVAN, P.C. Caffeine protects mice against whole-body lethal dose of γ -irradiation. **Journal of Radiology Protection**, v.19, n.2, p.171-176, 1999.
- GIADA, M.L.R. **Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do cotilédono da semente de girassol (*Helianthus annuus*, L.) rajada**. São Paulo 2005, 206p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- GIADA, M.L.R.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos de alimentos. **Nutrire**, v.28, p.91-107, 2004.
- GÓMEZ, M.E.D.B. **Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta. I. Estabilidade oxidativa**. São Paulo, 2003, 128p. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- GONTHIER, M.; VERNY, M.; BESSON, C.; RÉMÉSY, C.; SCALBERT, A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **Journal of Nutrition**, v.133, p.1853-1859, 2003.
- GUERRERO, G., SUÁREZ, M. Chlorogenic acids as a potential criterion in coffee genotype selections, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.2452-2458, 2001.
- HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, p.475-477, 1973.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, I.S.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.2928-2935, 2005.
- HONJO, S., KONO, S., COLEMAN, M.P., SHINCHI, K., SAKURAI, Y., TODOROKI, I., UMEDA, T., WAKABAYASHI, K., IMANISHI, K., NISHIKAWA, H., OGAWA, S., KATSURADA, M., NAKAGAWA, K., YOSHIKAWA, N. Coffee consumption and serum aminotransferases in middle-aged Japanese men. **Journal of Clinical Epidemiology**, v.54, p.823-829, 2001.

- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.
- HUANG, H.; WANG, B. Antioxidant capacity and lipophilic contents of seaweeds collected from the Qingdao Coastline. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4993-4997, 2004.
- ILLY, E. Um dos prazeres simples da vida é bastante complicado: A saborosa complexidade do café. **Revista Scientific American Brasil**, p.48-53, 2002.
- INOUE, M., YOSHIMI, I., SOBUE, T., TSUGANE, S. Influence of coffee drinking on subsequent risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study in Japan. **Journal of the National Cancer Institute**, v.97, p.293-300, 2005.
- IWAI, K., KISHIMOTO, N., KAKINO, Y., MOCHIDA, K., FUJITA, T. *In vitro* antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4893-4898, 2004.
- JAMES, J. E. **Caffeine and Health**. London: Academic Press, 1991. 432 p.
- JARDINI, F.A. **Avaliação da atividade antioxidante da romã (*Punica granatum*, L.) – participação das frações de ácidos fenólicos no processo de inibição da oxidação**. São Paulo, 2005. 111p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- JELLINGER, K.A. The role of iron in neurodegeneration: prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. **Drugs & Aging**, v.14, n.2, p.115-140, 1999.
- JUNG, U.J.; LEE, M.; PARK, Y.B.; JEON, S.M.; CHOI, M.S. Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.318, n.2, p.476-483, 2006.
- KARAKAYA, S.N.E.; TAS, A.A. Antioxidants activity of some foods containing compounds. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.52, p.501-508, 2001.
- KILMARTIN, P.A.; HSU, C.F. Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry. **Food Chemistry**, v.82, n.2, p.501-512, 2003.
- KROYER, G.T.; KRETSCHMER, L.; WASHUETTL, J. Antioxidant properties of tea and coffee extracts. **Agriculture, Food Chemistry and the Consumer, Proceedings of the European Conference on Food Chemistry, 5th**, n.2, p.433-437, 1989.
- KRYGIER, K., SOLSULSKI, F.W., HOGGE, L. Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. I.Extraction and purification procedure. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.30, p.330-334, 1982.

- KUMAZAWA, K.; MASUDA, H. Effect of pH on the thermal stability of potent roasty odorants, 3-mercapto-3-methylbutyl esters, in coffee drink. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.8032-8035, 2003.
- KWEON, M.; HWANG, H.; SUNG, H. Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from Bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p.4646-4655, 2001.
- LAGO, R.C.A.; ANTONIASSI, R.; FREITAS, S.C. Composição centesimal e de aminoácidos de café verde, torrado e de borra de café solúvel. In: I SIMPÓSIO DE PESQUISAS DOS CAFÉS DO BRASIL, 2, Vitória, 2000. **Anais**. Vitória, 2001. v.1, p.744-747.
- LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v.27, p.969-978, 1988.
- LEE, CHUL Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition on LDL peroxidation. **Clinica Chimica Acta**, v.295, p.141-154, 2000.
- LIN, C.; MUELLER, L.A.; Mc CARTHY, J.; CROUZILLAT, D.; PETIARD, V.; TANKSLEY, S.D. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. **Theoretical and Applied Genetics**, v.112, p.114-130, 2005.
- LIU, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention mechanism of action. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.3479S-3485S, 2004.
- LOPEZ-GARCIA, E.; VAN DAM, R.M.; QI, L.; HU, F.B. Coffee consumption and markers of inflammation and endothelial dysfunction in healthy and diabetic women. **The American Journal of Clinical Nutrition**., v.84, p.888-93, 2006.
- MACHEIX, J.J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit phenolics**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 378p.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.5, p.727-747, 2004.
- MANCINI-FILHO, J. Alimentos funcionais nas doenças cardiovasculares. In: COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. **Alimentos funcionais**. Viçosa: UFV, 2006. p.202.
- MANCINI-FILHO, J.; VAN-KOIJ, A.; MANCINI, D.A.P.; COZZOLINO, F.F.; TORRES, R.P. Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*, *Breyne*) extracts. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v.137, n.11, p.443-447, 1998.
- MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants., **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.45, p.594-598, 1968.

- MARINOVA, E.M., YANISHLIEVA, N.V. Effect of lipid unsaturation on the antioxidative activity of some phenolic acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, p. 427-447, 1994.
- MARINOVA, E.M., YANISHLIEVA, N.V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v.81, p.189-197, 2003.
- MAZZAFERA, P.; SOAVE, D.; ZULLO, M.A.T.; GUERREIRO FILHO, O. Oil content of green beans from some coffee species. **Bragantia**, v.57, n.1, p.45-48, 1998.
- MELO, E.A.; BION, F.M.; MANCINI-FILHO, J.; GUERRA, N.B. *In vivo* antioxidant of aqueous and etheric coriander (*Coriander sativum*, L.) extracts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, p.483-487, 2003.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of American Oil Society**, v.48, p.91, 1971.
- MILLER, N.J., RICE-EVANS, C.A., Cinnamates and hydroxybenzoates in the diet: antioxidant activity assessed using the ABTS^{•+} radical cation, **British Food Journal**, v.99, n.2, p.57-62, 1997.
- MONTEIRO, M.A.M. **Caracterização sensorial da bebida de café (*Coffea arabica*, L.): análise descritiva quantitativa, análise tempo-intensidade e testes afetivos**. Viçosa, 2002. 159p. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Viçosa.
- MORALES, F.; BABBEL, M. Melanoidins exert a weak antiradical activity in watery fluids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.4657-4661, 2002.
- MORALES, F.J. Application of capillary zone electrophoresis to the study of food and food-model melanoidins. **Food Chemistry**, v.76, p.363-369, 2002.
- MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.411-424, 2004.
- MOREIRA, D.P.; MONTEIRO, M.C.; RIBEIRO-ALVES, M.; DONANGELO, C.M.; TRUGO, L.C. Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1399-1402, 2005.
- MOREIRA, R.F.A., TRUGO, L.C., de MARIA, C.A.B., MATOS, A.G.B., SANTOS, S.M., LEITE, J.M.C. Discrimination of Brazilian arabica green coffee samples by chlorogenic acid composition. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.51, n.1, p.95-99, 2001.
- MORGANO, M.A.; PAULUCI, L.F.; MANTOVANI, D.M.B.; MORY, E.E.M. Determinação de minerais em café cru. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.1, p.19-23, 2002.

- MOTA, T.L.N.G. Interação universidade-empresa na sociedade do conhecimento: reflexões e realidade. **Ciência e Informação**, v.28, n.1, 1999. Disponível em (<http://www.scielo.br/scielo.html>). Acesso em 20 out. 2006
- MOURA, S.C.S.R.; VITALI, A.A.; ANJOS, V.D.A.; MORI, E.E.M.; NASCIMENTO, F.H.; SOLER, B. Obtenção de ciclos de torração de cafés brasileiros para guia prático de torrefações nacionais – parte I. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2, Vitória, 2001. **Anais**. Vitória, 2001. p.1560-1567.
- MOURE, A., CRUZ, J.M., FRANCO, D., DOMINGUEZ, J.M. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v.72, p.145-171, 2001.
- NACIF, A.P. **O café e a saúde humana**. Brasília: EMBRAPA Café, Abril, 2003. (Documentos, n.1). [Folheto].
- NARDINI, M.; CIRILLO, E.; NATELLA, F.; MENCARELLI, D.; COMISSO, A.; SCACCINI, C. Analytical, nutritional and clinical methods detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. **Food Chemistry**, v.79, p.119–124, 2002.
- NARDINI, M.; PISU, P.; GENTILI, V.; NATELLA, F.; DIFELICE, M.; PICCOLELLA, E.; SCACCINI, C. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. **Free Radical Biology & Medicine**, v.25, n.9, p.1098-1105, 1998.
- NASCIMENTO, M.A.; SILVA, A.K.; FRANÇA, L.C.B.; QUIGNARD, E.L.J.; LÓPEZ, J.A.; ALMEIDA, M.G. *Turnera ulmifolia*, L. (*Turneraceae*): preliminary study of its antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v.97, p.1387-1391, 2006.
- NATELLA, F.; NARDINI, M.; GIANNETTI, I.; DATTILO, C.; SCACCINI, C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6211-6216, 2002.
- NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p.225-319. (Food science and technology: a series of monographs, textbooks, and reference books, 76).
- NAWROT, P.; JORDAN, S.; EASTWOO, J.; ROTSTEIN, J.; HUGENHOLTZ, A.; FEELEY, M. Effects of caffeine on human health. **Food Additives & Contaminants**, v.20, n.1, p.1-30, 2003.
- NENADIS, N.; ZHANG, H.Y.; TSIMIDOU, M.Z. Structure-antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: effect of Carbon Side Chain Characteristic Groups. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.7, p.1874-1879, 2003.
- NICOLI, M.C., ANESE, M., PARPINEL, M.T. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. **Trends Food Science Technological**, v.10, p.94-110, 1999.

- NICOLI, M.C., ANESE, M., PARPINEL, M.T., FRANCESCHI, S., LERICI, C.R. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. **Cancer Letters**, v.114, p. 71-74, 1997.
- NIKOLOVA-DAMYANOVA, B.; VELIKOVA, R.; JHAM, G.N. Lipid classes, fatty acid composition and triglycerol molecular species in crude coffee beans harvested in Brazil. **Food Research international**, v.21, n.6-7, p.479-486, 1998.
- NOVOA, A.V., MOTIDOME, M., MANCINI-FILHO, J., LINARES, A.F., MIDORI, TANAE, M.M., TORRES, L.M.B., LAPA, A.J. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.GMELIM) HOWE. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n.3, p.373-382, 2001.
- OHNISHI, M.; MORISHITA, H.; IWAHASHI, H.; TODA, S.; SHIRATAKI, Y.; KIMURA, M.; KIDO, R. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and hemolysis. **Phytochemistry**, v.36, n.3, p.579-583, 1994.
- OKAMURA, S.; SUZUKI, K.; YANASE, M.; KOIZUMI, M.; TAMURA, H. The effects of coffee conjugation reactions in human colon carcinoma cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.2, p.271-274, 2005.
- OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **Journal of Nutrition**, v.131, p.66-71, 2001.
- OZERCAN, I.H.; DAGLI, A.F.; USTUNDAG, B.; OZERCAN, M.R.; BAHCECIOGLU, I.H.; ÇELİK, H.; YALNIZ, M.; POYRAZOGLU, O.K.; ATASEVEN, H. Does instant coffee prevent acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCL₄)? **Hepatology Research**, v.35, p.163-168, 2006.
- PANNALA, A.S.; CHAN, T.S.; O'BRIEN, P.J.; RICE-EVANS, C.A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.282, p.1161-1168, 2001.
- PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; DEL RIO, D.; SALVATORE, M.B.; BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oil consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. **Journal of Nutrition**, v.133, p.2812-2819, 2003.
- PÉREZ-GALVÉS, A., MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.A. Degradation, under non-oxygen mediated autooxidation, of carotenoid profile present in paprika oleoresins with lipid substrates of different fatty acid composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.632-637, 2004.
- PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.53, p.4290-4302, 2005.

- PROESTOS, C., CHORIANOPOULOS, N., NYCHAS, G-J, E., KOMAITIS, M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1190-1195, 2005.
- PULLA REDDY, A.C.; LOKESH, B.R. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.111, n.1-2, p.117-124, 1992.
- RABELLO, G.D., FORTE, L.V., GALVÃO, A.C.R. Avaliação da eficiência da combinação paracetamol e cafeína no tratamento da cefaléia tipo tensão. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.58, n.1, p.90-98, 2000.
- RECHNER, A.R.; SPENCER, J.P.E.; KUHNLE, G.; HAHN, U.; RICE-EVANS, C.A. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.30, n.11, p.1213-1222, 2001.
- REPETTO, M.G., Llesuy, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n.5, p.523-534, 2002.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, n.7, p.933-956, 1996.
- ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.2866-2887, 2003.
- ROCHA, E.M.P, FERREIRA, M.A.T. Análise dos indicadores de inovação tecnológica no Brasil: comparação entre um grupo de empresas privatizadas e o grupo geral de empresas. **Ciência e Informação**, v.30, n.2, p. 64-69, 2001.
- SALDAÑA, M.D.A.; MAZZAFERA, P.; MOHAMED, R.S. Extração dos alcalóides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com C supercrítico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.4, p.371-376, 1997.
- SANCHEZ-GONZALEZ, I.; JIMENEZ-ESCRIG, A. SAURA-CALIXTO, F. *In vitro* antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filtered) **Food Chemistry**, v.90, p.133-139, 2005.
- SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.341-347, 1998.
- SANIBAL, E.A.A. **Avaliações Físicas, Químicas e Sensoriais de Óleo e Gordura de Soja no Processo de Fritura de Imersão**. São Paulo, 2001. 100p. Dissertação Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

- SANIBAL, E.A.A.; MANCINI-FILHO, J. Perfil de ácidos graxos trans de óleo e gordura hidrogenada de soja no processo de fritura. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.24, n.1, p.27-31, 2004.
- SANTOS, M.D., ALMEIDA, M.C., LOPES, N.P., SOUZA, G.E.P. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.11, 2236-2240, 2006.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v.130, p.2073S-2085S, 2000.
- SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA. Publicações – Cartilhas Temáticas: café SETEC Disponível em http://portal.mec.gov.br/setec/arquivos/pdf/publica_setec_cafe.pdf Acesso em 02 out. 2006.
- SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants, **Nahrung**. v.44, n.3, p.158-163, 2000.
- SHAHIDI, F., NACKZ, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Boca Ratón: CRC Press, 2004. 558 p.
- SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, J.P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.32, n.1, p.67-103, 1992.
- SILVA, A.F.; MINIM, V.P.; CHAVES, J.B.P.; STRINGHETA, P.C.; RIBEIRO, M.M. Avaliação do gosto amargo da bebida de café (*Coffea arabica*, L.) orgânico por meio da análise tempo-intensidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.3, p.468-472, 2004.
- SILVA, C.R.M.; NAVES, M.M.V. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. **Revista de Nutrição**, v.14, n.2, p.135-142, 2001.
- SILVA, F.A.M., BORGES, M.F., FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v.22, p.94-103, 1999.
- SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M.N. Avaliação da vida-de-prateleira de bebidas lácteas preparadas com “fat replacers” (Litesse e Dairy-lo). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.1, p.24-31, 2002.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.
- SOMOZA, V.; LINDENMEIER, M.; WENZEL, E.; FRANK, O.; ERBERSDOBLER, H.F.; HOFMANN, T. Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using *in vitro* and *in vivo* techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.6861-6869, 2003.

- SOOBRAATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, v.579, p.200-213, 2005.
- SOTERO, D.E.G. **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante de frutos da Amazônia: chopé (*Gustavia augusta*, L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e macambo (*Theobroma bicolor*)**. São Paulo, 2002. 143p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- STALMACH, A.; MULLEN, W.; NAGAI, C.; CROZIER, A. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p.253-262, 2006.
- SU, L.; YIN, J.; CHARLES, D.; ZHOU, K.; MOORE, J.; YU, L. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. **Food Chemistry**, v.100, p.990-997, 2007.
- SWAIN, T., HILLIS, W.E. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.10, p.63-68, 1959.
- TRUGO, L.C., MACRAE, R.A. Study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using H.P.L.C. **Food Chemistry**, v.15, p. 219-227, 1984.
- TSAKNIS, J.; LALAS, S. Extraction and identification of natural antioxidant from *Sideritis euroboea*, L. (Mountain Tea). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.6375-6381, 2005.
- TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.812, n.1-2, p.85–99, 2004.
- TURATTI, J.M. Extração e caracterização de óleo de café. In: II SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2, Vitória, 2001. **Anais**. Vitória, 2001. pág. 1533
- TZAO, R.; YANG, R.; XIE, S.; SOCKOVIE, E.; KHANIZADEH, S.H. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4989-4995, 2005.
- VÁGI, E.; RAPAVI, E.; HADOLIN, M.; VÁZÁRHELYINÉ, P.D.I.; BALÁZS, A.B.; SIMAÁNDI, B. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *origanum majorana*, L. herb and extracts obtained with different solvents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.17-21, 2005.
- VALDENE BRO, M.S.; LÉON-CAMACHO, M.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A.G.; MARTÍN, M.J. Determination of the arabica/robusta composition of roasted coffee according to their stolic content. **Analyst**, v.124, p.999-1002, 1999.

- VAN DAM, R.M.; HU, F.B. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes: A systematic review, **Journal of American Medical Association**, v.294, n.1, p. 97-104, 2005.
- VILJANEN, K.; KIVIKARI, R.; HEINONEN, M. Protein-lipid interactions during liposome oxidation with added anthocyanin and other phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1104-1111, 2004.
- VINSON, J.A.; DABBAGH, Y.A. Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. **Nutrition Research**, v.18, n.6, p.1067-1075, 1998.
- VINSON, J.A.; DABBAGH, Y.A.; SERRY, M.M.; JANG, J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. **Journal and Agriculture and Food Chemistry**, v.43, p.2800-2802, 1995.
- VULCAIN, E.; GOUPY, P.; CARIS-VEYRAT, C.; DANGLES, O. Inhibition of the metmyoglobin-induced peroxidation of linoleic acid by dietary antioxidants: action in the aqueous vs lipid phase. **Free Radical Research**, v.39, n.5, p.547-563, 2005.
- WATTENBERG, L.W.; LAM, L.K.T. Protective effects of coffee constituents on carcinogenesis in experimental animals. **Banbury Report**, n.17, p.137-145, 1984.
- WEI ZHENG, W.; SHIOW, Y.; WANG, S.Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.502-509, 2003.
- WINTERBOURN, C.C.; GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O₂. **Journal of Free Radicals in Biology & Medicine**, v.1, n.1, p.43-49, 1985.
- WOLFFRAM, S.; WEBWE, T.; GRENACHER, B.; SCHARRER, E.A. Na⁺-dependent mechanism is involved in mucosal uptake of cinnamic acid across the jejunal brush border in rats. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1300-1308, 1995.
- YANAGIMOTO, K., KWANG-GEUN, L., OCHI, H., SHIBAMOTO, T. Antioxidant activity of heterocyclic compounds found in coffee volatiles produced by Maillard reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.5480-5484, 2002.
- YANAGIMOTO, K., OCHI, H., LEE, K.G., SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.592-596, 2004.
- YANISHILIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chemistry**, v.54, p.377-382, 1995.

- YEH, C.T., YEN, G.C. Effects of phenolics acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1474-1479, 2003.
- YEOMANS, V.C.; LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G. Interactive effects of polyphenols, tocopherol and ascorbic acid on the Cu²⁺-mediated oxidative modification of human low density lipoproteins. **European Journal of Nutrition**, v.44, p.422-426, 2005.
- ZHAO, Z.; EGASHIRA, Y.; SANADA, H. Phenolic antioxidants richly contained in corn bran are slightly bioavailable in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.5030-5035, 2005.
- ZHENG, W.; WANG, S.Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.502-509, 2003.

ANEXO 1

FIGURA 1. A. Cromatograma de padrões de ácidos fenólicos, padrão interno (C17) e BSA: a) benzóico, b) BSA, c) salicílico, d) cinâmico e) *t*-cinâmico, f) vanílico, g) gentísico, h) *o*-cumárico, i) protocatequínico, j) quínico, l) *p*-cumárico, m) gálico, n) C-17 (heptadecanoato), o) pirogálico, p) ferúlico, q) caféico, r) sinápico, s) clorogênico e t) elágico.

B. Cromatograma característico de fração de ácidos fenólicos livres do café torrado a 160°C/20 min. Os picos a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k foram identificados como BSA, salicílico, cinâmico, vanílico, gentísico, *p*-cumárico, padrão interno (C17), caféico, sinápico, clorogênico e elágico respectivamente, de acordo com o tempo de retenção.

ANEXO 2

FIGURA 1 A. Cromatograma característico de fração de ésteres de ácidos fenólicos solúveis do café torrado a 160°C/20 min. Os picos a, b, c, d, e e f foram identificados como ácido salicílico, ácido *p*-cumárico, padrão interno, ácido ferúlico e ácido caféico e ácido sinápico respectivamente, de acordo com o tempo de retenção.

B. Cromatograma característico de fração de ácidos fenólicos insolúveis ligados do café torrado a 160°C/20 min. Os picos a, b, c, d, e e f foram identificados como BSA, ácido salicílico, padrão interno (C17), ácido ferúlico, ácido caféico, e ácido sinápico respectivamente, de acordo com o tempo de retenção.

ANEXO 3

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 104/2005

São Paulo, 02 de agosto de 2005.

Ilmo(a). Sr(a).
Fabiana Amaral Araújo
Orientador: Prof. Jorge Mancini Filho
FBA

Prezado(a) Senhor(a),

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 1º de agosto de 2005, **APROVOU** o projeto "Avaliação da Atividade Antioxidante dos Compostos do Café (Coffea arábicaL.)" (Protocolo CEP nº 310) apresentado por Vossa Senhoria.

Informamos que este projeto será encaminhado à CONEP, por solicitação via SISNEP (Sistema Nacional de Ética em Pesquisa), sendo necessário aguardar o parecer favorável daquele órgão para iniciá-lo.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dr.ª Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

ANEXO 4

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal - FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Comissão de Ética em Experimentação Animal

*Of. CEEA nº 56/2005***CERTIFICADO**

*Certificamos que o Projeto “Atividade antioxidante dos compostos do café (Coffea arabica, L.)” (Protocolo CEEA nº86), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). **Fabiana Amaral Araújo** e do orientador(a) Jorge Mancini Filho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) desta Faculdade, em 07/11/2005.*

São Paulo, 08 de novembro de 2005.

*Prof.ª Dr.ª Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA*

ANEXO 5

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL**

1. Nome do Participante:.....
Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....Nº:.....Apt
o:.....
Bairro:.....Cidade:.....
.....
CEP:.....Telefone:.....
.....
2. Responsável
Legal:.....
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador,
etc.):.....
Documento de Identidade Nº:.....Sexo: ()M ()F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....Nº:Apto:.....
Bairro:.....Cidade:.....CEP:....
Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: **Avaliação da atividade antioxidante dos compostos do café (*Coffea arabica*, L.)**.....

2. Pesquisador: **Fabiana Amaral Araujo**.....

Cargo/Função: **Doutoranda**.....Inscrição Conselho Regional N°:.....-----

Departamento da FCF/USP: Alimentos e Nutrição Experimental.....

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco (x) Risco Mínimo () Risco Médio ()

Risco Baixo () Risco Maior ()

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo. Nos projetos com coleta de sangue, incluir detalhadamente, como observação as possíveis reações decorrentes desse procedimento.)

4. Duração da Pesquisa: 1 dia.....

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:**1. Justificativa e os objetivos da pesquisa:**

Convidamos você a participar de uma pesquisa sobre a aceitação da bebida de café preparada com grãos da variedade Arábica torrados em diferentes níveis. O consumo da bebida não implicará em nenhum risco à saúde. Os participantes irão provar a bebida e avaliar o sabor da mesma. Para isto, solicitamos, por gentileza, a leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e assinatura do mesmo caso aceite participar. Para quaisquer esclarecimentos, favor entrar em contato com a pesquisadora (Fabiana Amaral Araujo) no Bloco 14 da FCF/USP ou pelo telefone 30913688.

O teste de avaliação sensorial de café será realizado no mês de setembro no Laboratório de Análise Sensorial da FCF/USP – São Paulo/SP. Para realização da pesquisa espera-se a participação de aproximadamente 70 pessoas. Estão sendo convidados a participar pessoas de ambos os sexos, de qualquer idade, que sejam consumidores habituais de café e que não tenham efeitos desagradáveis ao consumir a bebida. O convite é feito para alunos, professores e funcionários da FCF/USP de São Paulo. Na véspera da análise serão afixados cartazes na entrada de cada departamento da FCF divulgando a realização da pesquisa. A análise terá

duração de apenas um dia e será realizada nos horários de 9 às 12 horas e de 13 às 17 horas. Os participantes serão atendidos em cabines individuais onde, inicialmente, eles serão orientados sobre as condições da pesquisa.

Em seguida, serão servidas porções de 50 mL de cada bebida preparada com café torrado em tempos e temperaturas diferentes (amostra A, B e C). As bebidas serão preparadas com água mineral, em filtro de papel e armazenadas em garrafas térmicas. Cada amostra será servida separadamente e de forma casualizada, junto com sachês de açúcar e adoçante para que o café seja adoçado a gosto, um copo de água mineral e a ficha de avaliação da amostra em questão. Após a degustação da primeira amostra, será recolhida a ficha de avaliação e será servida a segunda amostra para que a mesma seja avaliada da mesma forma que a amostra anterior. Uma vez finalizada a degustação da segunda amostra, será servida a terceira amostra. Assim, serão avaliadas as três bebidas de café sendo uma de cada amostra. As degustações serão feitas uma de cada vez e o intervalo entre elas será definido pelo próprio participante da pesquisa.

O objetivo da pesquisa é avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (estudos com ratos) de café (*Coffea arabica*, L.) preparada a partir de grãos submetidos a diferentes condições de torrefação. Uma vez comprovada a atividade antioxidante desta amostra, seu consumo poderá representar uma forma de redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis como por exemplo, doenças cardiovasculares, câncer e diabetes mellitus. Entretanto, além do possível efeito benéfico à saúde que a bebida preparada com estas amostras de café possa ter, é necessário que ela tenha uma boa aceitação do ponto de vista sensorial. O grau de torra (condições de tempo e temperatura empregados) influencia a formação de compostos responsáveis pelo aroma e sabor do café. Logo, mudanças nas condições de torrefação justificam a avaliação sensorial do produto. Considerando que em nossa pesquisa o café foi submetido a uma torra mais branda que a do padrão brasileiro, seu aroma, sua cor e seu sabor podem ter adquirido diferenças que talvez influenciem na aceitação da bebida preparada com estes grãos.

A boa aceitação das bebidas irá favorecer o consumo do café torrado nas condições testadas e isto contribuirá para a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos; incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:

1. Desconfortos e riscos esperados;
2. Benefícios que poderão ser obtidos;
3. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. Da indenização por parte do Patrocinador por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Profº Jorge Mancini Filho

Fabiana Amaral Araujo

e-mail: faraujo@usp.br

Laboratório de Lípides bloco 14 FCF/USP

Telefone: 30913688 celular: (11)93523214

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa

Assinatura do pesquisador ou responsável legal (carimbo ou nome legível)

ANEXO 6**Ficha de aceitação**

Nome: _____

idade: _____

Sexo: () M () F

Você está recebendo uma amostra de café. Marque com um “X” na escala abaixo o lugar (inclusive entre os pontos) que melhor represente o quanto você gostou ou desgostou do café, DE UMA FORMA GERAL.

AMOSTRA Nº. _____

Comente o que você achou
DA COR DO CAFÉ:

—

DO SABOR DO CAFÉ:

ANEXO 7

Artigo publicado

ARTIGOS

COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ E SEUS BENEFÍCIOS À SAÚDE.

Fabiana Amaral Araújo ✉
Jorge Mancini Filho

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental -
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São
Paulo, São Paulo, S.P.

✉ faraujo@usp.br

RESUMO

O café é uma importante fonte de divisas para o Brasil e é bastante apreciado em todo mundo por seu aroma e sabor. Além disto, este produto tem sido foco de diversos trabalhos nos quais se pesquisa a ação de seus compostos sobre a saúde humana, entre elas, a atividade antioxidante. Em estudos "in vitro", "in vivo" e epidemiológicos foi estabelecida uma correlação entre a atividade antioxidante do café e a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis.

Palavras chave: café, antioxidantes, Coffea arabica, compostos bioativos

SUMMARY

Coffea is an important Brazil's business and is too much appreciated all over the world for its flavor. Besides this, the product have been source of many researchs which search about the action of its compounds on humans' health as antioxidant activity. In vitro, in vivo and epidemiological studys was found the

correlation between the antioxidant activity of coffee and the reduction risk of cronic diseases.

Keywords: coffee, antioxidants, *Coffea arabica*, bioactive compounds.

INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo e representa um importante item no comércio internacional (DAGLIA et al., 2000, RECHNER et al., 2001, MORGANO et al., 2002, BORRELLI et al., 2002, KUMAZAWA e MASUDA, 2003). A produção e o processamento do café geram um forte impacto sócio-econômico em função dos mais de 25 milhões de empregos gerados em todo mundo (LIN et al., 2005). O Brasil é um dos maiores exportadores de café e também é um dos maiores consumidores do produto (MORGANO et al., 2002). Segundo a Associação Brasileira das Indús-

trias de Café (2005), as exportações no ano de 2005 somam US\$10,67 milhões entre janeiro e agosto, com um aumento de 123% em relação ao mesmo período de 2004.

O sabor e o aroma de sua bebida conferem grande receptividade a este produto, cujo consumo se tornou um hábito mundial (MOREIRA et al., 2001). Nos últimos anos, foram feitas diversas publicações sobre os efeitos farmacológicos dos compostos do café, o que refletiu em um crescente interesse pelo desenvolvimento de pesquisas sobre este produto (NATELLA et al., 2002, SOMOZA et al., 2003, OKAMURA et al., 2005). O café apresenta em sua composição substâncias como a cafeína, as melanoidinas e os ácidos clorogênicos. Durante a etapa de torrefação há formação das melanoidinas e incorporação de parte dos ácidos clorogênicos em suas moléculas. Estes componentes do café exercem benefícios à saúde humana, sendo que muitos deles são conferidos pela capacidade antioxidante destas substâncias.

Antioxidantes são compostos que quando presentes em pequenas concentrações, quando comparados ao substrato, retardam ou inibem a oxidação do mesmo (DEL CARLO et al., 2004). O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre o sistema antioxidante de defesa e a produção de espécies reativas de oxigênio. Havendo predomínio dessas substâncias no meio elas reagem com proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e, principalmente, com os lipídios causando alterações nos mecanismos de homeostase celular podendo levar à perda de sua funcionalidade (BETTERIDGE, 2000, ALMEIDA-DORIA e REGITANO-D'ARCE, 2000).

Entre as atividades biológicas apresentadas pelos compostos do café são citadas: efeito antioxidante, inibição da biossíntese dos leucotrienos, efeito anticarcinogênico, efeito trófico sobre a microflora in-

ARTIGOS

testinal, ação antiinflamatória, efeito estimulante sobre o sistema nervoso central, relaxamento da musculatura lisa e efeito antidepressivo. Estudos "in vivo" e epidemiológicos, caracterizados pelo consumo de alimentos fonte de antioxidantes e maiores concentrações plasmáticas, apresentaram correlação inversa com a incidência de doenças crônicas não transmissíveis (NICOLI et al., 1997, CINTRA e MANCINI-FILHO, 2001).

O café representa, ao mesmo tempo, a principal fonte de melanoidinas, cafeína e ácidos clorogênicos sendo portanto um dos maiores fornecedores de antioxidantes da dieta habitual em diversos países e também uma fonte promissora de antioxidantes naturais a ser pesquisada para um possível uso industrial.

ASPECTOS GERAIS DOS BENEFÍCIOS À SAÚDE GERADOS PELO CAFÉ

O sabor e o aroma do café são atrativos que justificam e estimulam a grande aceitação e consumo desta bebida. A avaliação da qualidade do café é feita através da análise sensorial e pode ser aprimorada pela adoção de métodos que permitam classificar, de forma prática, objetiva e eficiente, diferentes amostras com base na sua composição química (MOREIRA et al., 2001). Outros argumentos que tomam primordial a identificação dos componentes do café são a sua grande produção mundial associada ao elevado consumo da bebida e à necessidade de se definir valores nutricionais e comerciais.

Várias pesquisas têm sido realizadas para determinar componentes do café e suas respectivas funções na fisiologia vegetal dos grãos, na determinação de características sensoriais e de efeitos associados à saúde humana, bem como o desenvolvimento de produtos a partir destas substâncias. O café é utilizado na produção de

chás, expresso, gourmet, cappuccino, frappuccino, balas, etc. e dele ainda pode se extrair um óleo normalmente utilizado como aditivo na indústria alimentícia e na indústria cosmética assim como obter cafeína para produção de medicamentos e ergogênicos (MORGANO, 2002).

Entre os fatores que podem interferir na composição e qualidade do café estão as espécies e variedades, maturação dos grãos e os processos de torrefação, armazenamento e preparo. A colheita do café é feita por maneiras distintas cujas diferenças, associadas ao tipo de processamento escolhido, irão repercutir na homogeneidade das amostras e características do produto final. A colheita feita manualmente sem seleção configura-se pela obtenção de uma mistura de frutos que diferem entre si quanto ao grau de maturação, cor, densidade e teor de umidade. O segundo modo de colheita é realizado pela seleção individualizada dos grãos. A adoção conjunta deste modo de colheita e do processamento por via úmida (grãos despulpados) contribui para obtenção de uma bebida mais suave do que quando se emprega a colheita por derrida e/ou o processamento por via seca em que o fruto é seco com casca (AMSTALDEM e LEITE., 2001).

Há diversas espécies e variedades de café. As espécies de importância econômica são o *Coffea arabica*, L. e o *Coffea canephora*, L. conhecida como Robusta ou como conillon (CARRERA et al., 1998, MAZZAFERA et al., 1998, MORGANO et al., 2002.). Segundo MAZZAFERA e VITÓRIA (1998), a espécie *Coffea arabica* é considerada economicamente mais importante que a espécie *Coffea canephora*. Os valores de nutrientes presentes no café podem variar em função da variedade considerada (MAZZAFERA e VITÓRIA, 1998,

MORGANO et al., 2002, BONOMO et al., 2004).

Os cafés crus apresentam teores de 8,6 a 12,6% de proteínas, 12,3 a 14,0% de lipídeos e 3,5 a 4,5% de minerais, dependendo da variedade considerada. Como parte da composição mineral do café destacam-se Ca, K, Mg, Na, P, Co, Cr, Cu, Fe Mn, Zn (MORGANO et al., 2002). Além destes nutrientes o café também contém fitoquímicos como polifenóis, ácidos fenólicos, cafeína e melanoidinas. De acordo com SALDAÑA, MAZZAFERA e MOHAMED (1997), a composição de grãos de café cru em porcentagem de base seca para as variedades arábica e robusta corresponde, respectivamente, a 12-18 e 9-13% de lipídeos, 3-4,2,0 e 4-4,5 de minerais, 5,5-8,0 e 7-10% de ácido clorogênico, 6-8% e 5-7% de oligossacarídeos, 50-55% e 37-47% de polissacarídeos, 0,9-1,2% e 1,6-2,4% de cafeína e 1-1,2% e 0,6-0,75% de trigonelina. A composição de alguns compostos não difere entre as variedades consideradas e corresponde a 2% de aminoácidos, 11-13% de proteína e 1,5-2% de ácidos alifáticos.

ÁCIDOS CLOROGÊNICOS

Compostos fenólicos estão distribuídos em praticamente todo o reino vegetal, podendo ser encontrados em diversas partes das plantas em quantidades significativas (ROBBINS, 2003). Estes produtos do metabolismo secundário dos vegetais são classificados em cinco grandes grupos, sendo que quatro destes são flavonóides e o quinto grupo, considerado o principal, representa os ácidos hidroxicinâmicos (OLTHOF et al., 2001, RECHNER, 2001, NARDINI et al., 2002). Os ácidos clorogênicos são os derivados hidroxicinâmicos de maior distribuição nos alimentos (NARDINI et al., 2001, GONTHIER et al., 2003). O grupo dos áci-

ARTIGOS

dos clorogênicos representa um conjunto de compostos fenólicos, de ocorrência natural nos alimentos, formado principalmente pela esterificação do ácido quínico com os ácidos caféico, ferúlico ou pelo ácido p-cumárico (IWAI et al., 2004, NATELLA et al., 2004).

Alguns estudos têm indicado a relação entre a qualidade do café e seu conteúdo em ácido clorogênico, uma vez que este composto apresenta reconhecida importância na formação de pigmentos e do flavor nesse produto (MOREIRA et al., 2001). Os fatores que influenciam o conteúdo de ácido clorogênico do café são a espécie, a variedade, condições de processamento dos grãos. Uma porção de 200 mL de café fresco contém de 50-150 mg de ácido clorogênico (CLIFFORD, 1999). A ingestão diária de ácido clorogênico pelos consumidores de café é estimada em 0,5-1g e menor que 100 mg/d em pessoas que não possuem o hábito de consumir a bebida (OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, 2001, NARDINI et al., 2002). Dependendo do consumo diário de café e de outras fontes de derivados hidroxicinâmicos, a ingestão destes fitoquímicos pode alcançar valores de 500-800 mg dos quais 70% seria proveniente do café (RECHNER et al., 2001).

Considerando o grande consumo diário de café por uma significativa parcela da população, este alimento pode ser considerado um dos principais fornecedores de polifenóis para o organismo.

A estrutura química dos polifenóis determina a taxa de sua absorção e, conseqüentemente, sua biodisponibilidade. Embora os ácidos clorogênicos sejam hidrolisados por ação de enzimas bacterianas estes também podem ser absorvidos na forma intacta (ANDREANSEN et al., 2001, OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, 2001). Pesquisas realizadas por OLTHOF,

HOLLMAN e KATAN (2001), possibilitam verificar a absorção do ácido caféico e ácido clorogênico no intestino delgado. O estudo foi desenvolvido com a participação de indivíduos ileostomizados, sadios, de ambos os sexos, os quais ingeriram, em dias diferentes, doses de ácido caféico e ácido clorogênico. Estas substâncias foram analisadas no fluido intestinal e urina de 24 h e verificou-se uma absorção de 33% do ácido clorogênico e 95% de ácido caféico. Entretanto, apenas traços de ácido clorogênico e 11% de ácido caféico foram excretados na urina indicando seu provável metabolismo pós-absortivo. Assim, a maior fração dos derivados hidroxicinâmicos ingeridos alcançam o cólon, onde irão ser metabolizados assim como irão influenciar a flora microbiana intestinal (OLTHOF et al., 2001). O aproveitamento destes fitoquímicos pelo organismo humano pode ser otimizado pela clivagem do ácido clorogênico pela ação de esterases. Estas enzimas são provenientes da mucosa do intestino grosso e do metabolismo da flora microbiana presente. O ácido caféico, liberado pela clivagem enzimática do ácido clorogênico, e seus metabólitos, produzidos pela flora intestinal são facilmente absorvidos pelo intestino grosso e podem ser metabolizados pelo fígado (SCALBERT e WILLI-ANSON, 2000, OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, OLTHOF et al., 2001).

ANTIOXIDANTES E BENEFÍCIOS À SAÚDE

Nos últimos anos, o enfoque predominante sobre as pesquisas de café se referem a seus benefícios à saúde. O papel protetor de vários compostos antioxidantes do café na prevenção e atenuação de processos patológicos relacionados ao estresse oxidativo tem incentivado o desenvolvimento de

inúmeros estudos laboratoriais e populacionais.

Segundo ZHENG e WANG (2003), os ácidos fenólicos apresentam atividade antioxidante e anticarcinogênica. Estudos "in vitro" com ácido caféico e ácido clorogênico comprovaram a ação antioxidante destes compostos e sua capacidade inibitória sobre a formação de nitrosaminas e desenvolvimento de tumor (ANDREANSEN et al., 2001, OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, 2001). Os ácidos fenólicos são amplamente distribuídos em alimentos vegetais inclusive naqueles que são comumente consumidos. Eles são potenciais agentes protetores contra o desenvolvimento de câncer e doenças cardiovasculares, em parte, devido à sua elevada propriedade antioxidante (MATTILA e KUMPU-LAINEN, 2002).

AZUMA et al. (2000) pesquisaram a composição das folhas de *Corchorus olitoris*, L., um vegetal com intensa capacidade antioxidativa, e verificaram que o ácido clorogênico é o antioxidante mais prevalente. Em estudos anteriores foi relatado que os ácidos clorogênicos inibem a carcinogênese e aumentam a capacidade do sistema de defesa antioxidante "in vivo". O ácido clorogênico exerce efeitos anticarcinogênicos no epitélio do intestino grosso, fígado e língua. Em estudos "in vivo", realizados com ratos e hamsters, o consumo freqüente de alimentos fonte destas substâncias inibiu a carcinogênese no intestino grosso, no fígado e na língua (GONTHIER et al., 2003).

A associação inversa entre o consumo de café e a incidência de câncer no cólon, referida em alguns estudos epidemiológicos, pode ser explicada, em parte, pela presença de ácido clorogênico no café (OLTHOF, HOLLMAN e KATAN, 2001, GONTHIER et al., 2003, OKAMURA et al., 2005, INOUE et al., 2005).

ARTIGOS

A atividade antimutagênica de substâncias inerentes a alguns alimentos é exercida através da capacidade antioxidante, da indução de sistemas enzimáticos envolvidos na detoxificação de xenobióticos e da inativação de carcinógenos (FAIST e HELMUNT, 2001). Ambas as fases do processo de carcinogênese são caracterizadas por um estado oxidativo crônico, especialmente na etapa de promoção. Além disto, a fase de iniciação está associada com dano irreversível no material genético da célula que, muitas vezes, é resultante da ação de radicais livres. Desse modo, os antioxidantes presentes no café poderiam reduzir o risco de câncer, inibindo danos oxidativos no DNA, através da modulação enzimática (SILVA e NAVES, 2001, GONTHIER et al., 2003). Ainda segundo GONTHIER et al. (2003), em diversos estudos epidemiológicos, foi observada uma relação direta entre consumo de café e redução do risco de alguns tipos de câncer, entre eles o carcinoma colonretal. Resultados de outros estudos feitos com animais evidenciaram e reafirmaram o efeito anticarcinogênico do café e sua ação estimuladora sobre enzimas hepáticas (citocromo P450 1A2, UDP-glucuronosil transferases e glutathione S-transferases) que atuam na detoxificação durante a carcinogênese.

Em um estudo populacional realizado no Japão por INOUE et al. (2005), verificou-se uma associação entre o hábito de beber café e a redução do risco de câncer hepático. A redução do risco foi medida pela taxa de risco (HR = Hazard Ratio). Indivíduos que consumiam café diariamente tiveram uma redução do risco de carcinoma hepático em relação aos que raramente ingeriam a bebida (HR = 0.49). Verificou-se uma redução do risco com o aumento no consumo de café. Comparados aos indi-

víduos que nunca ingeriam café, aqueles que consumiam de 1-2 xícaras/dia tiveram uma redução do risco de HR = 0.52. Para os indivíduos que consumiam de 3-4 xícaras/dia, foi observada uma taxa de risco de HR = 0.48 e para aqueles que ingeriam pelo menos 5 xícaras/dia foi observada uma redução do risco de HR = 0.24. A pesquisa teve duração de dez anos e neste período foi registrado que o risco de câncer hepático no grupo que ingeria café raramente foi de 547,2 casos/10.000 pessoas mas foi de apenas 214,6 casos/10.000 pessoas para o grupo que ingeria café diariamente.

Os potenciais efeitos salutares dos ácidos hidroxicinâmicos e de seus derivados estão relacionados à sua capacidade antioxidante. Diversos estudos científicos registram a habilidade destes compostos em evitar a oxidação da lipoproteína LDL e reduzir aterogênese. Segundo ANDREANSEN et al. (2001), a capacidade de inibir a oxidação da LDL humana pelos ácidos hidroxicinâmicos em ordem decrescente foi a seguinte: ácido caféico > ácido sináptico > ácido ferúlico > ácido p-cumárico.

A ação antioxidante do ácido caféico e ácido clorogênico foi testada no modelo de oxidação de LDL in vitro. Os autores observaram elevado poder antioxidante neste sistema com resultados semelhantes aos apresentados nos mesmos testes aplicados para as vitaminas E, C e β -caroteno (LARANJINHA, ALMEIDA e MADEIRA, 1994, Vinson et al., 1995, LARANJINHA et al., 1996, VINSON e DABBAGH, 1998).

A atividade antioxidante de ácidos fenólicos foi testada no controle da oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade) humana induzida pelo cobre. O ácido caféico na concentração de 5 μ M e o ácido sináptico na concentração de 10 μ M inibiram a oxidação da LDL,

a formação de hidroperóxidos e o aumento da carga negativa da apoproteína. Os ácidos ferúlico, gálico e p-hidroxicinâmico foram inefetivos na prevenção da oxidação da LDL (CHALAS et al., 2001). Segundo GONTHIER et al. (2003), o café aumenta a resistência da LDL a lipoperoxidação.

Segundo BORRELLI et al. (2002), vários estudos sugerem que o potencial efeito antioxidante e habilidade de quelar metais das bebidas preparadas à base de café são conferidos pela presença de melanoidinas.

ARAÚJO e MANCINI-FILHO (2004), avaliaram a atividade antioxidante do extrato aquoso de grãos de café (*Coffea arabica*, L.) torrados a 140°C/20min, 160°C/20min e 180°C/10min. O modelo utilizado na avaliação da atividade antioxidante foi o do betacaroteno associado ao ácido linoléico utilizando-se medidas espectrofotométricas a cada 15 minutos durante 120 minutos. Todas as amostras apresentaram um percentual de inibição da oxidação próximo ao do butil hidroxi tolueno (BHT), antioxidante sintético normalmente utilizado em alimentos industrializados. O café torrado a 160°C/20min apresentou o maior percentual de inibição da oxidação que foi de 83% comparado ao BHT na concentração de 200ppm.

Os ácidos hidroxicinâmicos como o ácido caféico, o ácido ferúlico, o ácido sináptico e o ácido p-cumárico estão amplamente distribuídos entre os vegetais. Os ácidos fenólicos mais abundantes nos alimentos de consumo humano são os ácidos clorogênicos. O café, uma das bebidas mais consumidas no mundo, contém grande quantidade de ácidos clorogênicos. Estes compostos bioativos têm comprovada atividade antioxidante a qual foi comprovada, em estudos "in vitro", através de sua capacidade de capturar radicais livres

ARTIGOS

gerados em fase aquosa e pelo aumento da resistência da LDL à peroxidação e inibição do dano oxidativo ao DNA.

A cafeína, que é o principal constituinte do café, apresenta atividade antioxidante. Pesquisadores testaram este efeito na prevenção do dano oxidativo em microsomas de fígado de ratos. A lesão oxidativa foi induzida pelos radicais hidroxil ($\cdot\text{OH}$), peróxil ($\text{ROO}\cdot$) e oxigênio singlete (O_2). A substância testada apresentou efetiva inibição sobre a peroxidação lipídica, em concentrações milimolares, contra as três espécies reativas do metabolismo de oxigênio (ERO's). A ordem decrescente da atividade inibitória foi igual a: $\text{OH}\cdot > \text{O}_2 > \text{ROO}\cdot$. A ação antioxidante da cafeína foi semelhante a da glutatona e significativamente maior do que do ácido ascórbico (DEVASAGAYAM et al., 1996).

A partir das considerações feitas, conclui-se que o café, devido a sua composição diversificada de substâncias antioxidantes, representa uma alternativa promissora a ser aplicada na prevenção e tratamento das doenças crônicas não transmissíveis.

Portanto, mais trabalhos sobre as propriedades do café, relacionados com a saúde, devem ser realizados, destacando-se também o plantio, a secagem, o processamento dos grãos, o modo de preparo, a frequência de consumo, a dose resposta dos compostos bioativos, entre outros.

Agradecimentos:

À CAPES pela concessão de bolsa e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-DORIA, R.F., REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Antioxidant activity of Rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.20, n.2, p.197-203, 2000.
- ANDREANSEN, M.F., KROON, P.A., WILLIAMS, G., GARCIA-CONESA, M.T. Intestinal release and uptake of phenolic antioxidant diferulic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, v.31, n.3, p.304-314, 2001.
- AMSTALDEM, L.C., LEITE, H.C.M. Identificação de voláteis de café através de cromatografia gasosa de alta resolução/espectrometria de massas empregando um amostrador automático de "Headspace". *Ciência Tecnologia de Alimentos*, v.21, n.1, p.123-128, 2001.
- Associação Brasileira das Indústrias de Café. Disponível em: http://www.abic.com.br/noticias/nota_tendencias.html. Acesso em 23 nov. 2005.
- ARAUJO, F.A., MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante de extratos aquosos de café (*Coffea arabica*, L.) in natura e torrado em diferentes níveis. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.40, supl. 1, p.118-120, 2004.
- AZUMA, K., IPPUSHI, K., NAKAYAMA, M., ITO, H., HIGASHIO, H., TERAOKA, J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.48, p.5496-5500, 2000.
- BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism*, v.49, n.2, p.3-8, 2000.
- J.M., VIANA BONOMO, P., CRUZ, C.D., SORIANO, A.A.P., OLIVEIRA, V.R., CARNEIRO, P.C.S. Avaliação de progênies obtidas de cruzamentos de descendentes do híbrido de Timor com as cultivares Catuai Vermelho e Catuai Amarelo. *Bragantia*, v.63, n.2, p.207-219, 2004.
- BORRELLI, R.C., VISCONTI, A., MENNELLA, C., ANESE, M., FOGLIANO, V. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.50, n.22, p.6527-6533, 2002.
- CARRERA, F., LÉON-CAMACHO, M., PABLOS, F., GONZÁLEZ, A.G. Authentication of green coffee varieties according to their sterolic profile. *Analytica Chimica Acta*, v.370, p.131-139, 1998.
- CHALAS, J., CLAISE, C., EDEAS, M., MESSAOUDI, C., VERGNES, L., ABELLA, A., LINDENBAUM, A. effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. *Biomed. Pharmacother.*, v.55, p.54-60, 2001.
- CINTRA, R.M.G., MANCINI-FILHO, J. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo. *Nutrire*, v.22, p.49-62, 2001.
- CLINFORD, M.N., Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.79, p.362-372, 1999.
- DAGLIA, M., PAPETTI, A., GREGOTTI, C., BERTE, F., GAZZANI, G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.48, p.1449-1454, 2000.
- DEL CARLO, M., SACCHETTI, G., DI MATTIA, C., COMPAGNONE, D., MASTROCOLA, D., LIBERATORE, L., CICHELLI, A. Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.52, p.4072-4079, 2004.
- DEVASAGAYAM, T.P. KAMAT, J.P., MOHAN, H., KESAVAN, P.C. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Acta*, v.13, p.63-70, 1996.
- FAIST, V., ERBERSDÖBLER, H.F. Metabolic transit and in vivo effects of melanoidins as precursor compounds deriving from the Maillard reaction. *Annals of Nutrition & Metabolism*, v.45, p.1-12, 2001.

ARTIGOS

- GONTHIER, M., VERNY, M., BESSON, C., RÉMÉSY, C., SCALBERT, A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *Journal of Nutrition*, v.133, p.1853-1859, 2003.
- INOUE, M., YOSHIMI, I., SOBUE, T., TSUGANE, S. Influence of coffee drinking on subsequent risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study in Japan. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.97, p.293-300, 2005.
- IWAI, K., KISHIMOTO, N., KAKINO, Y., MOCHIDA, K., FUJITA, T. *in vitro* antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.52, p.4893-4898, 2004.
- KUMAZAWA, K., MASUDA, H. Effect of pH on the thermal stability of potent roasty odorants, 3-mercapto-3-methylbutyl esters, in coffee drink. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.51, n.51, p.8032-8035.
- LARANJINHA, J.A.N., ALMEIDA, L.M., MADEIRA, V.M.C. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxyl radicals: antioxidant activity upon LDL oxidation. *Biochemical Pharmacology*, v.48, n.3, p.487-492, 1994.
- LARANJINHA, J.A.N., VIEIRA, O., ALMEIDA, L.M., MADEIRA, V.C.M. Inhibition of metmyoglobin/H2O2 dependent LDL lipid peroxidation by naturally occurring acids. *Biochemical Pharmacology*, v.51, n.4, p.395-402, 1996.
- LIN, C., MUELLER, L.A., Mc CARTHY, J., CROUZILLAT, D., PETIARD, V., TANKSLEY, S.D. Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theor. Appl. Genet.*, v.112, p.114-130, 2005.
- MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.50, p.3660-3667, 2002.
- MAZZAFERA, P., VITÓRIA, A.P. Produção de anticorpos para cafeína e seu derivado cafeinidina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, n.1, p.13-16, 1998.
- MOREIRA, R.F.A., TRUGO, L.C., de MARIA, C.A.B., MATOS, A.G.B., SANTOS, S.M., LEITE, J.M.C. Discrimination of Brazilian arabica green coffee samples by chlorogenic acid composition. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.51, p.95-99, 2001.
- MORGANO, M.A., PAULUCI, L.F., MANTOVANI, D.M.B., MORY, E.E.M. Determinação de minerais em café cru. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.22, n.1, p.19-23, 2002.
- NARDINI, M., CIRILLO, E., NATELLA, F., SCACCINI, C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.25, n.50, p.5735-5741, 2002.
- NATELLA, F., NARDINI, M., GIANNETTI, I., DATTOLO, C., SCACCINI, C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.50, p.6211-6216, 2002.
- NICOLI, M.C.; ANESE, M.; PARPINEL, M.T.; FRANCESCHI, S.; LERICI, C.R. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer Letters*, v.114, p.71-74, 1997.
- OKAMURA, S., SUZUKI, K., YANASE, M., KOIZUMI, M., TAMURA, H. The effects of coffee conjugation reactions in human colon carcinoma cells. *Biol. Pharm. Bull.*, v.28, n.2, p.271-274, 2005.
- OLTHOF, M.R., HOLLMAN, P.C.H., KATAN, M.B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *Journal of Nutrition*, v.131, n.1, p.66-71, 2001.
- RECHNER, A.R., SPENCER, P.E., KUHNLE, G., HAHN, U., RICE- EVANS, C.A. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine*, v.30, n.11, p.1213-1222, 2001.
- ROBINS, R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.51, p.2866-2887, 2003.
- SALDAÑA, M.D.A., MAZZAFERA, P., MOHAMED, R.S. Extração de alcalóides cafeína e trigonelina dos grãos de café com C supercrítico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.17, n.4, p.371-376, 1997.
- SCALBERT, A., WILLIAMS, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, v.130, p.2073S-2085S, 2000.
- SILVA, C.R.M., NAVES, M.M.V. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. *Revista de Nutrição*, v.14, n.2, p. 135-143, 2001.
- SOMOZA, V., LINDENMEIER, M., WENZEL, E., FRANK, O., ERBERSDOBLER, H.F., HOFMANN, T. Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using *in vitro* and *in vivo* techniques. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.57, p.6861-6869, 2003.
- VINSON, J.A., DABBAGH, Y.A., SERRY, M.M., JANG, J. Plant flavonoids especially tea flavonols are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.43, p.2800-2802, 1995.
- VINSON, J.A., DABBAGH, Y.A. Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrition Research*, v.18, n.6, p.1067-1075, 1998.
- ZHENG, W., WHANG, S.Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries and Lingonberries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.51, p.502-509, 2003. ♦