



ADRIENE RIBEIRO LIMA

**DESCAFEINAÇÃO DO CAFÉ: COMPOSTOS
BIOATIVOS, EFEITO SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO E PERFIL LIPÍDICO EM RATOS
HIPERLIPIDÊMICOS**

LAVRAS - MG

2012

ADRIENE RIBEIRO LIMA

**DESCAFEINAÇÃO DO CAFÉ: COMPOSTOS BIOATIVOS, EFEITO
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E PERFIL LIPÍDICO EM RATOS
HIPERLIPIDÊMICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira

Coorientadores

Dra. Stella Maris da Silveira Duarte

Dr Raimundo Vicente de Sousa

Dra. Susana Casal

LAVRAS - MG

2012

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Lima, Adriene Ribeiro.

Descafeinação do café : compostos bioativos, efeito sobre o estresse oxidativo e perfil lipídico em ratos hiperlipidêmicos / Adriene Ribeiro Lima. – Lavras : UFLA, 2012.

139 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Rosemary Gualberto F. A. Pereira.

Bibliografia.

1. Cafeína. 2. Antioxidante. 3. Hiperlipidemia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 663.93

ADRIENE RIBEIRO LIMA

**DESCAFEINAÇÃO DO CAFÉ: COMPOSTOS BIOATIVOS, EFEITO
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E PERFIL LIPÍDICO EM RATOS
HIPERLIPIDÊMICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2012.

Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira
Orientadora

LAVRAS - MG

2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, pelo exemplo, amor e apoio incondicional.

Ao Evandro pelo carinho, incentivo e paciência durante todo o trabalho.

A minha orientadora Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira pela oportunidade, pelos valiosos ensinamentos transmitidos, pela amizade e por acreditar em mim, me apoiando e me incentivando durante esses seis anos de convivência.

À Universidade Federal de Alfenas, à Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula pela amizade e apoio essencial nas análises, em especial, a minha coorientadora Dra. Stella Maris da Silveira Duarte pela grande dedicação e colaboração nesse trabalho, agradeço muito pelo carinho e pela atenção transmitidos sempre.

Ao professor Dr. Raimundo Vicente de Sousa, pela disponibilidade das instalações do Biotério e Laboratório de Farmacologia, pela simpatia com que sempre me tratou e pela valiosa orientação.

Ao William (Departamento de Medicina Veterinária) pelo grande auxílio com as cobaias e principalmente pela generosidade, simpatia e disponibilidade que sempre demonstrou.

À Priscila pelo auxílio valioso no final do experimento.

À Gabriela pela grande ajuda durante o experimento, principalmente as análises histológicas.

À Juliana, pela amizade, companheirismo e grande apoio durante as análises do ensaio biológico.

À amiga Sheila, que mesmo na distância física sempre me auxiliou e é um exemplo para mim.

Ao Gabriel (Universidade Federal de Alfenas) pela amizade e valiosa ajuda nas análises cromatográficas.

À Tina (Departamento de Ciência dos Alimentos) por todo o apoio nas análises.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Aos amigos do Polo de Tecnologia e Qualidade do café: Vanderley, Edson, Bruno, Fernanda, Katiany, Jordana e Emanuelle.

À Míriam Helena pela amizade e auxílio nas análises estatísticas.

Ao CNPq e Fapemig por financiar meu curso com o pagamento mensal da bolsa de estudos.

À Capes pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

À Dra. Susana Casal da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (Porto/Portugal) pela oportunidade única que me concedeu, por ter dedicado grande parte do seu tempo me auxiliando nas análises e contribuindo de forma valiosa nesse trabalho, agradeço pelo cuidado que teve comigo durante todo o tempo que estive fora, sou muito grata por tudo isso.

À Dra Eulália, Carina, Ana, Elsa, Catarina, Trini, Cristina, Olga, Armindo, Edgar, Ricardo, Anabela Borges, Anabela Costa e todos do laboratório de Bromatologia e Hidrologia da FFUP pela forma carinhosa que sempre me trataram, fazendo com que minha estada no Porto fosse muito especial.

Ao José Avelino da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto pelo valioso auxílio nas análises.

À COCAM pela concessão das amostras de café.

As minhas queridas amigas Valéria, Stefânia, Joyce, Caroline e Susana que sempre me deram uma palavra amiga nos momentos mais difíceis.

As minhas amigas de república: Cíntia, Fernanda, Cynthia, Glêndara e Glenda pelos momentos alegres proporcionados durante os anos de convivência.

À “Grande Família” de Alfenas, pela eterna amizade e apoio transmitidos sempre.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da descafeinação do café das espécies arábica e robusta sobre o perfil lipídico e estresse oxidativo em ratos hiperlipidêmicos e caracterizar quimicamente as amostras de café e as bebidas administradas aos ratos. Foram realizadas as seguintes análises nos grãos crus e torrados: densidade aparente, cor, umidade, sólidos solúveis, acidez titulável, pH, fenólicos totais, açúcares totais e redutores e extrato etéreo. Nas bebidas foram determinados os teores dos seguintes compostos: trigonelina, niacina, cafeína, ácidos clorogênicos, diterpenos, ácidos graxos, tocoferóis, furfural e 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF). Foram administradas bebidas de café filtrado por gavagem, na dose de 7,2 mL/kg/dia durante 42 dias: arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD). Os ratos (n=30) foram divididos em 6 grupos: um controle negativo (C-), um controle positivo (C+), e um grupo para cada tipo de bebida de café. A dieta hipercolesterolêmica (0,5% de colesterol e 0,25% de ácido cólico) foi oferecida *ad libitum*, exceto para o C- que recebeu dieta comercial normal. No fim do experimento foram determinados os níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol total, *HDL*-colesterol, colesterol não *HDL* e proteína C reativa. A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e os teores de dialdeído malônico (MDA) foram determinados no soro e no fígado dos ratos. Foram determinados ainda os teores de lipídeos totais hepáticos e avaliação histopatológica dos fígados. Os resultados mostraram uma influência da espécie e da descafeinação do café sobre os compostos bioativos presentes nas bebidas. As bebidas descafeinadas apresentaram menores teores de compostos lipídicos do café e maiores teores de alguns compostos bioativos como os ácidos cafeoilquínicos e a trigonelina. A administração da ração hiperlipídica foi eficiente na indução de hiperlipidemia nos ratos, comprovada pelos níveis de colesterol total e colesterol não *HDL* significativamente maiores no grupo C+ em relação ao grupo C-. Todas as bebidas de café independente da espécie e do processo de descafeinação apresentaram efeito hipolipidêmico e prevenção de lipoperoxidação hepática. As análises histopatológicas demonstraram uma maior proteção das bebidas da espécie arábica com uma clara redução da proteção com a descafeinação em ambas as espécies. Os dados sugerem que o efeito hipolipidêmico e a atividade antioxidante da bebida de café independem da espécie e do processo de descafeinação.

Palavras-chave: Cafeína. Antioxidante. Hiperlipidemia.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of coffee decaffeination, arabica and robusta species, on the lipid profile and oxidative stress in hyperlipidemic rats and chemically characterize samples of coffee and coffee brews administered to rats. The following analyzes were performed on green and roasted beans: density, color, moisture, soluble solids, acidity, pH, total phenolics, total and reducing sugars and ethereal extract. In the beverages were determined the following compounds: trigonelline, niacin, caffeine, chlorogenic acids, diterpenes, fatty acids, tocopherols, furfural and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF). The animals received daily doses of filter coffee beverages by gavage at a dose of 7.2 ml/kg/day for 42 days: whole arabica (WA), decaffeinated arabica (DA), whole robusta (WR) and decaffeinated robusta (DR). Rats (n = 30) were divided into six groups: a negative control (C-), a positive control (C +), and a group for each type of coffee beverage. The hypercholesterolemic diet (0.5% cholesterol and 0.25% cholic acid) was offered *ad libitum*, except for the C- group, which received normal diet. At the end of the experiment were determined serum levels of triglycerides, total cholesterol, *HDL*-cholesterol, non HDL cholesterol and C-reactive protein. The antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and levels of malonic dialdehyde (MDA) were determined in the serum and liver of rats. The levels of liver total lipids and histopathological evaluation of the livers were also analyzed. The results obtained demonstrated an influence of species and the decaffeination of coffee on the bioactive compounds in coffee beverages. The decaffeinated beverages showed lower levels of lipid compounds and higher concentration of some bioactive compounds such as caffeoylquinic acids and trigonelline. The hyperlipidemic diet was effective in induced hyperlipidemia in rats, as evidenced by higher levels of total cholesterol and non HDL cholesterol in group C + compared to group C-. All coffee beverages, independent of species or decaffeination process presented hypolipidemic effect and prevention of the liver lipid peroxidation. The histopathological analysis showed a higher protection to the arabica species, with a clear reduction in the protection for both coffee species. The data suggest that the hypolipidemic effect and antioxidant activity of coffee beverages are independent of coffee species and the decaffeination process.

Keywords: Caffeine. Antioxidant. Hyperlipidemia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Evolução do consumo interno de café no Brasil	18
Figura 2	Reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o dialdeído malônico (MDA) que forma um cromógeno que absorve a 532nm.....	35
Figura 3	Fotomicrografia do Fígado de Rato. A: normal, tratamento controle; B: Lesão considerada leve (+); C: Lesão considerada moderada (++); D: Lesão considerada acentuada (+++). Coloração: HE, objetiva 40.	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERN)	29
Tabela 2	Gradiente de eluição	54
Tabela 3	Análise de cor dos grãos de café torrado e moído arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD), de acordo com os parâmetros de cromaticidade da escala CIE L* a* b*	68
Tabela 4	Valores médios de densidade aparente (g/mL), umidade (%) e sólidos solúveis (%) nas amostras de café.....	70
Tabela 5	Valores médios de acidez titulável total (mL de NAOH 0,1N/100g) e pH nas amostras de café	72
Tabela 6	Valores médios (%) de açúcares totais, açúcares redutores e extrato etéreo nas amostras de café	73
Tabela 7	Teores de compostos fenólicos (\pm desvio padrão) (mg eq. Ac. Gálico/mL) nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD).....	77
Tabela 8	Teores de cafeína (\pm desvio padrão) detectados nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD).....	78
Tabela 9	Teores dos isômeros dos ácidos clorogênicos (\pm desvio padrão) detectados nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD).....	81
Tabela 10	Teores de trigonelina e niacina (\pm desvio padrão) detectados nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD).....	84

Tabela 11 Níveis de α – tocoferol, β – tocoferol e tocoferóis (\pm desvio padrão) detectados nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD).....	86
Tabela 12 Níveis de cafestol e de kahweol (\pm desvio padrão) detectados nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD).....	88
Tabela 13 Composição de ácidos graxos (%) e teores de ácidos graxos totais nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD).....	90
Tabela 14 Níveis de furfural (ug/mL) e 5-HMF (mg/mL) nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD).....	92
Tabela 15 Concentrações médias dos níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol total, colesterol não <i>HDL</i> e <i>HDL-c</i> (mg/dL) nos grupos controle negativo (C-), controle positivo (C+) e nos grupos tratados com as bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD).....	93
Tabela 16 Níveis médios de proteína C reativa no soro (mg.L ⁻¹) nos grupos controle negativo (C-), controle positivo (C+) e nos grupos tratados com as bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD).....	95

Tabela 17	Atividade sérica das enzimas SOD e GPx nos grupos controle negativo (C-), controle positivo (C+) e nos grupos tratados com as bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)	96
Tabela 18	Teores médios de dialdeído malônico no plasma (nmol MDA/mg proteína) dos grupos controle negativo (C-), controle positivo (C+) e nos grupos tratados com as bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)	99
Tabela 19	Atividade hepática das enzimas SOD e GPx nos grupos controle negativo (C-), controle positivo (C+) e nos grupos tratados com as bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)	100
Tabela 20	Porcentagem de lipídeos hepáticos totais dos grupos controle negativo (C-), controle positivo (C+) e nos grupos tratados com as bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)	102
Tabela 21	Teores médios de dialdeído malônico no fígado (nmol MDA/mg proteína) dos grupos controle negativo (C-), controle positivo (C+) e nos grupos tratados com as bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)	103

LISTA DE ABREVIATURAS

BHT	Butilhidroxitolueno
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
<i>Nrf2</i>	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
Keap1	<i>Kelch ECH associating protein 1</i>
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
AIC	Arábica integral cru
ADC	Arábica descafeinado cru
RIC	Robusta integral cru
RDC	Robusta descafeinado cru
AIT	Arábica integral torrado
ADT	Arábica descafeinado torrado
RIT	Robusta integral torrado
RDT	Robusta descafeinado torrado
<i>HDL-c</i>	<i>High density lipoprotein-cholesterol</i>
<i>LDL-c</i>	<i>Low density lipoprotein-cholesterol</i>
PCR	Proteína C reativa
SOD	Superóxido dismutase
GPx	Glutathione peroxidase
MDA	Dialdeído malônico
<i>TBARS</i>	<i>Thiobarbituric acid-reactive substances</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>HPLC</i>	<i>High performance liquid chromatography</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	Classificação botânica do café e importância econômica.....	17
2.2	Composição química.....	19
2.3	Processos de descafeinação.....	24
2.4	Torração, moagem e preparo da bebida.....	26
2.5	Radicais livres e espécies reativas.....	28
2.6	Defesas antioxidantes.....	30
2.6.1	Superóxido Dismutase (SOD).....	31
2.6.2	Glutathione Peroxidase (GPx).....	32
2.7	Estresse oxidativo.....	32
2.8	Peroxidação lipídica e biomarcadores.....	33
2.9	Cafeína e saúde.....	35
2.10	Café como alimento funcional.....	38
2.11	Aterosclerose e hiperlipidemia.....	42
2.12	Café e perfil lipídico.....	46
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.1	Matéria-prima e instalações.....	48
3.2	Preparo das amostras.....	48
3.3	Caracterização das amostras.....	49
3.3.1	Análise de cor.....	49
3.3.2	Densidade aparente.....	49
3.3.3	Umidade.....	50
3.3.4	Sólidos solúveis.....	50
3.3.5	Acidez titulável.....	50
3.3.6	pH.....	51
3.3.7	Açúcares totais e redutores.....	51
3.3.8	Extrato etéreo.....	51
3.4	Determinação de compostos bioativos nas bebidas de café.....	52
3.4.1	Preparo da bebida.....	52
3.4.2	Determinação dos fenólicos totais.....	52
3.4.3	Determinação dos teores de trigonelina, niacina, 5- hidroximetilfurfural, furfural, ácidos clorogênicos e cafeína.....	53
3.4.4	Determinação dos diterpenos caveol e cafestol.....	54
3.4.5	Determinação de tocoferóis.....	55
3.4.6	Determinação de ácidos graxos.....	56
3.5	Ensaio biológico.....	57
3.5.1	Preparo da dieta hiperlipídica.....	58
3.5.2	Grupos Experimentais.....	58

3.5.3	Preparo das amostras de sangue.....	59
3.5.4	Preparo das amostras de fígado.....	59
3.5.5	Determinação do colesterol sérico total.....	60
3.5.6	Determinação dos níveis séricos de <i>HDL-c</i>	60
3.5.7	Determinação dos níveis séricos de colesterol não <i>HDL-c</i>	61
3.5.8	Determinação dos níveis séricos de triacilgliceróis.....	61
3.5.9	Determinação da proteína C reativa.....	62
3.5.10	Determinação do teor de proteínas totais séricas.....	62
3.5.11	Determinação do teor de proteínas no fígado.....	63
3.5.12	Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD).....	63
3.5.13	Determinação da atividade da glutatona peroxidase (GPx).....	64
3.5.14	Avaliação da peroxidação lipídica.....	64
3.5.15	Determinação de lipídeos no fígado.....	65
3.5.16	Análise histológica dos fígados.....	65
3.6	Delineamento experimental.....	66
3.7	Análise estatística.....	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1	Análise de cor.....	68
4.2	Análises físico-químicas.....	69
4.3	Compostos bioativos nas bebidas de café.....	76
4.3.1	Fenólicos totais.....	76
4.3.2	Cafeína.....	78
4.3.3	Ácidos clorogênicos.....	80
4.3.4	Trigonelina e niacina.....	83
4.3.5	Tocoferóis.....	86
4.3.6	Diterpenos: kahweol e cafestol.....	87
4.3.7	Ácidos graxos.....	89
4.3.8	Furfural e 5-HMF.....	91
4.4	Ensaio Biológico.....	93
4.4.1	Perfil lipídico.....	93
4.4.2	Proteína C reativa.....	95
4.4.3	Atividade sérica das enzimas SOD e GPx.....	96
4.4.4	Peroxidação lipídica no plasma.....	98
4.4.5	Atividade das enzimas SOD e GPx no fígado.....	99
4.4.6	Lipídeos hepáticos totais.....	101
4.4.7	Peroxidação lipídica no fígado.....	103
4.4.8	Análise histológica dos fígados.....	106
5	CONCLUSÃO	110
	REFERÊNCIAS	111
	APÊNDICES	130

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos mais valiosos produtos da economia global e sua bebida é uma das mais consumidas no mundo, o que tem estimulado o desenvolvimento de estudos relacionados à atividade biológica de substâncias presentes nos grãos crus e torrados. Diferentes constituintes do café têm sido sugeridos como potencialmente quimioprotetores em diferentes sistemas químicos e biológicos, devido aos numerosos antioxidantes presentes na bebida, como a cafeína (DEVASAGAYAM, 1996), ácidos clorogênicos (GÓMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007), ácidos hidroxicinâmicos (GALLARDO; JIMÉNEZ; GARCIA-CONESA, 2006), e produtos da reação de Maillard originados na torração, como as melanoidinas (DELGADO-ANDRADE; RUFÍÁN-HENARES; MORALES, 2005). Verifica-se assim, que a capacidade antioxidante está relacionada tanto à presença de constituintes naturais como de compostos formados na torração. E uma vez identificada a atividade antioxidante de produtos vegetais, é importante pesquisar quais os fatores que influenciam esta propriedade.

Muitos estudos têm ressaltado os efeitos positivos do café à saúde humana, entre estes estão: a redução do *LDL*-colesterol. Um grande número de ensaios clínicos demonstrou a importância dos níveis elevados do *LDL-c* na patogenia da aterosclerose, bem como nos acidentes vasculares cerebrais e doença arterial periférica e o benefício substancial com o tratamento da hiperlipidemia. Essa classe de patologia está frequentemente associada ao aumento do risco de instalação de outras patologias, tais como as doenças isquêmicas e esteatose hepática (KOTEISH; DIEHL, 2001).

Considerando que a oxidação do *LDL-c* parece exercer um papel na aterogênese, a terapêutica antioxidante tem sido recomendada como uma medida profilática. O interesse pela descoberta de novos e seguros antioxidantes de fontes naturais tem aumentado, principalmente para prevenir o dano oxidativo às

células vivas. O uso de antioxidantes sintéticos tem diminuído devido a suspeita da atividade como promotores de carcinogênese. O papel de antioxidantes dietéticos e seus benefícios para a saúde têm atraído grande atenção nos últimos anos, em especial a bebida de café que está entre as bebidas mais consumidas no mundo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ - ABIC, 2012a).

A atividade antioxidante da cafeína ainda é controversa, trabalhos demonstram que a cafeína é capaz de prevenir a lipoperoxidação, em contraste outros estudos não verificaram atividade antioxidante da cafeína em níveis fisiológicos. Outros compostos presentes no café como compostos fenólicos, entre eles, o ácido clorogênico e seus derivados parecem desempenhar papel relevante em processos oxidativos por meio da neutralização de ERO.

O café descafeinado responde por aproximadamente 10% do consumo mundial de café, sendo apreciado preferencialmente por pessoas com intolerância à cafeína, principalmente devido a problemas gástricos e de insônia. A descafeinação é realizada nos grãos verdes e durante a mesma ocorre perda de componentes bioativos. Embora existam vários estudos sobre a composição química e atividade antioxidante do café integral falta estudos que avaliem a influência da descafeinação sobre esses parâmetros, especialmente sobre a hiperlipidemia. Desta forma, este estudo objetivou avaliar o efeito da descafeinação de duas espécies de café (*Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre) na sua composição química e sua influência no perfil lipídico e no estresse oxidativo em ratos com hiperlipidemia induzida por dieta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Classificação botânica do café e importância econômica

A planta de café pertence ao gênero *Coffea*, membro da família Rubiaceae. Existem mais de 100 espécies conhecidas do gênero *Coffea*, mas somente 10 são cultivadas em todo mundo e duas delas são consideradas as mais importantes por corresponder a mais de 90 % da produção mundial: *Coffea arabica* L., conhecida como arábica e *Coffea canephora* Pierre, conhecida como robusta ou conilon (IVOGLO et al., 2008).

O café arábica, a espécie mais cultivada e comercializada no mundo, é alotetraploide ($2n=4x=44$), autógama, adaptada aos locais de altitudes elevadas e clima ameno, já os cafeeiros da espécie *C. canephora* são diploides ($2n=2x=22$), com autoincompatibilidade genética do tipo gametofítica, reproduzem-se por fecundação cruzada e são adaptados a regiões de altitudes mais baixas e temperaturas mais elevadas. Em razão de sua forma natural de reprodução, as lavouras de café robusta são de grande heterogeneidade, com plantas muito distintas quanto à arquitetura da parte aérea, ao formato e tamanho dos grãos, à época e uniformidade de maturação dos frutos, suscetibilidade a pragas e doenças, tolerância à seca, ao vigor vegetativo, à capacidade produtiva, entre outros, sendo difícil a caracterização de variedades dentro da espécie (IVOGLO et al., 2008).

Os cafés da espécie arábica produzem bebidas doces, ligeiramente ácidas e um agradável toque amargo. Os cafés da espécie robusta são, pelo contrário, ásperos, adstringentes e mais amargos. As duas espécies apresentam distinções quanto ao preço, qualidade e aceitabilidade, produzindo bebidas com características diferentes (IVOGLO et al., 2008).

A importância econômica do café robusta deve-se, principalmente, ao fato de se constituir como matéria-prima básica na indústria de café solúvel e como componente importante na composição dos "blends" com café arábica nas indústrias de café torrado e moído. Esse processo proporciona ao produto final expressiva capacidade de competição no mercado, tendo em vista o maior rendimento industrial, por ter, principalmente, mais sólidos solúveis, e preços mais baixos em sua comercialização (CARVALHO et al., 2001; IVOGLO et al., 2008).

O consumo interno brasileiro de café continua crescendo. No período compreendido entre novembro/2010 e outubro/2011 a ABIC registrou o consumo de 19,72 milhões de sacas, isto representando um acréscimo de 3,11% em relação ao período anterior correspondente (Nov/09 a Out/10), que havia sido de 19,13 milhões de sacas (Figura 1).

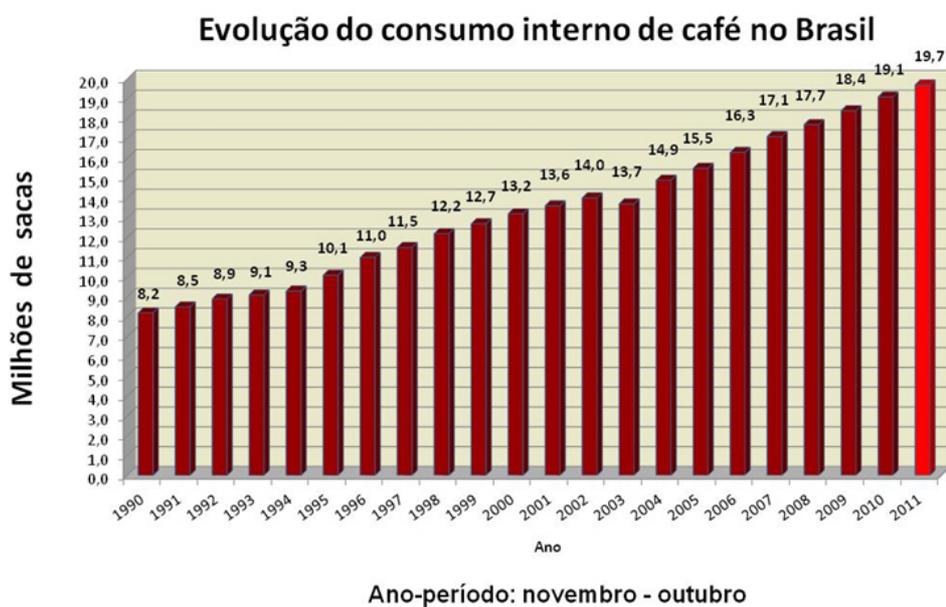


Figura 1 Evolução do consumo interno de café no Brasil

Fonte: ABIC (2012b)

Já o consumo *per capita* foi de 6,10 kg de café em grão cru ou 4,88 kg de café torrado, quase 82 litros para cada brasileiro por ano, registrando uma evolução de 1,45% em relação ao período anterior. Os brasileiros estão consumindo mais xícaras de café por dia e diversificando as formas da bebida durante o dia, adicionando ao café filtrado consumido nos lares, também os cafés expressos, *cappuccinos* e outras combinações com leite. Esse consumo de 4,88 kg / ano supera o de 1965, que foi de 4,72 kg / hab/ano, tornando-se o maior consumo já registrado, um verdadeiro recorde (ABIC, 2012b).

Pesquisas demonstram que a ingestão de cafeína em excesso (acima de 300 mg por dia) pode causar distúrbios no organismo, como ansiedade, taquicardia, insônia, dores de cabeça (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009; SIN; HO; CHUNG, 2009). Diante disso, tem havido um aumento na procura pelo café descafeinado, muitas vezes por recomendação médica.

Segundo a ABIC (2012b), o consumo de café descafeinado no Brasil é de aproximadamente 1,2%, sendo que, de todo o café mundialmente comercializado, 10% é destinado à descafeinação.

A importância do café para o Brasil é indiscutível, uma vez que se trata do principal produto agrícola brasileiro de exportação, agregando considerável volume de recursos à balança comercial. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor, atrás apenas dos Estados Unidos (ABIC, 2012b).

2.2 Composição química

O café cru, o café torrado e a bebida dele preparada possuem uma composição muito complexa, com centenas de substâncias químicas que ocorrem naturalmente ou formadas durante a torração (BELITZ; ROSH, 1999).

Os teores médios dos principais constituintes químicos do café cru arábica são: água (8 a 12%); proteínas (9 a 16%); minerais (2,5 a 4,5%); lipídeos (10 a 18%); carboidratos (20 a 25%); sólidos solúveis (24 a 31%); açúcares totais (5 a 10%); açúcares redutores (0 a 5%); ácidos clorogênicos (2 a 8,4%); cafeína (0,6 a 1,5%); potássio (1,35 a 1,88%) e trigonelina (0,7 a 1,4%) (PRETE, 1992).

A composição química do grão cru do café depende de fatores genéticos, ambientais e condições de manejo pré e pós-colheita e, segundo os autores, a torração é uma etapa essencial para a produção de compostos que conferem as características de aroma e sabor do café, ocorre também variação da composição química entre as espécies arábica e robusta. O café robusta apresenta maiores teores de cafeína e ácidos clorogênicos e menores teores de trigonelina que o café arábica. As concentrações desses componentes podem variar também com o processamento pós-colheita dos grãos. O fato do café robusta possuir quase o dobro de cafeína em relação ao café arábica sugere que o efeito fisiológico das bebidas preparadas a partir destes cafês sejam diferentes (CAMPÁ et al., 2001; NOGUEIRA; TRUGO, 2003).

Os açúcares e as proteínas do grão cru são os principais compostos que contribuem para o sabor e aroma do café torrado. Dentre esses compostos, sobressaem os açúcares, compostos fenólicos (ácidos clorogênicos), cafeína, compostos voláteis, ácidos graxos, proteínas e algumas enzimas, cuja presença, teores e atividades conferem ao café um sabor e aroma peculiares (LICCIARDI et al., 2005).

A formação do aroma é um processo complexo, sendo que alguns de seus precursores são os lipídeos, a sacarose e a trigonelina. Por outro lado, os ácidos clorogênicos e a cafeína são os precursores da acidez do café (MONTAGNON et al., 1998).

A trigonelina é uma N-metil betaína, importante para o sabor e aroma do café. Ela contribui para o aroma por meio da formação de produtos de degradação durante a torração, entre os quais estão: as piridinas e o N-metilpirrol (MOREIRA; TRUGO; MARIA, 1999). Além disso, a trigonelina é precursora da niacina, produzida durante o processo de torração, o que faz do café um dos poucos alimentos que aumenta seu valor nutricional após o processamento térmico (CASAL; OLIVEIRA; FERREIRA, 2000; MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999).

A niacina é também designada como ácido nicotínico, vitamina B3 ou fator PP (esta última designação advém da sua ação farmacológica: PP = “prevenção da pelagra”). O café torrado (em grão e solúvel) pode conter 10-40 mg de niacina/100 g. Uma xícara de café pode fornecer até 3 mg de niacina. Deste modo, o consumo moderado de café pode contribuir para a prevenção do desenvolvimento desta doença (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

A sacarose é o açúcar de baixa massa molecular mais abundante no café, sua natureza e o conteúdo são primordiais para o "*flavor*" do mesmo, para a formação de pigmentos e outros compostos de alta massa molecular, formados pela condensação e caramelização durante o processo de torração. Não somente a sacarose como também outros glicídios e polissacarídeos são de importância para o aroma do café.

A principal família de compostos voláteis gerada por estes açúcares são os furanos, que contribuem consideravelmente para as características sensoriais do café torrado (MARIA; MOREIRA; TRUGO, 1999).

Os compostos fenólicos presentes em vegetais têm recebido considerável atenção por serem os principais componentes com atividade antioxidante, embora não sejam únicos. A atividade antioxidante de compostos fenólicos tem sido atribuída as suas propriedades de óxido-redução, que

desempenham importante papel na adsorção ou neutralização de ERO (BASILE et al., 2005).

Os ácidos clorogênicos, são uma família de compostos fenólicos, oriunda da esterificação do ácido quínico com derivados do ácido cinâmico como os ácidos cafeico, ferúlico e p-cumárico, sendo os principais subgrupos de isômeros os ácidos cafeoilquínicos (ACQ), feruloilquínicos (AFQ) e dicafeoilquínicos (AdiCQ) e, minoritariamente, os ácidos p-cumaroilquínicos (p-ACoQ) (CLIFFORD, 1999). Esses compostos geram durante a torração uma série de compostos fenólicos de baixa massa molar como, por ex., fenol, 1,2,3-triidroxibenzeno (pirogalol), 1,2-diidroxibenzeno (catecol), 4-vinilbenzeno-1,2-diol (4-vinilcatecol), entre outros, que apresentam características sensoriais bem variadas, como odores de matéria queimada, especiarias, cravo, fumo e, também, sensação de amargor e adstringência (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

Os ácidos clorogênicos são os derivados hidroxicinâmicos mais abundantes e de maior distribuição nos alimentos (NARDINI et al., 2002). Do total dos ácidos clorogênicos no café, os ácidos cafeoilquínicos representam cerca de 80% e o 5-cafeoilquínico, 60%. Além da importância para a formação de aroma e "*flavor*", os ácidos clorogênicos possuem também bioatividade (DUARTE et al., 2005).

A cafeína é o componente mais conhecido do café, tanto do ponto de vista científico quanto popular, devido às suas propriedades fisiológicas e farmacológicas e é o composto mais estável durante a torração. A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é uma substância presente em uma ampla variedade de bebidas, das quais se destaca o café. Ela é desmetilada por enzimas do citocromo hepático P-4501A2 como a 1,7-dimetilxantina e, em menor extensão, a 3,7-dimetilxantina e 1,3-dimetilxantina em humanos. Após essa fase, as moléculas formadas de 1,7-dimetilxantina sofrem nova desmetilação, resultando em 1-

metilxantina e 1-ácido metilúrico, que são os principais metabólitos da cafeína (TRUGO; MORAES, 2001).

Os tocoferóis, conhecidos como potentes antioxidantes *in vivo*, estão também presentes no óleo do café, especialmente no de café arábica. Sendo insolúveis em água, a sua extração para a bebida irá depender essencialmente do método de preparação desta. Determinados processos (café turco, escandinavo e expresso) permitem uma maior extração dos compostos lipídicos do café.

A atividade antioxidante dos tocoferóis é principalmente devida à capacidade de doar seus hidrogênicos fenólicos as ERO lipídicos, interrompendo a propagação em cadeia (RAMALHO; JORGE, 2006).

Apesar de estarem presentes em quantidades relativamente pequenas, os tocoferóis contribuem para complementar a atividade antioxidante da bebida, já que, devido à sua elevada lipossolubilidade poderão atuar em locais diferentes de outros antioxidantes do café (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

O kawool e cafestol são classificados como álcoois de diterpenos e fazem parte da fração insaponificável do café. Vários trabalhos têm verificado benefícios desses diterpenos à saúde, como ação protetora contra toxinas, atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticarcinogênicas e efeito hepatoprotetor aos consumidores da bebida de café (KIM; HWANG; JEONG, 2009; LEE; CHOI; JEONG, 2007). Em contrapartida, a ação hipercolesterolêmica do cafestol também foi verificada (BOEKSCHOTEM et al., 2003; URGERT et al., 1995).

O hidroximetilfurfural (HMF) é formado na torração do café pela desidratação de levulose e no aquecimento de serina e treonina com sacarose. A formação de HMF paralela à degradação de sacarose durante o processo de torração do café é iniciada a 170°C e atinge o máximo a 230°C, ocorrendo uma rápida decomposição a temperaturas superiores. O HMF apresentou capacidade antioxidante e mostrou uma atividade comparável aos compostos 2,6-dibutil-4-

metilfenol e α -tocoferol. O furfural é formado pela decomposição de pentosanas, como arabinose, e pela degradação térmica de glicose, cisteína e xilose. Foi demonstrado que o furfural também é formado de compostos de Amadori de uma pentose e um intermediário 3-deoxiosona (VIGNOLI, 2009).

2.3 Processos de descafeinação

A descafeinação é realizada nos grãos crus inteiros, antes do processo de torração. Na maioria dos métodos de descafeinação são utilizados solventes químicos para extração da cafeína, como diclorometano, clorofórmio, álcool, acetona, e outros (RAMALAKSHMI; RAGHAVAN, 1999), sendo o diclorometano mais utilizado no Brasil devido à sua alta seletividade à cafeína. A descafeinação com água começa a ter alguma aplicação industrial, principalmente na Europa, sendo denominado de “método natural”.

Um estudo comparou cafés descafeinados pelo método chamado “natural” (com água) e cafés descafeinados pelo método que utiliza solvente e verificou-se uma maior rejeição sensorial pelos cafés descafeinados com solvente, no entanto houve perdas maiores nos teores de proteínas no método de descafeinação “natural”. Ambos os tipos de cafés têm suas desvantagens (LEITE, 2009).

Na descafeinação com diclorometano os grãos verdes são umedecidos com água para tornar sua superfície porosa e facilitar a separação da cafeína associada ao ácido clorogênico, permitindo que o solvente extrator tenha acesso à cafeína, além de facilitar sua saída pela parede celular do grão (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006). Os grãos são imersos no solvente por 30 minutos. Isso se repete várias vezes, os grãos são removidos do solvente depois que a cafeína é extraída e é aplicado vapor durante algum tempo para remover qualquer traço do solvente. Depois disso os grãos são secos usando ar morno e resfriados com ar

frio. São então torrados, moídos e embalados da forma usual. O diclorometano é reutilizado para posterior descafeinação após remoção da cafeína, sendo então, reaproveitada para outros fins alimentares ou farmacêuticos (CASTLE, 1991).

O uso de fluidos supercríticos na extração de produtos naturais apresenta vantagens em relação a solventes comuns, uma das aplicações industriais mais importantes desta tecnologia é a extração da cafeína dos grãos de café com CO₂ supercrítico. O dióxido de carbono apresenta uma temperatura crítica relativamente baixa (31,2° C), permitindo uma extração sem risco de degradação térmica de produtos termossensíveis frequentemente encontrados na destilação (PEKER et al., 1992).

O grau de torração deve ser ajustado para garantir manutenção da qualidade e das características sensoriais do café descafeinado, pois o processo de descafeinação torna o café mais vulnerável à torração, acelerando este processo. Tempo e temperatura mais rápidos e brandos são necessários para dar maior regularidade à bebida e adquirir um mesmo ponto de torração de um café convencional. Isso ocorre tanto no café descafeinado com método natural (água) quanto o químico através de diclorometano, pois o calor permeia o café com maior facilidade nesses cafês (LEE, 1999).

Todos esses métodos de descafeinação citados são muito dispendiosos e muitos utilizam solventes considerados tóxicos. Vários estudos têm sido realizados mediante o cruzamento de espécies de plantas com baixo teor de cafeína com o objetivo de produzir cafês naturalmente descafeinados, a fim de resolver os problemas que envolvem o processo de descafeinação e a qualidade do produto final (NAGAI et al., 2008; SILVAROLLA; MAZZAFERA; FAZUOLI, 2004).

2.4 Torração, moagem e preparo da bebida

A torração provoca mudanças nos grãos tanto físicas, como modificações na forma, cor, tamanho, quanto químicas, devidas principalmente às reações pirolíticas que provocam alterações nos compostos orgânicos do grão cru gerando produtos como caramelos, ácidos, carbonilas e sulfetos (SIVETZ; DEROSIER, 1979).

O tempo total gasto na torração, desde a entrada do grão verde até a descarga, varia em geral de 5 a 10 minutos em torrador contínuo e até mais de 20 minutos em torrador não contínuo. A maioria das máquinas artesanais de torração funciona a gás. Durante o processo atingem-se temperaturas de cerca de 290 °C. O processo pode ser dividido em três estágios consecutivos: secagem, torração e resfriamento (BORGES; JORGE; NORONHA, 2002).

O estágio de secagem é caracterizado pela liberação de água e compostos voláteis. No início, a cor muda de verde para amarelo e o grão perde água, enquanto sua temperatura permanece constante ao redor de 100 a 104°C (BORGES; JORGE; NORONHA, 2002). Quando o teor de água evaporada chega a 10% do peso, a temperatura começa a se elevar lentamente. Até esse ponto, ocorrem apenas mudanças físicas no grão sem desenvolvimento de sabor do café (VILAS-BOAS et al., 2001). No segundo estágio, ou torração propriamente dita, a cor dos grãos varia de marrom claro a escuro (BORGES; JORGE; NORONHA, 2002). Em torno de 204°C, a temperatura do grão é acentuadamente aumentada pela liberação de calor produzido nas reações de pirólise que se processam no interior dele. A pirólise é uma reação química na qual ocorrem simultaneamente degradação e síntese de compostos. Apesar das altas temperaturas, a torração do café não provoca a queima dos grãos, porque ocorre dentro das células e na ausência de ar.

Os produtos da pirólise são os açúcares caramelizados, carboidratos, o ácido acético e seus homólogos aldeídos, cetonas, furfural, ésteres, ácidos graxos, aminas, CO₂, sulfetos etc. Todos esses constituintes contribuirão para um desenvolvimento do sabor do café.

A reação ocorre em intervalos de tempo muito curto (décimos de segundo) e deve ser paralisada abruptamente no ponto de torração desejado, determinado pela mudança de coloração do grão (VILAS-BOAS et al., 2001). A partir desse ponto, faz-se necessário o resfriamento imediato dos grãos (terceiro estágio), para evitar a carbonização (BORGES; JORGE; NORONHA, 2002).

Existe escassez de informação que permita o estabelecimento de correlação entre as características da matéria-prima, os parâmetros do processo de torração e a qualidade final do produto (BORGES; JORGE; NORONHA, 2002). A única terminologia universal usada entre os torrefadores de café são os termos subjetivos: "baixa", "média" e "elevada" ou, por vezes, "ligeira", "média" e "escura". Os graus de torração são avaliados pela sua cor externa, sabor e aroma dos grãos.

Assim como a torração, a moagem é fundamental para a obtenção da bebida, se grande quantidade de calor é gerada, ocorre perda de voláteis imprescindíveis na composição do aroma e outros produtos, influenciando a qualidade do produto final. A granulometria do café é definida industrialmente como grossa, média e fina, seguindo as recomendações dos fabricantes de moinhos. Na prática, o método de filtração ou extração é que irá definir as características da moagem do pó de café.

Cada método de preparo da bebida exige uma moagem e granulometria específica que irão garantir a máxima expressão dos atributos do café. A moagem ideal para cada método de preparação vai depender do equipamento ou utensílio e o tempo que cada café fica em contato com a água e a sua temperatura da mesma (NASCIMENTO, 2006).

O tempo de preparo do café é diretamente influenciado pela moagem. A extratividade e a velocidade de fluxo durante o preparo da bebida dependem do tamanho médio das partículas produzidas no processo. A granulometria é relevante para a extração de sólidos totais, relacionando-se com a composição química e definindo de forma direta o rendimento do produto (MORAES; TRUGO, 2001).

Para o preparo da bebida, adiciona-se água quente ao café torrado e moído, processo chamado de infusão, e pode ocorrer por filtração, percolação, prensagem ou pressão, sendo que cada um produz tipos de bebidas distintas. O método mais utilizado no Brasil é o de filtração, onde o pó é acondicionado em um filtro, de papel ou de pano, com adição de água quente não fervente, por cima, sendo recomendada uma razão de 10g de pó de café para 100 mL de água a 90° C (ABIC, 2007).

2.5 Radicais livres e espécies reativas

Os radicais livres são moléculas que possuem um elétron desemparelhado, isso os torna instáveis e muito reativos podendo combinar-se inespecificamente com diversas moléculas da estrutura celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os sistemas biológicos possuem várias fontes geradoras de radicais livres, os quais podem ser formados endogenamente (subprodutos do metabolismo aeróbico) ou por influências externas como dieta inadequada, elevado consumo de álcool, fumo, exposição às radiações ionizante e eletromagnética, poluição atmosférica, etc. (DRÖGE, 2002; HALLIWELL, 1994).

O termo espécies reativas de oxigênio (ERO) inclui os radicais formados pela redução do oxigênio superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila (OH^{\bullet}) e também alguns

não radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2). Além das espécies reativas de oxigênio, ainda existem as espécies reativas de nitrogênio (ERN), que são representadas principalmente pelo óxido nítrico (NO^\bullet) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (Tabela 1) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Tabela 1 Espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERN)

	Radicais	Não radicais
ERO	Superóxido, $O_2^{\bullet-}$ Hidroxi-la, OH^\bullet Peroxila, RO_2 Hidroperoxila, HO_2^\bullet	Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 Oxigênio Singlete, 1O_2 Ácido hipocloroso, $HOCl$ Peroxinitrito, $ONOO^-$ Ozônio, O_3
ERN	Óxido nítrico, NO^\bullet Dióxido de nitrogênio, NO_2^\bullet	Ácido nitroso, HNO_2 Peroxinitrito, $ONOO^-$ Peroxinitrato, O_2NOO^-

Fonte: Halliwell e Gutteridge (2007)

O radical superóxido é formado no organismo, principalmente através da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou por ação de células fagocitárias durante o processo de defesa. Este radical é fracamente reativo. O radical de oxigênio mais reativo é o radical hidroxila (OH^\bullet), que no momento que é formado reage de forma rápida e inespecífica, podendo lesar qualquer biomolécula.

O radical hidroxila é formado pela reação entre o radical superóxido e o H_2O_2 ou pela reação entre o H_2O_2 e metais de transição como o ferro (Reação de Fenton). O H_2O_2 é formado em praticamente todos os tecidos do organismo e apesar de fracamente reativo sua importância está relacionada à sua capacidade de formar o radical hidroxila (HALLIWELL, 1996, 2001).

O óxido nítrico é um radical pouco reativo que apresenta grande importância biológica atuando na vasorregulação e neurotransmissão, porém em excesso pode ser citotóxico. A reação entre os radicais óxido nítrico e superóxido leva a formação de peroxinitrito, a qual apresenta maior reatividade podendo oxidar lipídios, DNA e aminoácidos (HALLIWELL, 1996, 2001).

As ERO e as ERN, em baixos níveis, são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, entretanto, uma produção excessiva dessas espécies ou uma deficiência na sua remoção podem gerar um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares como proteínas, lipídios e DNA. Os radicais livres podem promover a lipoperoxidação, causar a oxidação de proteínas levando a sua inativação e podem também reagir com DNA e RNA causando mutações ou distúrbios de transcrição (HALLIWELL, 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2.6 Defesas antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias endógenas ou exógenas que reduzem a formação de radicais livres ou reagem promovendo sua inativação. Para evitar o dano celular que pode ser causado pela presença de radicais livres, o organismo possui defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. As defesas antioxidantes controlam os níveis de espécies reativas, permitindo que estas desempenhem seu papel dentro do metabolismo normal (HALLIWELL, 2001; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O organismo sintetiza uma série de compostos não enzimáticos que apresentam grande capacidade de defesa antioxidante, atuando para manter o equilíbrio celular. Dentre esses compostos podemos citar a bilirrubina, a melatonina, o ácido lipoico, a coenzima Q, o ácido úrico, a glutatona e os estrógenos. Esses antioxidantes atuam de diferentes maneiras combatendo

diretamente os radicais livres ou indiretamente, ligando íons como ferro e cobre, tornando-os menos reativos ou mesmo estimulando a produção de outras defesas antioxidantes.

Além dos antioxidantes sintetizados endogenamente, alguns importantes antioxidantes são obtidos através da dieta, incluindo as vitaminas A, C e E, e polifenóis. Os antioxidantes enzimáticos também são importantes na detoxificação celular dos radicais livres. Dentre os antioxidantes enzimáticos destacam-se as enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPx) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

2.6.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A superóxido dismutase, nas mitocôndrias, se encontra ligada ao magnésio em seu sítio ativo (MnSOD); no citosol celular, possui cobre e zinco em seu sítio ativo (CuZnSOD) (HALLIWELL, 1996; QIN et al., 2008).

A superóxido dismutase transforma o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, conforme a reação a seguir:

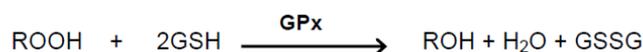


A SOD remove o oxigênio singlete, assim como o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), prevenindo a formação de OH^\bullet e constituindo-se numa barreira essencial contra a potencial toxicidade do oxigênio (WANG et al., 2005).

Foi realizado um estudo, onde ratos foram submetidos à nefrectomia subtotal, alimentados com dieta deficiente em vitamina E. Observou-se um aumento da superóxido dismutase eritrocitária, provavelmente representando um mecanismo de defesa contra maior produção de ERO (CORDEIRO, 1996).

2.6.2 Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx é uma selenoenzima localizada primariamente no citosol e na matriz mitocondrial. É reconhecida como o principal sistema protetor contra a peroxidação lipídica induzida endógena e exogenamente. Catalisa a redução de hidroperóxido e de peróxido de hidrogênio à custa de glutathione (GSH), ou seja, pode ser responsável pela captação de água, catalisando a peroxidação da GSH, resultando como produto a glutathione na forma dissulfeto oxidada (GSSG) (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999; WANG et al., 2005).



Ou



2.7 Estresse oxidativo

Normalmente, nos organismos saudáveis existe um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes. As defesas antioxidantes controlam os níveis de espécies reativas, permitindo que estas desempenhem seu papel dentro do metabolismo normal. No entanto, situações patológicas podem causar o rompimento desse equilíbrio, seja através da diminuição das defesas antioxidantes, seja pelo aumento na produção de espécies reativas ou mesmo da combinação de ambos, resultando no que chamamos de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O termo estresse oxidativo se refere ao desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e as espécies reativas formadas (pró-oxidante), em favor destas,

podendo resultar em dano oxidativo a componentes celulares. O estado pró-oxidante gerado por esse desequilíbrio favorece a ocorrência de lesões oxidativas em biomoléculas como lipídios, DNA e proteínas. As consequências do estresse oxidativo incluem a lipoperoxidação na membrana celular, a oxidação de proteínas, lesões ao DNA e RNA e a morte celular, dependendo do tipo celular e da severidade do estresse oxidativo (HALLIWELL, 2001; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, depressão do sistema imune, artrite reumática, doenças inflamatórias, diabetes, disfunção cerebral (MANCINI FILHO et al., 2002). Assim, o interesse nos compostos antioxidantes naturais e sintéticos que poderiam retardar o desenvolvimento dessas doenças tem aumentado, consideravelmente, na comunidade científica nas últimas décadas (ZHAN et al., 2008).

Há fortes evidências de que o estresse oxidativo tem importância capital nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular. Por outro lado, é também fato reconhecido que ERO e ERN desempenham papéis fisiológicos importantes como o controle da pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose, na fagocitose de agentes patogênicos, na fertilização de ovos e no amadurecimento de frutos. O reconhecimento dessa relação estimulou o desenvolvimento de estudos de marcadores de dano oxidativo e de substâncias antioxidantes em sistemas biológicos (VASCONCELOS et al., 2007).

2.8 Peroxidação lipídica e biomarcadores

A importância do dano oxidativo causado por ERO e ERN em lipídios é motivo de discussões na busca do melhor marcador em fluidos biológicos, uma

vez que produtos numerosos e complexos derivam da peroxidação lipídica. Eles são classificados em primários (os hidroperóxidos lipídicos) e secundários, que derivam da β -ruptura dos hidroperóxidos lipídicos (VASCONCELOS et al., 2007).

O dialdeído malônico (MDA) é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da β -ruptura de endociclicização de ácidos graxos polinsaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoleico, araquidônico e docosaexanoico (VASCONCELOS et al., 2007).

O MDA é considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral de dano oxidativo em plasma e foi o foco de atenção da peroxidação lipídica durante muitos anos, pelo fato de poder ser medido livre, utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (TBA). O MDA reage com TBA e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em comprimento de onda de 532 nm e fluorescência em 553 nm (Figura 2). Considerando-se que o teste não é específico para MDA, pois outros aldeídos participam da mesma reação, a técnica utilizando *HPLC* com detecção no UV, revela-se mais específica (VASCONCELOS et al., 2007).

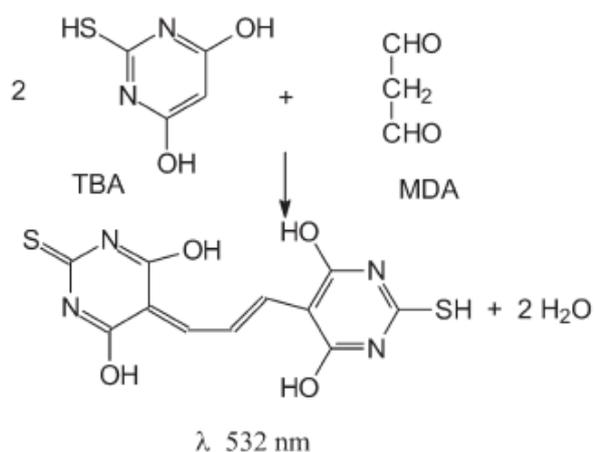


Figura 2 Reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o dialdeído malônico (MDA) que forma um cromógeno que absorve a 532nm.

2.9 Cafeína e saúde

Os estudos de cafeína e saúde foram iniciados na década de 70, quando estudos em animais indicaram que a cafeína estaria relacionada a uma diminuição no crescimento, na redução do peso ao nascer e anormalidades esqueléticas (DLUGOSZ; BRACKEN, 1992). Além disso, dada a similaridade química entre a cafeína e componentes do ácido desoxirribonucleico (DNA), investigadores têm se interessado pelo potencial mutagênico da cafeína (CHRISTIAN; BRENT, 2001). A possível incorporação de cafeína no material genético pode alterar as instruções de replicação celular, diminuindo a fase G2 da mitose e, conseqüentemente, o tempo para reparo do dano no cromossomo, aumentando, dessa maneira, o percentual de células mortas (DLUGOSZ et al., 1996).

Brown et al. (2001) mostraram que medir o consumo de café ao invés do consumo da cafeína, por exemplo, pode contribuir para a falta de achados positivos nos estudos de café como um fator de risco quando a cafeína é a exposição de interesse. Além disso, um trabalho experimental recente mostrou que o efeito do consumo de café sobre o metabolismo da glicose não é semelhante ao de cafeína isolada. A cafeína tem efeito de aumentar a intolerância à glicose, e o café não tem esse efeito. O café descafeinado tem efeito ainda mais pronunciado de melhorar a tolerância à glicose. Este trabalho tem grande relevância, pois se testou em protocolo duplo-cego e randomizado o efeito do consumo de cápsulas de cafeína, café integral, café descafeinado e placebo (dextrose) e mostraram de forma inequívoca o erro perpetuado de assumir como semelhante o consumo de café e cafeína (VAN-DAM, 2006).

Na verdade, o consumo de cafeína (substância) tem o efeito de favorecer a intolerância à glicose, e consumo regular e crônico de café, especialmente o descafeinado, tem efeito de melhorar a tolerância à glicose e, conseqüentemente, proteger os consumidores habituais contra o diabetes tipo 2 (BATTRAM, 2006).

Fortier, Marcoux e Beaulac-Baillargeon (1993) não constataram associação do café descafeinado com restrição de crescimento intrauterino, ao contrário do café integral. Eskenazi et al. (1999) mostraram que o consumo de café integral foi associado com diminuição da gestação e do peso ao nascer, e que o uso de café descafeinado durante a gravidez não mostrou associação com esses dois desenlaces. A utilização de café descafeinado nessa população se ocorrer, é mínima Camargo, Toledo e Farah (1998), avaliando a quantidade de cafeína nos diferentes tipos de café normalmente consumidos pela população brasileira, observaram que houve uma grande variabilidade existente com relação ao teor deste alcaloide, devido à quantidade de pó utilizada, ao tipo de café e a forma de preparo do mesmo.

A eficácia da cafeína no alívio das dores de cabeça induzidas pela sua privação (que leva à vasodilatação cerebral) reflete as suas propriedades vasoconstritoras a nível central (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

Além de exercer efeito sobre o sistema nervoso central, a cafeína é outro constituinte do café com atividade antioxidante e mostra efetiva inibição da peroxidação lipídica *in vitro* induzida por espécies reativas de oxigênio em microsomas de fígado de rato, sendo seu potencial antioxidante semelhante ao da glutathione e superior ao do ácido ascórbico (DEVASAGAYAM et al., 1996).

A teratogenicidade da cafeína tem sido demonstrada em várias investigações com modelos animais. Contudo, são necessárias doses elevadas para que este efeito se manifeste. No que diz respeito aos humanos, a ingestão de café ou cafeína durante a gestação não parece ser prejudicial, especialmente se em quantidades moderadas. Contudo, a cafeína pode potenciar o efeito teratogênico de outras substâncias, tais como o tabaco e o álcool (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

Devido ao consumo cotidiano de chás, café e chocolate, existe preocupação com os níveis de ingestão de cafeína presentes nessas bebidas. Além disso, a cafeína também está presente em medicamentos e em diversas bebidas, o que pode contribuir para aumentar o consumo. Assim, atenção deve ser dada aos potenciais efeitos adversos do consumo excessivo de cafeína. Por outro aspecto, não existe um marcador biológico que possa discriminar o consumo de cafeína de uma fonte específica como, por exemplo, o café (DOREA; COSTA, 2005).

Sholonsky e Klatsky (2003) traçaram o perfil dos consumidores de café descafeinado e os dados revelaram que as pessoas consomem café descafeinado, porque já possuem alguma doença, principalmente cardiovascular, ou porque optaram por um estilo de vida mais saudável. Foi verificado nesse estudo que a

relação dos consumidores de café descafeinado com o tabagismo e bebidas alcoólicas é baixa.

Foi demonstrado que a concentração de cafeína em uma xícara de café varia de acordo com os diferentes tipos de preparo da bebida. O hábito de ferver o pó junto com a água aumenta o teor de cafeína, para a mesma quantidade de café consumida (BELL; WETZEL; GRAND, 1996). O consumo moderado de café normalmente é descrito como a ingestão de 3 a 5 doses diárias de café (aproximadamente 150-300 mg de cafeína/dia). Os efeitos comportamentais mais notáveis ocorrem após a ingestão de doses baixas a moderadas (50-300 mg) deste composto, verificando-se uma melhoria na performance cognitiva e psicomotora do consumidor, tais como, melhoria do estado de alerta, da energia, da capacidade de concentração, do desempenho em tarefas simples, da vigilância auditiva, do tempo de retenção visual e diminuição da sonolência e do cansaço (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

O café arábica é mais valorizado e apresenta cerca da metade de cafeína que o café robusta, portanto, a descafeinação do café robusta apresenta-se valiosa, tanto na valorização do café como na obtenção da cafeína (SALDANA; MAZZAFERA; MOHAMED, 1997).

2.10 Café como alimento funcional

O amplo consumo de café no mundo tem estimulado pesquisas para o estudo da atividade do café cru e, especialmente, do café torrado, usado para preparar os diferentes tipos de bebida, sobre as oxidações biológicas (SOMOZA et al., 2003).

O café é uma bebida consumida e apreciada mundialmente. Esse largo espectro de consumo suscita amplo interesse, particularmente, o nutricional. Novas perspectivas para o café advêm da recente inclusão dessa bebida no rol de

alimentos funcionais. Em revisão, publicada em periódicos importantes na área de nutrição, os autores responderam positivamente à pergunta, se o café é um alimento funcional. Nesses artigos, destacam-se os principais aspectos recentemente publicados sobre o papel do café na saúde humana e são expostos resultados que apontam o equívoco de interpretar o consumo de café (alimento) como semelhante ao de cafeína (substância pura) (DOREA; COSTA, 2005; ESQUIVEL; JIMENEZ, 2011).

Na verdade, a inclusão e o estudo de compostos bioativos ou mesmo inertes, mas com função fisiológica, estão no contexto mais amplo de redução de risco de doenças degenerativas e manutenção da saúde por meio da alimentação. Diante disso foi implementado o conceito de alimento funcional, que já era empiricamente descrito. O conceito de alimento funcional ainda não é consensual, mas está ligado à capacidade de o alimento consumido regularmente atuar na prevenção de doenças e melhorar a capacidade física e mental dos indivíduos (DOREA; COSTA, 2005; VERSCHUREN, 2002).

Durante muito tempo, o café foi negligenciado como alimento, mas, a depender da quantidade consumida, pode fornecer quantidades importantes de magnésio, cromo, manganês e niacina, também chamada de ácido nicotínico. A niacina presente no café é formada pela desmetilação da trigonelina durante o processo de torração. O grão verde do café não tem a niacina que está presente no café torrado e no instantâneo. A niacina ou ácido nicotínico presente no café tem mais biodisponibilidade que a niacina em forma ligada, presente em outras fontes alimentares (TRUGO, 2003).

O ácido nicotínico (ácido piridino-3-carboxílico) é um dos fármacos mais antigos utilizados no tratamento das dislipidemias, seus efeitos hipolipidêmicos exigem doses mais altas do que aquelas necessárias para seus efeitos de vitamina. A niacina reduz os triacilgliceróis, tão efetivamente quanto

os fibratos e estatinas mais potentes e reduz os níveis de *LDL-c* (MAHLEY; BERSOT, 2006).

Robinson Junior et al. (1996) demonstraram que o ácido 3,5-dicafeoilquínico é um potente inibidor da integrase do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), uma enzima requerida para a infecção das células. O ácido 5-cafeoilquínico, o ácido cafeico e toda família destes ácidos mostraram-se potentes antioxidantes em eritrócitos humanos (LEKSE et al., 2001).

Outros alimentos também fornecem compostos fenólicos como o chocolate e os chás (MANACH et al., 2004; TRUGO, 2003).

No entanto, o café é o único que sofre torração a qual permite que altas temperaturas destruam alguns dos compostos fenólicos e favoreçam o desenvolvimento de outras substâncias antioxidantes. O desenvolvimento de substâncias antioxidantes durante a torração se dá por meio dos produtos da reação de Maillard, e a estocagem dos grãos torrados, bem como as condições de torração, pode modificar os teores dessas substâncias na bebida (NICOLI et al., 1997).

Richelle, Tavazzi e Offord (2001) demonstraram que o café robusta cru apresentou atividade antioxidante duas vezes maior que o café arábica cru, provavelmente devido à maior concentração de ácido clorogênico; porém, após a torração, esta diferença não foi significativa. Entretanto, em outro estudo foi demonstrada diferença significativa na atividade antioxidante entre as duas espécies após torração (DAGLIA et al., 2004). A atividade antioxidante do café foi dose-dependente e não foi afetada pela adição de leite (RICHELLE; TAVAZZI; OFFORD, 2001).

Ito et al. (2005) mostraram que, após a ingestão de café dentre outros alimentos ricos em polifenóis testados, os consumidores de café apresentaram as maiores concentrações urinárias de ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido cumárico quando comparado com os níveis iniciais. Além disso, o café

apresentou a maior concentração de ácido clorogênico dentre todas as outras fontes avaliadas. O efeito antioxidante do café tem sido mostrado na redução de suscetibilidade à oxidação de partículas de *LDL-c* (YUKAWA et al., 2004).

Pesquisadores brasileiros revelaram o efeito antioxidante dos ácidos clorogênicos, que não foram influenciados pelo conteúdo de cafeína, presentes no café instantâneo e nas variedades robusta e arábica (MOREIRA et al., 2005). Os relatos sobre associação do consumo de café e risco de câncer também são escassos e ainda contraditórios (PORTA et al., 2003; VATTEN; SOLVOLL; LOKEN, 1990).

No caso de efeitos do café sobre o trato gastrointestinal, a função hepática e o sistema biliar estão mais bem descritos. O efeito do café sobre esses órgãos pode ser direto ou indireto, pela liberação de hormônios gastrintestinais. Apenas o café parece atuar na proteção hepática e pancreática em consumidores de álcool. Existem diferenças em razão da presença da cafeína na secreção de gastrina. Comparados aos descafeinados, os cafeinados moídos e instantâneos são os maiores estimulantes (DEVENTER et al., 1992).

Existem estudos que mostram associação inversa do consumo de café e risco de suicídios; também, efeito positivo do consumo de café na velocidade de codificação e processamento mental de novas informações, que favorecem esse tipo de resposta em pessoas idosas (JOHNSON-KOZLOW et al., 2002; KAWACHI et al., 1996).

O café cafeinado está associado com menor incidência da doença de Parkinson em vários grupos populacionais (ASCHERIO et al., 2001; RAGONESE et al., 2003) e da doença de Alzheimer (HEUSER, 2003; LINDSAY et al., 2002).

Yamato et al. (2002) verificaram que o café contribuiu para a redução do estresse oxidativo induzido em cérebro de ratos e esse efeito pode estar relacionado à cafeína, mas não ao ácido clorogênico.

Devido ao consumo cotidiano de chás, café e chocolate, existe preocupação com os níveis de ingestão de cafeína presentes nessas bebidas. Além disso, a cafeína também está presente em medicamentos e em diversas bebidas, o que pode contribuir para aumentar o consumo. Assim, atenção deve ser dada aos potenciais efeitos adversos do consumo excessivo de cafeína. Por outro aspecto, não existe um marcador biológico que possa discriminar o consumo de cafeína de uma fonte específica como, por exemplo, o café (DOREA; COSTA, 2005).

Utilizando padrões, Daglia et al. (2004) avaliaram o poder de sequestro de radicais OH \cdot de alguns compostos presentes no café, como trigonelina e ácido nicotínico. A trigonelina na concentração 3,0 mM inibiu a degradação de deoxirribose em 19,3 % *in vitro* e 15,7% em condições *ex vivo*. O ácido nicotínico na concentração 0,15mM teve a mesma eficiência nas condições *in vitro* e 23,2% nos ensaios *ex vivo*.

2.11 Aterosclerose e hiperlipidemia

A aterosclerose é uma doença multifatorial, lenta e progressiva, resultante de uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas (HACKAM; ANAND, 2003). Está associada a anormalidades lipídicas, ativação plaquetária, trombose, inflamação, disfunção endotelial, estresse oxidativo e alterações metabólicas da matriz, entre outros distúrbios (SIGNORI et al., 2007). O acúmulo de lipídeos, células inflamatórias e elementos fibrosos, que se depositam na parede das artérias, são os responsáveis pela formação de placas ou estrias gordurosas, e que geralmente ocasionam a obstrução das mesmas (LIBBY, 2002).

Concentrações elevadas de *LDL-c* plasmáticas podem aumentar a velocidade de sua adesão na parede arterial, na qual ocorrem os processos de

oxidação por agentes, tais como ânion superóxido, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio, modificando-se em *LDL-c* oxidada (KÁDÁR; GLASZ, 2001).

A deposição da *LDL-c* oxidada na camada íntima arterial pode provocar citotoxicidade no endotélio vascular, assim como inibição da saída de *LDL-c*, o que leva ao seu acúmulo na parede do vaso. Em sequência as *LDL-c* oxidadas são captadas por macrófagos, tornando-se “células espumosas”, armazenando-se na camada íntima, liberando agentes quimiotáticos, capazes de aumentar o recrutamento das *LDL-c* plasmáticas e fatores de crescimento, causando a migração e proliferação das células musculares lisas, produzindo grande quantidade de colágeno, elastina e proteoglicanos. Como resultado ocorre a formação da placa ateromatosa.

Os danos desenvolvidos pelas artérias podem sofrer complicações, de modo que calcificações e ulcerações na superfície do endotélio em contato com o sangue podem levar à ruptura da superfície da placa. Como consequência terá o desenvolvimento de hemorragia ou hematoma, terminado por causar microembolia e trombose que podem fechar a artéria e, em casos severos a aterosclerose enfraquece de tal maneira os vasos que provoca dilatação arterial ou aneurisma (FRANÇOSO; COATES, 2002).

O endotélio está diretamente relacionado à gênese da aterosclerose. Devido à sua localização anatômica estratégica, entre o sangue e os tecidos, as células endoteliais têm a capacidade de perceber as alterações das forças hemodinâmicas e a ação de mediadores químicos produzidos no local e/ou circulantes no sangue, bem como responder a estas alterações com fatores biologicamente ativos. O fenótipo das células endoteliais pode ser alterado por vários fatores, sem necessariamente provocar a lesão endotelial, desencadeando uma série de eventos que, ao longo do tempo, podem culminar com as alterações estruturais na parede arterial levando à formação da placa aterosclerótica (BURDGE; CALDER, 2005).

A disfunção endotelial se caracteriza pelo desequilíbrio na produção e/ou na sensibilidade dos fatores derivados do endotélio, prevalecendo na aterosclerose a ação dos fatores constritores pró-aterogênicos em detrimento dos fatores de relaxamento derivados do endotélio antitrombóticos e antimitogênicos (BONETTI; LERMAN; LERMAN, 2003). Os fatores de relaxamento derivados do endotélio são o NO[•], prostaciclina (PGI₂) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Estímulos como o *shear stress* (estresse de cisalhamento) e/ou excitação por agonistas (por exemplo, acetilcolina) determinam liberação de NO[•] e PGI₂ pelo endotélio. Esses mediadores ativam a guanilato ciclase (GMP) e adenilato ciclase (AMP) respectivamente, resultando em uma diminuição dos níveis intracelulares de cálcio (Ca²⁺) nas células da musculatura lisa vascular, promovendo assim o relaxamento dos vasos sanguíneos (BACHSCHMID; SCHILDKNECHT; ULLRICH, 2005). Neste sentido, existe ainda o ácido epoxieicosatrienoico (EETs), o qual promove a abertura dos canais de Ca²⁺-dependentes do K⁺ (canais K⁺ Ca) e ativa a Na⁺-K⁺-ATPase, estimulando a hiperpolarização das células da musculatura lisa vascular a partir do endotélio (FLEMING, 2004). O EDHF é suprimido quando NO[•] e PGI₂ são liberados pelo endotélio (MATOBA; SHIMOKAWA, 2003).

Em oposição funcional aos fatores de relaxamento, existem os fatores constritores derivados do endotélio, representados pela angiotensina II (Ang II), endotelina (ET1), serotonina (5-HT) tromboxano A₂ (TxA₂) e as demais isoformas das prostaglandinas H₂ (PGH₂), que possuem um papel fundamental nas respostas inflamatórias agudas e crônicas, devido às suas ações pró-ateroscleróticas e pró-trombóticas (BONETTI; LERMAN; LERMAN, 2003).

O óxido nítrico é o principal fator responsável pelo relaxamento. Dependendo da sua concentração, ele pode ativar ou inibir a formação dos demais fatores que atuam no endotélio e, conseqüentemente, nas células musculares lisas vasculares. Suas funções antiateroscleróticas incluem: inibição

da adesão e migração dos leucócitos, impedimento da agregação plaquetária, redução da permeabilidade endotelial às macromoléculas lipoproteicas, impedimento do acúmulo subendotelial de *LDL-c* e a sua oxidação, prevenção da formação das células espumosas (*foam cells*), impedimento da proliferação e migração das células musculares lisas vasculares e, ainda, contribuição na vasodilatação dos vasos coronarianos durante o aumento de demandas metabólicas (HONING et al., 1999).

A geração de O_2 (superóxido) diminui a biodisponibilidade do óxido nítrico livre, enquanto conduz à formação aumentada de $ONOO^-$. O O_2 capta efetivamente o NO^\bullet , formando o peroxinitrito ($ONOO^-$), que é responsável pela ativação da via ciclooxigenase, ligando os prostanoídes à via NO^\bullet pela sinalização redox. A ativação da ciclooxigenase (COX) requer concentrações diferentes de $ONOO^-$ para ativar as isoformas desta enzima (COX-1: $21\sim\mu M$; COX-2: $2\sim\mu M$). Salienta-se que a COX-2 é fator crítico na propagação da resposta inflamatória pela vasodilatação, já a COX-1, pela vasoconstrição, favorece o isolamento da área, agregação plaquetária e a coagulação sanguínea. Esse mecanismo das ações das COX sobre a contração muscular é chamado de “tônus das peroxidases”, onde primeiramente é ativada a COX-2 e, após uma concentração intracelular 10 vezes maior dos peróxidos, é ativada a COX-1 (SIGNORI et al., 2007).

O aumento das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis e a diminuição do *HDL-c*, característicos da resposta a uma sobrecarga lipídica oral, são fenômenos diretamente relacionados à expressão e à produção da prostaciclina. Portanto, a ciclooxigenase já está envolvida na disfunção endotelial pós-prandial em indivíduos normais (SIGNORI et al., 2007).

2.12 Café e perfil lipídico

A redução do colesterol dietético diminui o circulante, bem como os níveis de *LDL*, por isso, a dieta, dependendo da sua composição, pode representar fator de risco para doenças cardiovasculares, ou ter uma função protetora sobre elas. Estudos demonstraram relação inversa entre o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos e a mortalidade por doença arterial coronariana, decorrência de sua ação na inibição da oxidação da *LDL* e na redução da agregação plaquetária (RIBEIRO; SHINTAKU, 2004).

Em países escandinavos, foi demonstrada correlação positiva entre a ingestão de café e concentrações de colesterol no plasma, os diterpenos cafestol e kahweol são os responsáveis pela elevação do colesterol sérico, por isso, é recomendado aos pacientes com níveis aumentados de colesterol o consumo dessa bebida somente filtrada, pois grande parte dessas substâncias é retida no papel de filtro (RIBEIRO; SHINTAKU, 2004).

O cafestol está presente em todas as espécies de café, embora o café arábica contenha maiores concentrações que o robusta (ROOS et al., 1997). Pesquisas têm relacionado a influência do modo de preparo da bebida ao conteúdo de kawool e cafestol; além disso, sabe-se que estes diterpenos são retidos pelo papel de filtro. A bebida de café fervido, não filtrado (tipo turco), aumenta o nível de colesterol (RIBEIRO; SHINTAKU, 2004), entretanto, a relação de outros tipos de preparo da bebida de café com o nível sérico de lipídeos e lipoproteínas não está completamente esclarecida (MIYAKE, 1999). Como revisado por estes autores, um copo de café instantâneo por dia foi associado com um aumento significativo de colesterol total em mulheres.

Burr et al. (1995) demonstraram um aumento significativo no nível de colesterol total e apolipoproteína B após a ingestão de café instantâneo.

Ito et al. (1998) não encontraram aumento de colesterol total e triacilgliceróis em humanos que receberam a bebida de café filtrado. A ingestão de café filtrado (NATELLA et al., 2002) não induziu alteração do nível de colesterol. Para acentuar a controvérsia, Yukawa et al. (2004) revelaram redução no colesterol total e *LDL-c* em estudantes japoneses, após a ingestão de altas doses de café (450mL/dia), contudo não houve alterações significativas de triacilgliceróis e *HDL-c*.

A cafeína está relacionada ao aumento na oxidação das gorduras e redução na oxidação de carboidratos (CHO). Acredita-se que a cafeína gera um aumento na mobilização dos ácidos graxos livres dos tecidos e/ou nos estoques intramusculares, aumentando a oxidação da gordura muscular e reduzindo a oxidação de CHO (SINCLAIR; GEIGER, 2000).

Diversos estudos em humanos verificaram também um aumento da lipólise após a ingestão de cafeína ou café e não se observou um aumento significativo da lipólise após a ingestão de descafeinado. Adicionalmente, alguns estudos mostram que o efeito termogênico e lipolítico da cafeína é mais pronunciado em indivíduos não obesos do que em obesos (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). O consumo de café e a realização de exercícios tiveram efeito lipolítico maior que o exercício isolado (MOUGIOS et al., 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima e instalações

As amostras de café (*Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre), plantadas no Brasil) integral e descafeinado foram gentilmente cedidas pela empresa COCAM (Catanduva-SP, Brasil). Para execução deste projeto, foram utilizadas as instalações do Departamento de Medicina Veterinária, Departamento de Ciência dos Alimentos, Polo de Tecnologia em Qualidade do Café da Universidade Federal de Lavras (UFLA-MG), Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), Laboratório de Bromatologia e Hidrologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP-Portugal) e o Laboratório E201 do LEPAE da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP-Portugal).

3.2 Preparo das amostras

As amostras de café foram analisadas antes e após o processo de descafeinação com diclorometano. As amostras (500 g) foram torradas (torrador modelo Probatino - Leogap, Brasil) com capacidade para 1 kg, no grau de torração médio utilizado para consumo. Em seguida, os grãos torrados foram moídos (moinho elétrico Pinhalense, ML-1, Brasil) em granulometria de 20 mesh, empacotados em embalagens de polietileno/alumínio, selados e armazenados a -20 °C até o uso. Os grãos crus foram moídos em moinho IKA A11 com auxílio de nitrogênio líquido.

3.3 Caracterização das amostras

A caracterização dos grãos de café crus e torrados foi realizada através das seguintes análises: cor, densidade aparente, umidade, sólidos solúveis, acidez titulável, pH, açúcares totais e redutores e extrato etéreo.

3.3.1 Análise de cor

A tonalidade da cor final dos grãos foi determinada de forma visual e por meio de um colorímetro (Chomameter-2 Reflectance, Minolta, Osaka, Japan) acoplado a um processador de dados (OP-300). O instrumento foi padronizado contra um branco antes de cada leitura. A cor foi expressa em parâmetros da escala desenvolvida pela *Commission Internationale d'Éclairage* (CIE) L^* , a^* , b^* . Foram realizadas três leituras de cada repetição, sendo utilizadas três repetições para cada amostra.

3.3.2 Densidade aparente

A densidade aparente das amostras foi determinada pela relação entre a massa da amostra (g) e o volume ocupado pela amostra (mL) em uma proveta. Cada amostra (100g) foi introduzida em uma proveta de 1000mL, sendo a proveta submetida a leves batidas laterais até que não fossem observadas variações no volume. A densidade aparente foi calculada pela equação: $d=m/v$, onde m =massa da amostra e v = volume ocupado na proveta pela amostra (NAMANE et al., 2005).

3.3.3 Umidade

Para análise da umidade dos grãos foi utilizada a técnica gravimétrica com emprego de calor, baseando-se na determinação da perda de peso do produto submetido ao aquecimento em estufa (105°C) até peso constante e expresso em porcentagem (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS - AOAC, 2000).

3.3.4 Sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis nas bebidas de café foi determinado pelo método de extrato aquoso de acordo com Trugo e Moraes (2001). Uma alíquota de 1 mL de cada extrato foi transferida quantitativamente para pesa-filtros, previamente secos em estufa a 105°C e secos com amostras até peso constante. A massa de cada extrato de café foi determinada em balança analítica, e a porcentagem de sólidos calculada por diferença entre a massa do extrato e a massa do resíduo, seco até peso constante.

3.3.5 Acidez titulável

A acidez foi determinada por titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N FC 0,98, tendo como indicador fenolftaleína (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

3.3.6 pH

As medidas de pH foram feitas por potenciometria em eletrodo de vidro a partir do mesmo extrato da acidez titulável, utilizando-se peagâmetro marca DIGIMED- DMPH-2, segundo AOAC (2000).

3.3.7 Açúcares totais e redutores

Os açúcares totais e redutores foram extraídos pelo método de Lane-Ennyon, descrito pela AOAC (2000), e determinados pela técnica de Somogy. Os açúcares não redutores foram obtidos pela diferença entre os totais e os redutores. Os valores foram expressos em porcentagem

3.3.8 Extrato etéreo

O extrato etéreo foi determinado pelo o método de extração continua em aparelho de “*Soxhlet*”, utilizando-se como solvente o éter de petróleo. O processo é gravimétrico e está baseado na perda de peso do material submetido à extração com éter, ou na quantidade de material solubilizada pelo solvente. O éter usado no processo é aquecido até tornar-se volátil e, ao condensar-se, circula sobre a amostra em análise, arrastando toda a fração gordurosa e demais substâncias solúveis em éter. Este é recuperado em outro recipiente, enquanto a gordura extraída é calculada por diferença de pesagem (AOAC, 2000).

3.4 Determinação de compostos bioativos nas bebidas de café

As bebidas de café foram preparadas para a determinação dos seguintes compostos bioativos: fenólicos totais, trigonelina, niacina, 5-HMF, furfural, ácidos clorogênicos, cafeína, tocoferóis, diterpenos e ácidos graxos.

3.4.1 Preparo da bebida

A bebida foi preparada de acordo com o método de Nicoli et al. (1997), com modificações. Foram adicionados 10g de café em pó em filtro de papel comercial nº 103 e, em seguida, foram vertidos 100 mL de água deionizada, a 90°C, sobre o pó contido no filtro. A bebida foi liofilizada para a realização das análises químicas. Para o ensaio biológico a bebida foi preparada sempre no momento da administração aos animais.

3.4.2 Determinação dos fenólicos totais

A concentração de fenólicos totais das bebidas de café foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu, com modificações (LIMA et al., 2010). Em um balão volumétrico de 25 mL foram adicionados 5 mL da bebida de café e o volume do balão completado com água destilada. Dessa solução fez-se uma diluição de 1:10. Dessa solução diluída foi retirada uma alíquota de 0,5mL, que foi transferida para um tubo de ensaio junto a 2,5mL de Folin-Ciocalteu 10%(v/v) e 2 mL de solução de carbonato de sódio 4% (m/v). Os tubos foram mantidos no escuro a temperatura ambiente por 2h. Decorrido o tempo a absorbância foi determinada a 750 nm. Da mesma forma foi feita a curva de calibração com ácido gálico e concentração de fenólicos totais nas bebidas de

café foi calculada por interpolação das absorvâncias das amostras contra a curva de calibração.

3.4.3 Determinação dos teores de trigonelina, niacina, 5-hidroximetilfurfural, furfural, ácidos clorogênicos e cafeína

As bebidas de café liofilizadas foram ressuspendidas com água e passaram por uma limpeza com Carrez I e II para eliminar componentes poliméricos. Utilizou-se 3mL da solução de café, 0,1mL de Carrez I, 0,1mL de Carrez II e 0,8 mL de metanol. A mistura foi agitada, centrifugada a 500rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi injetado no cromatógrafo (FUJIOKA; SHIBAMOTO, 2008).

A separação cromatográfica dos compostos foi efetuada com um equipamento *HPLC* equipado com transmissor de dados (Jasco LC – NetII/ADC, Japão), bombas de alta pressão (Jasco PU-980, Japão), injetor automático refrigerado (4°C, Jasco AS – 2057 Plus, Japão) e detetor de diodos (Jasco MD – 2015 Plus, Japão). O sistema de controle, aquisição e tratamento de dados foi ChromNAV Control Center - JASCO Chromatography Data Station.

Para a separação cromatográfica dos extratos de café foram injetados 20µL em coluna de fase reversa (Phenomenex; 250 x 4,60mm; C18 ODS – 2; 5µm) e eluídos (1mL/min) durante 30 minutos, à temperatura ambiente, com o seguinte gradiente de tampão acetato (A) e metanol (B) (*HPLC* grade), segundo Chambel et al. (1997) (Tabela 2), a 1 mL/min. O tampão acetato foi preparado com 8,0mL de solução (1M) de acetato de sódio (p.a., Aldrich, Alemanha) e adicionando ácido acético glacial (p.a., Merck, Alemanha) (cerca de 3,29mL) até se atingir pH = 3,90, em um volume final de 1L com água ultrapura e desgaseificado.

Tabela 2 Gradiente de eluição

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	90	10
10	80	20
12	70	30
20	65	35
23	63	37
24	50	50

As concentrações de trigonelina, niacina, 5-hidroximetilfurfural, furfural, ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) e cafeína foram calculadas por meio de curvas de calibração feitas com seus respectivos padrões (Sigma e Fluka). A identificação dos isômeros 3-ACQ, 5-ACQ e 4-ACQ foi feita com base no seu espectro e em dados da literatura para amostras semelhantes. A sua quantificação foi feita através da comparação das áreas dos picos desconhecidos com as áreas obtidas para o padrão de ácido 5-cafeoilquínico, com ajustes por intermédio do uso dos coeficientes de extinção molar dos respectivos isômeros (FUJIOKA; SHIBAMOTO, 2008).

3.4.4 Determinação dos diterpenos caveol e cafestol

As amostras liofilizadas foram reconstituídas em 5 mL de água quente e submetidas ao protocolo experimental para a quantificação de cafestol e caveol em bebidas de café.

A saponificação foi feita adicionando às bebidas reconstituídas 400mg de KOH em banho (80°C) sob agitação durante uma hora e em seguida banho de gelo por uma hora. Para a extração dos diterpenos foram adicionados NaCl (2M), 5mL de éter dietílico, essa mistura foi agitada e centrifugada (5 min, 3000rpm). O éter (5mL) foi adicionado mais 4 vezes. O solvente foi evaporado

com N₂ a temperatura ambiente. O extrato seco foi armazenado em vials selados de vidro âmbar a -18 °C até a sua análise por *HPLC-DAD*. A separação foi feita em fase reversa (Purospher STAR LichroCART; 250x4 mm, 5 µm), com uma fase móvel de água/acetoneitrilo, com gradiente lineaar (1 mL/min), num total de 35 minutos. A quantificação foi feita com base nas áreas obtidas a 220 nm.

Após descongelamento à temperatura ambiente as amostras foram reconstituídas em fase móvel e analisadas em conjunto com padrões de controle contendo cafeol e cafeol. Relativamente ao método analítico, a gama de linearidade é de 0,5 - 50 mg/L para o cafeol e 1 - 100 mg/L para o cafeol, apresentado coeficientes de correlação de Pearson de R = 0,995 e R = 0,997, respectivamente. A precisão intermédia, traduzida através do coeficiente de variação da análise de 6 cafés é da ordem dos 1,4 - 2,6% e a repetibilidade é entre 1,4 - 2,8%. A recuperação da extração situa-se na ordem dos 96% para uma concentração de 2,5 mg/L de cafeol em café. O limite de detecção é da ordem dos 0,01 mg/L e de quantificação é de 0,04 mg/L para uma razão de sinal/ruído de 3 e 10, respectivamente.

3.4.5 Determinação de tocoferóis

A extração foi feita de acordo com a metodologia descrita por Alves, Casal e Oliveira (2010). Resumidamente, as bebidas liofilizadas (equivalente a 15mL) foram recuperadas com 5mL de água deionizada. Foram adicionados 50uL de BHT (1% em etanol) como antioxidante, 20uL de padrão interno (tocol (2-metil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-chroman-6-ol) em etanol absoluto e 5mL de metanol. A extração líquido-líquido foi feita com duas vezes 6+4mL de n-hexano:acetato de etila (90:10), a mistura foi agitada e centrifugada (3 min, 5000 rpm). As fases orgânicas foram combinadas e levadas a secar com N₂ gasoso.

Interferências cromatográficas foram eliminadas com dimetilformamida. O resíduo foi ressuspendido com 100uL de n-hexano.

A análise foi feita no mesmo equipamento utilizado no item 4.7, acrescido do detector de fluorescência FP-920 (Jasco). Foi utilizada uma coluna de fase normal Supelcosil TM LC-SI (3 mm) 75x3.0mm (Supelco, Bellefonte, PA) operando a temperatura constante (21°C). Uma mistura de n-hexano e 1,4-dioxano (98:2) foi utilizada como eluente a 0,7mL/min. O detector DAD está acoplado em série com um detector de fluorescência, e foi programado com excitação em 290nm e emissão em 330nm. Os compostos em estudo foram identificados por comparação cromatográfica com os padrões e quantificados com base no método do padrão interno (tocol), através dos sinais de fluorescência e foi utilizado o programa Borwin-PDA como *software* controlador (JMBS, France).

3.4.6 Determinação de ácidos graxos

A metodologia para a análise dos ácidos graxos nas bebidas de café foi baseada no método clássico de Lepage e Roy (1986), com algumas modificações. À bebida liofilizada (15mL) foram adicionados 50uL de BHT (1% em etanol), como antioxidante, 1mL de metanol:diclorometano (3:1) e 1 mL do padrão interno (trionadecanoate; tri-C:19) em metanol:diclorometano (3:1) para quantificação do teor em gordura. Essa mistura foi agitada e levada ao congelador por 10 min. Em seguida foram adicionados 200uL de cloreto de acetila e essa solução foi mantida a 80°C por 1h. Após o arrefecimento foram adicionados 4mL de K₂CO₃ (7%), 2mL de hexano, agitou-se e centrifugou-se por 5 min a 5000 rpm.

Todo o hexano foi transferido para outros frascos e foram adicionados mais duas porções de hexano (2mL) na solução remanescente. Em seguida

adicionou-se 4 mL de acetonitrila ao hexano coletado e centrifugou-se por 3 min a 5000 rpm, o sobrenadante foi transferido para vials de injeção que foram levados à secura em corrente de nitrogênio e ressuspensos com 60 µL de diclorometano. O perfil de ácidos graxos foi analisado em um cromatógrafo a gás de alta resolução (HRGC) com detector FID (Chrompack CP-9001), com sistema de injeção *Split – splitless*. A separação foi feita com coluna capilar de sílica fundida de 50x 0,25mm revestida com uma película de 0,19 µm de CP-Sil 88 (Chrompack, Middelburg, The Netherlands).

Foi empregado hélio como gás de arraste a uma pressão de 100 kPa. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa de cada ácido graxo, calculado pela área do pico de acordo com a normatização internacional de cromatografia. A identificação dos ácidos graxos foi feita por comparação dos picos e tempos de retenção com seus padrões (Supelco-37 FAME Mix).

3.5 Ensaio biológico

Para a determinação do efeito das bebidas de café em ratos normais e hiperlipidêmicos foram utilizados 30 ratos machos da linhagem Wistar, pesando em média 350 ± 50 g, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas (Unifal- MG). Os animais permaneceram durante todo o período experimental, à temperatura de 23° C, com período claro-escuros de 12 horas, recebendo ração comercial e água *ad libitum*. Os ratos foram distribuídos em 6 gaiolas de polietileno e marcados individualmente.

O experimento foi realizado de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, devidamente aprovado pela Comissão de Bioética na Utilização de Animais (Nintec/PRP-UFLA), protocolo nº 046/2009.

3.5.1 Preparo da dieta hiperlipídica

A hiperlipidemia foi induzida com ração comercial acrescida de colesterol e ácido cólico. A ração comercial utilizada para ratos foi triturada em um liquidificador industrial. Em seguida, acrescentou-se, a cada 100 g de ração, 0,5 g de colesterol e 0,25 g de ácido cólico e a mesma foi umedecida com água, modelada e levada a uma estufa ventilada, a 35°C, por 48h, tempo suficiente para a secagem da mesma (ROCHA, 2009). Os animais do grupo controle negativo (não hiperlipídico) receberam a mesma dieta comercial, porém, sem adição de colesterol e ácido cólico.

3.5.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em diferentes grupos de acordo com o seguinte protocolo:

Grupo1 → C-: controle negativo (tratados com ração normal e gavagem com água).

Grupo2 → C+: controle positivo (tratados com ração hiperlipídica e gavagem com água).

Grupo3 → AI: (tratados com ração hiperlipídica e gavagem com bebida de café arábica integral).

Grupo4 → AD: (tratados com ração hiperlipídica e gavagem com bebida de café arábica descafeinado).

Grupo5 → RI: (tratados com ração hiperlipídica e gavagem com bebida de café robusta integral).

Grupo6 → RD: (tratados com ração hiperlipídica e gavagem com bebida de café robusta descafeinado).

As bebidas de café foram administradas na dose de 7,2mL/Kg de massa corpórea/dia durante 42 dias. Ao término do experimento, os animais permaneceram em jejum de 12 horas e, posteriormente foram anestesiados com Tiopental (35 mg/Kg), o sangue retirado por punção cardíaca e em seguida, o fígado foi retirado dos animais.

3.5.3 Preparo das amostras de sangue

As amostras de sangue foram colhidas em tubos siliconizados, sem aditivos e contendo EDTA (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*), sendo os tubos submetidos à centrifugação a 1500G por 10 minutos, a temperatura ambiente, para separação de soro e plasma respectivamente. O plasma obtido com EDTA foi utilizado para as determinações de dialdeído malônico (MDA); o soro obtido foi utilizado para a determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx). As amostras de plasma e soro foram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento das análises. Uma parte do soro foi mantida a -20°C para a determinação do perfil lipídico.

3.5.4 Preparo das amostras de fígado

O fígado foi dividido em 4 alíquotas. Uma porção foi pesada e homogeneizada em um volume (mL) de tampão fosfato (contendo fenilmetilfluoridosulfóxido -PMSF 50 µg/mL; benzamidina 100 µM e leupeptina 50 µM) equivalente a 4 vezes o peso do tecido, em banho de gelo, com auxílio de um homogeneizador de tecidos Potter. Esse homogeneizado foi utilizado para as determinações de MDA. A segunda alíquota do fígado foi homogeneizada a 4°C em homogeneizador de tecidos (potter) contendo tampão Tris-HCl 30mM pH 7, 4, EDTA 5 mM, KCl 30mM, sacarose 250mM, PMSF 50 µg/mL; benzamidina

100 μM e leupeptina 50 μM . Essas amostras foram utilizadas para a determinação da atividade das enzimas SOD e GPx. Os homogeneizados foram submetidos à centrifugação a 600g, 4°C, durante 10 minutos. As duas alíquotas de fígado restantes foram utilizadas para a determinação de lipídeos totais e análise histopatológica.

3.5.5 Determinação do colesterol sérico total

Para a determinação do colesterol total do soro sanguíneo dos animais, foi utilizado o kit enzimático-colorimétrico, marca Labtest®.

Os ésteres de colesterol foram hidrolisados pela colesterol esterase a colesterol livre e oxidado pela colesterol oxidase a colest-4-em-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e fenol, a 4-aminoantipirina é oxidada formando a antipirilquinonimina que tem absorvidade máxima em 500 nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra. A leitura de absorbância foi realizada em um espectrofotômetro a 500 nm.

3.5.6 Determinação dos níveis séricos de *HDL-c*

A determinação do *HDL-c* no soro dos animais foi realizada utilizando-se o kit enzimático-colorimétrico marca Labtest®.

A seletividade do método é baseada nas tecnologias de aceleração da reação de colesterol oxidase (CO) com o colesterol livre das lipoproteínas não *HDL-c* e solubilização seletiva das partículas *HDL-c* por ação de um detergente específico.

Na primeira fase da reação, o colesterol livre das partículas não *HDL-c* é submetido a uma reação enzimática catalisada pelo colesterol oxidase (CO) na

presença de acelerador. O peróxido de hidrogênio produzido é consumido por uma reação da peroxidase com disulfobutilmetatoluidina sódica (DSBmT) formando um produto incolor.

A segunda reação utiliza um detergente capaz de solubilizar especificamente o *HDL-c*. Com a ação das enzimas colesterol esterase (CE) e colesterol oxidase e acoplamento com 4-aminoantipirina e o cromogênio DSBmT, em reação catalisada pela peroxidase, ocorre o desenvolvimento de coloração proporcional à concentração de *HDL-c* na amostra. A leitura de absorbância foi realizada em um espectrofotômetro, em comprimento de onda de 600 nm.

3.5.7 Determinação dos níveis séricos de colesterol não *HDL-c*

O valor do *HDL-c* foi calculado pela diferença entre a concentração de colesterol total e de *HDL-c*. Esse parâmetro fornece uma estimativa dos níveis de lipoproteínas com potencial aterogênico (HA; BARTER, 1982; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

3.5.8 Determinação dos níveis séricos de triacilgliceróis

A determinação dos triacilgliceróis no soro dos animais foi realizada utilizando-se o kit enzimático-colorimétrico, marca Labtest®.

A lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triacilgliceróis liberando glicerol, que é convertido, pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela

peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorbância em 505 nm.

A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional a concentração dos triacilgliceróis na amostra. A leitura de absorbância foi realizada em um espectrofotômetro a 505 nm.

3.5.9 Determinação da proteína C reativa

A determinação da proteína C reativa no soro dos animais foi realizada por método turbidimétrico utilizando-se o kit da marca Human®.

O teste é baseado na reação imunológica entre a proteína C reativa de amostras de soro e seu anticorpo monoespecífico anti-PCR correspondente ligado a partículas de látex de poliestireno. A intensidade da aglutinação, medida em absorbância, é proporcional à quantidade de PCR. A leitura de absorbância foi realizada em um espectrofotômetro a 570 nm.

3.5.10 Determinação do teor de proteínas totais séricas

A determinação das proteínas totais no soro dos animais foi realizada utilizando-se o kit colorimétrico, marca Bioclin®, baseado na metodologia do Biureto.

As ligações peptídicas das proteínas (-CONH-) reagem com os íons cúpricos, em meio alcalino, formando um complexo de coloração violeta que é proporcional ao teor das proteínas do meio. A leitura de absorbância foi realizada em um espectrofotômetro a 545 nm.

3.5.11 Determinação do teor de proteínas no fígado

A determinação das proteínas nos homogeneizados de fígado dos animais foi realizada utilizando-se a metodologia de Bradford (1976).

Esse método é baseado na interação entre o corante “*Coomassie brilliant blue*” BG-250 e os resíduos de aminoácidos carregados positivamente nas proteínas, decorrentes da adição de ácido fosfórico 85%. No pH de reação a interação provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo-se 100 mg do corante “*Coomassie brilliant blue*” BG-250 em 50 mL de uma mistura equimolar de metanol 99,8% e etanol 95%; posteriormente a solução foi aquecida sob agitação à 50 °C até a dissolução. Foi adicionado 100 mL de ácido fosfórico 85% e o volume completado para 1000 mL com água destilada. A solução foi estocada a 4°C por 24 horas em frasco âmbar e posteriormente foi filtrada em papel Whatman n1, protegido da luz. A leitura de absorbância foi realizada em um espectrofotômetro, em comprimento de onda de 595 nm. Foi utilizada albumina sérica bovina como padrão.

3.5.12 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada segundo Oyanagui (1984). Aliquotas do soro e homogeneizado de fígado foram incubados com hidroxilamina 0,1M, hipoxantina 0,01M e xantina oxidase 4×10^{-6} U/mL a 37°C, durante trinta minutos, na ausência de luz. Após a incubação foi adicionado ácido sulfanílico, α -naftilenodiamino e ácido acético glacial, sendo mantidos à temperatura ambiente por vinte minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 550 nm. A

atividade da enzima foi calculada, considerando-se que 1 unidade da enzima é capaz de produzir uma inibição de 50 % na reação. Os resultados foram expressos em relação à concentração de proteína.

3.5.13 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da glutathiona peroxidase foi determinada segundo Sinet et al. (1975). Alíquotas do plasma e homogeneizado de fígado foram incubados com glutathiona reduzida 6mM, tampão fosfato 50 mM pH 7,0, NADPH 0,001 mM e glutathiona redutase 1 UI por três minutos à 37°C e sua absorbância foi monitorada em espectrofotômetro à 340 nm. Após três minutos de incubação, foi adicionado t-butil-hidroperóxido (0,07 g/mL) para que a reação fosse iniciada. A absorbância foi monitorada a 340 nm por cinco minutos. A cinética de oxidação do NADPH foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar para o mesmo, a 340 nm. Os resultados foram expressos em relação à concentração de proteína.

3.5.14 Avaliação da peroxidação lipídica

Foram estimados os níveis de MDA nas amostras de soro e homogeneizado de fígado, através da determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*TBARS*), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo metodologia descrita por PUNCHARD e KELLY (1996).

A reação do dialdeído malônico com o ácido tiobarbitúrico foi feita com 50 µL de amostra ou de padrão em 250 µL de ácido fosfórico, 450 µL de água milli-Q e 250 µL de ácido tiobarbitúrico, em banho-maria a 95° C por 1 hora. Posteriormente, a solução foi resfriada a 4° C e 200 µL dessa solução foram

misturados a 360 μL de metanol e 40 μL de hidróxido de sódio. Essa nova solução foi filtrada em membrana Millipore de 0,45 μm , antes da análise cromatográfica. A determinação do dialdeído malônico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna C-18 (4,6 mm x 25 cm) em método de fase reversa com detector de fluorescência com excitação em comprimento de onda de 532 nm e emissão de 553 nm. A eluição foi isocrática, em fluxo de 0,8 mL/minuto, sendo a fase móvel metanol/tampão fosfato 25 mM, pH 6,5, na proporção 50:50 v/v. A quantificação foi feita por calibração com o padrão 1,1,3,3- tetrametoxipropano, por análise da integral das respectivas áreas sob a curva (PUNCHARD; KELLY, 1996).

Todos os reagentes utilizados foram de grau *HPLC* e água utilizada purificada por sistema Milli-Q.

3.5.15 Determinação de lipídeos no fígado

Os lipídeos totais do fígado foram determinados seguindo a metodologia da AOAC (2000). Os fígados foram liofilizados em liofilizador Liobrás (L101) e triturados em almofariz. Foram pesados 2g do pó resultante que foram colocados em cartuchos de celulose. Os lipídeos foram extraídos com éter de petróleo por 6 horas no aparelho Soxhlet. O processo é gravimétrico e está baseado na perda de peso do material submetido à extração com éter, ou na quantidade de material solubilizada pelo solvente. Os resultados foram expressos em porcentagem de lipídeos em relação à matéria integral (fígado fresco).

3.5.16 Análise histológica dos fígados

Os fígados foram mantidos em formalina 10% por 24 horas para sua fixação, em seguida os órgãos foram seccionados em cortes finos, desidratados e

clarificados em uma sequência de soluções alcoólicas, onde permaneceram por 30 minutos em cada uma. Para o preparo do material, foi realizada uma sequência de 3 banhos com parafina também de 30 minutos cada uma. O material permaneceu em blocos de parafina e então foi cortado por um micrótomo na espessura de 4 a 6 micrômetros. Os cortes foram transferidos para lâminas de vidro devidamente identificadas e banhadas em soluções alcoólicas a fim de se retirar a parafina.

Por meio dessa técnica é possível diferenciar porções basófilas e acidófilas do tecido estudado. A hematoxilina é acidófila, ou seja, tem afinidade por substâncias ácidas, podendo corar os núcleos. A eosina é basófila, tendo afinidade pelo citoplasma, fibras colágenas e outras substâncias básicas das células (ATLAS..., 2011).

As lâminas foram observadas em um microscópio óptico com objetiva de aumento de 40x. As alterações histológicas observadas receberam as seguintes classificações: sem alterações (-); alterações leves (+); moderadas (++); e acentuadas (+++).

3.6 Delineamento experimental

O tratamento experimental utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Para as análises físico-químicas utilizou-se grãos de duas espécies de café (arábica e robusta), submetidos ou não a descafeinação (integral e descafeinado) e dois processamentos (cru e torrado), com 3 repetições.

Para a caracterização dos compostos bioativos utilizou-se quatro tipos de bebida (arábica integral, arábica descafeinado, robusta integral e robusta descafeinado), com 5 repetições.

Para o ensaio biológico foram utilizadas duas espécies de café (arábica e robusta), dois processamentos (integral e descafeinado) e dois tipos de dieta (padrão e hipercolesterolêmica), com 5 repetições para cada tratamento.

3.7 Análise estatística

Após a obtenção dos dados, os mesmos foram submetidos à análise de variância. Para comparação das médias, foi utilizado o teste Scott-Knott a 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de cor

A cor foi expressa em parâmetros da escala desenvolvida pela Commission Internationale de Eclairage (CIE) L^* , a^* , b^* . A coordenada L^* representa quão claro ou escuro é a amostra, com valores entre 0 (totalmente preto) e 100 (totalmente branco). A coordenada a^* pode assumir valores entre -80 a +100, cujos extremos correspondem, respectivamente, ao verde e ao vermelho. A coordenada b^* pode variar de -50 a +70, com intensidade do azul ao amarelo.

A utilização de coordenadas polares permite uma interpretação mais adequada de variações de coloração. As coordenadas polares do sistema CIE $L^*a^*b^*$ são: c^* ou croma, que fornece uma medida da intensidade ou saturação da cor e hue, que corresponde à tonalidade. O C^* é calculado como $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ e o ângulo de $h_{ab} = \tan^{-1}(b^*/a^*)$. A Tabela 3 demonstra os valores de $L^*a^*b^*$, c^* e h_{ab}^* das amostras de café.

Tabela 3 Análise de cor dos grãos de café torrado e moído arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD), de acordo com os parâmetros de cromaticidade da escala CIE $L^* a^* b^*$

Tipo de café	Parâmetros de Cromaticidade				
	L^*	a^*	b^*	c^*	h_{ab}^*
AIT	21,57	14,26	24,36	30,15	61,54
ADT	22,08	12,50	24,74	31,47	62,94
RIT	24,78	11,06	26,76	28,43	65,24
RDT	24,37	12,51	27,58	29,31	67,02

A luminosidade (L) relaciona-se ao grau de escurecimento do café, variando de 0 (preto) a 100 (branco), e com correlação significativa inversa entre os seus valores e o grau de torração (BORGES; JORGE; NORONHA, 2002). Os valores encontrados para a coordenada L* variaram de 21,57 a 24,78. De acordo com Campanha et al. (2010) essa faixa refere-se ao grau de torração médio.

A prática de associação direta dos parâmetros a* e b* é inadequada. Por exemplo, um aumento do parâmetro a* somente poderá ser diretamente correlacionado à intensidade da cor vermelha se o valor do parâmetro b* for igual a zero. Logo, a utilização de coordenadas polares (L*, c*, hab*) permite uma interpretação mais adequada das variações da coloração (BORGES; JORGE; NORONHA, 2002).

A tonalidade cromática (hab*) dos cafés variou de 61,54 a 67,02. Dias (2005), ao comparar amostras em um mesmo grau de torração observou que amostras de café robusta mostraram-se mais amareladas, ou seja, um maior valor de (hab*). Esse comportamento também foi observado neste estudo. Não houve diferença entre as amostras integrais e descafeinadas da mesma espécie.

4.2 Análises físico-químicas

A descafeinação e a torração provocam tanto mudanças físicas no grão, como modificações na forma, cor e tamanho, quanto químicas (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

Para a caracterização das amostras foram realizadas análises de densidade aparente, umidade, sólidos solúveis, acidez titulável, pH, açúcares totais, açúcares redutores e extrato etéreo.

Os resultados das análises físico-químicas realizadas nos grãos de café encontram-se nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4 Valores médios de densidade aparente (g/mL), umidade (%) e sólidos solúveis (%) nas amostras de café

<u>CAFÉS</u>	Densidade (g/mL)	Umidade (%)	Sólidos Solúveis (%)
Arábica integral cru	0,67 C	10,4 A	30,7 A
Arábica descafeinado cru	0,66 C	9,2 B	24,7 D
Robusta integral cru	0,71 B	10,4 A	31,7 A
Robusta descafeinado cru	0,77 A	10,4 A	25,0 D
Arábica integral torrado	0,32 F	2,0 C	27,3 C
Arábica descaf. torrado	0,37 D	1,9 C	23,7 D
Robusta integral torrado	0,38 E	1,9 C	29,7 B
Robusta descaf. torrado	0,40 D	2,0 C	24,7 D

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

Os grãos de café arábica são usualmente maiores que os de robusta, o que é aqui claramente visível pela maior densidade do segundo, equivalente a um maior empacotamento dos grãos no ensaio (Tabela 4). A torração diminuiu a densidade aparente em todas as amostras, visto que ocasiona um aumento no volume dos grãos, que é inversamente proporcional a densidade. Não houve variação significativa entre as amostras cruas integrais e descafeinadas da espécie arábica, porém as amostras descafeinadas cruas de café robusta apresentaram valores de densidade significativamente maiores que as suas respectivas amostras integrais.

Todas as amostras torradas descafeinadas apresentaram valores de densidade significativamente superiores aos valores dos seus respectivos cafés integrais. Os grãos descafeinados crus possuem um aspecto diferente, eles apresentam uma coloração mais escura e são menos volumosos que os grãos integrais e esse comportamento se refletiu nas amostras torradas.

Para a espécie arábica a umidade do café cru descafeinado foi inferior a do café cru integral. No processo de descafeinação a umidade do café verde deve

ser aumentada, a fim de separar a cafeína do ácido clorogênico e permitir que o solvente tenha acesso à cafeína, porém no final do processo os cafés são aquecidos para remover o residual do solvente e o excesso de umidade. Esse aquecimento pode ter sido maior no café arábica, o que pode ter levado a uma perda maior de umidade em comparação aos demais cafés crus.

A faixa de umidade encontrada para o café torrado (1,9-2,0%) está dentro do percentual máximo permitido no café torrado e moído que é de 5% (BRASIL, 1999). Não houve diferença significativa nos valores de umidade entre os cafés torrados.

A quantidade de sólidos solúveis é o total de todos os sólidos dissolvidos em água, como com açúcares, proteínas, ácidos, etc., e os valores de leitura medidos são a soma de todos eles. O teor de sólidos solúveis em grãos de cafés é importante, principalmente porque guarda uma relação direta com o rendimento industrial, assim como o sabor e o corpo da bebida.

A técnica indicada pela legislação é a do extrato aquoso (BRASIL, 1999). O extrato aquoso do café torrado e moído representa a quantidade de substâncias capazes de se solubilizarem em água fervente.

Após a torração, houve redução significativa nos valores de sólidos solúveis. A diminuição no teor de sólidos solúveis é consequência da perda de ácidos orgânicos e da volatilização de alguns compostos durante a torração (SABBAGH; YOKOMIZO, 1976). A espécie robusta apresentou maiores teores de sólidos solúveis que a espécie arábica, uma diferença em torno de 2% maior. O maior teor de sólidos encontrados em café robusta tem sido associado a seu maior potencial em liberar maiores quantidades de carboidratos em relação ao arábica (MENDONÇA; PEREIRA; MENDES, 2005).

Como era esperado a descafeinação levou a perdas significativas nos teores de sólidos solúveis devido à extração da cafeína. Os cafés descafeinados, normalmente, devem ser tratados de maneira diferente na torração, devido a

fatores como umidade e densidade. Mesmo com o ajuste na umidade percentual, o café ainda é diferente devido à distribuição de sólidos solúveis que agora ocupam lugar da cafeína e de outros compostos perdidos na extração da mesma (CASTLE, 1991; TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

Tabela 5 Valores médios de acidez titulável total (mL de NaOH 0,1N/100g) e pH nas amostras de café

<u>CAFÉS</u>	Acidez (mL de NaOH.100g ⁻¹)	pH
Arábica integral cru	467 A	5,7 B
Arábica descafeinado cru	475 A	5,5 C
Robusta integral cru	467 A	5,9 A
Robusta descafeinado cru	458 A	5,5 C
Arábica integral torrado	300 B	5,8 B
Arábica descaf. Torrado	308 B	5,5 C
Robusta integral torrado	316 B	5,9 A
Robusta descaf. Torrado	300 B	5,5 C

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

A acidez titulável total diminuiu com a torração e não houve diferença significativa entre as amostras torradas de ambas as espécies. A descafeinação não influenciou na acidez das amostras.

Os valores de pH das amostras arabica integral, crua e após a torração, foram inferiores aos de café robusta integral. As amostras descafeinadas mostraram valores de pH inferiores às amostras integrais, sem diferenças entre amostras em cru ou após torração. A faixa recomendada de pH ótimo para a bebida (5,6-5,9), podendo este café apresentar-se com ligeiro excesso de amargor ou acidez o que pode ter contribuído na perda de características sensoriais de bebidas descafeinadas verificadas por Abrahão et al. (2008).

O pH do café tem sido correlacionado com a acidez perceptível, por isso tem sido estudado como forma de avaliação deste importante atributo sensorial. Ao mesmo tempo, pesquisadores sugerem que a acidez total é que apresenta melhor correlação para determinar a acidez do café (MENDONÇA; PEREIRA; MENDES, 2005).

Tabela 6 Valores médios (%) de açúcares totais, açúcares redutores e extrato etéreo nas amostras de café

<u>CAFÉS</u>	Açúcares totais (%)	Açúcares redutores (%)	Extrato Etéreo (%)
Arábica integral cru	8,7 A	0,5 C	14,0 B
Arábica descafeinado cru	7,1 B	1,1 A	12,5 C
Robusta integral cru	6,9 B	0,8 B	7,3 E
Robusta descafeinado cru	5,3 C	1,0 A	6,9 E
Arábica integral torrado	0,8 D	0,4 D	17,1 A
Arábica descaf. torrado	0,5 D	0,3 D	17,8 A
Robusta integral torrado	0,6 D	0,3 D	9,0 D
Robusta descaf. torrado	0,9 D	0,3 D	9,3 D

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

Os açúcares totais nos grãos crus são representados pelos açúcares redutores, principalmente glicose e frutose, e pelos não redutores, sendo a sacarose predominante (ROGERS et al., 1999).

Nesse estudo os cafés crus da espécie arábica apresentaram maiores teores de açúcares totais que os cafés da espécie robusta. Embora as amostras apresentem valores diferentes de açúcares totais nos grãos crus, todos os valores se encontram dentro da faixa de 5% a 10%, encontrada na literatura (PRETE, 1992).

Os cafés com maiores concentrações de açúcares totais nos grãos crus apresentam maior potencialidade para o desenvolvimento das reações de Maillard e de caramelização (ILLY; VIANI, 1998; SALVA; LIMA, 2007). Diante disso supõe-se que, durante a torração, o café arábica apresenta um maior potencial para formar produtos da reação de Maillard (melanoidinas) que o café robusta.

A torração levou a perdas significativas nos teores de açúcares totais em ambas as espécies. Durante a torração, os açúcares presentes no endosperma do café participam das reações de Maillard e de caramelização, formando compostos voláteis e não voláteis que podem conferir à bebida sabores e aromas desejáveis ou não, dependendo dos compostos formados e das concentrações dos mesmos.

A descafeinação levou a uma diminuição significativa dos níveis de açúcares totais nos grãos crus, tanto da espécie arábica quanto da espécie robusta, porém as amostras torradas não diferiram entre si. No estudo de Aguiar et al. (2005), verificou-se que cafés descafeinados mostram uma diminuição do teor de açúcar.

O processo de torração destrói progressivamente os monossacarídeos e rapidamente a sacarose sofrendo esta, inicialmente, desidratação seguida de hidrólise a açúcares redutores, os quais também sofrem desidratação com posterior polimerização e degradação parcial a compostos voláteis, água e CO₂.

Os cafés descafeinados crus das duas espécies estudadas apresentaram menores teores de açúcares totais. No final do processo de descafeinação os grãos são aquecidos para vaporização do solvente. Nessa etapa é provável que tenha ocorrido reações com os açúcares, o que levaria a diminuição dos açúcares totais.

Os resultados dos açúcares redutores estão próximos aos encontrados na literatura, que são de 0,1% a 1,0% (ILLY; VIANI, 1998).

Durante a torração, os açúcares redutores reagem com aminoácidos (reação de Maillard), dando origem à coloração característica dos grãos torrados, além da formação de compostos responsáveis pelo aroma da bebida, cor e atividade antioxidante do café (FLAMENT, 2002).

A diminuição do teor de açúcares redutores verificada em todas as amostras após a torração deve-se à reação destes compostos com os grupamentos aminos de aminoácidos, peptídeos e proteínas, fazendo com que os cafés torrados apresentem um pequeno resíduo de glicose e frutose (ILLY; VIANI, 1998; FLAMENT, 2002).

Observou-se que o processo de descafeinação com diclorometano levou a um aumento no teor de açúcares redutores nas amostras de café cru das espécies arábica e robusta. Com a elevação da temperatura a sacarose é hidrolisada a açúcares redutores (CHALFOUN, 2000). O aquecimento dos grãos durante a descafeinação pode ter hidrolisado parte da sacarose em açúcares redutores, o que pode explicar o aumento encontrado nos cafés descafeinados crus em ambas as espécies.

O extrato etéreo estima a quantidade de lipídeos totais. Os teores de lipídeos totais nas amostras cruas integrais de café arábica (14,3%) e café robusta (7,3%) estão próximos a valores encontrados na literatura (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006). O café arábica apresentou maiores teores de extrato etéreo em todos os tratamentos, quando comparado ao café robusta. Outros estudos também verificaram maiores teores de lipídeos nas amostras da espécie arábica (EUGÊNIO, 2010; TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

O processo de descafeinação ocasionou perdas de 10,7% e 5,5% no teor de lipídeos totais nas amostras cruas, observando o aumento do teor de lipídeos com o processamento térmico. Entre as amostras de café da mesma espécie não houve diferença significativa nos teores de lipídeos após a torração, porém entre

as amostras torradas o café arábica manteve seus maiores níveis sobre as amostras de café robusta.

Observa-se, pelos dados da Tabela 6 um aumento da concentração de lipídeos após a torração, em todas as amostras. O aumento do teor de lipídeos após o processo de torração já foi relatado em outros trabalhos. A concentração de lipídeos aumenta após a torração, sobretudo pela perda de massa de outras substâncias (carboidratos) durante o processo térmico e a estabilidade térmica desses lipídeos no café, ou seja, a composição relativa de lipídeos (massa seca) acaba aumentando, o que justifica os resultados encontrados (LAGO, 2001; NASCIMENTO et al., 2007; TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

4.3 Compostos bioativos nas bebidas de café

Os compostos bioativos foram determinados nas bebidas de café que foram administradas aos ratos.

4.3.1 Fenólicos totais

A bebida do café é uma das principais fontes de substâncias fenólicas da dieta e tais substâncias apresentam atividade protetora das membranas contra o dano oxidativo (SILVA et al., 2005).

Um método muito utilizado para determinar a capacidade antioxidante de um composto é o Folin- Ciocalteu. Esse ensaio é utilizado como medida de fenólicos totais em produtos naturais, mas o mecanismo básico é uma reação de oxidação/redução e como tal pode ser considerado um método de atividade antioxidante *in vitro* (PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005).

Os valores percentuais médios das determinações dos compostos fenólicos totais nas bebidas de café em estudo são representados na Tabela 7.

Tabela 7 Teores de compostos fenólicos (\pm desvio padrão) (mg eq. Ac. Gálico/mL) nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

<u>CAFÉS</u>	Fenólicos totais (mg eq. Ac. Gálico/mL)
AIT	6,55 \pm 0,040 C
ADT	6,89 \pm 0,020 B
RIT	6,93 \pm 0,002 B
RDT	7,46 \pm 0,030 A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

A bebida de café robusta integral apresentou concentrações significativamente maiores de compostos fenólicos em relação à bebida de café arábica integral. As amostras descafeinadas apresentaram teores de compostos fenólicos superiores aos seus respectivos cafés integrais. Embora o diclorometano seja bastante seletivo para a cafeína, outros compostos são solúveis no mesmo, o que acaba por acarretar uma perda de massa no café após o processo de descafeinação e conseqüentemente um aumento relativo nos teores de outros compostos (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

Nogueira e Trugo (2003), ao analisarem os compostos bioativos de cafés solúveis do mercado verificaram que os cafés descafeinados apresentaram teores de ácidos clorogênicos superiores aos cafés integrais, corroborando com os achados desse estudo.

Vignoli (2009) descreveu maior atividade antioxidante, medida por diferentes metodologias, para café conilon em comparação ao arábica, independentemente do grau de torração dos cafés torrados e moídos estudados. Considerando-se as diferentes categorias de café, produtos do tipo Gourmet se apresentaram os menores valores de atividade antioxidante, demonstrando que

além do grau de torração a espécie de café empregada influencia na funcionalidade da bebida.

Os compostos fenólicos são compostos bioativos do café, sendo assim, a diferença nos teores entre as amostras analisadas pode influenciar na atividade antioxidante entre as bebidas de café analisadas. Fenóis totais por Folin-Ciocalteu provavelmente expressam não apenas os compostos livres, mas também compostos associados à estrutura da melanoidina, avaliando de forma global a contribuição de componentes fenólicos para a atividade antioxidante (ALMEIDA; BENASSI, 2011).

4.3.2 Cafeína

Os teores de cafeína foram calculados a partir dos cromatogramas obtidos a 276nm para cada amostra. O tempo de retenção correspondente a cafeína foi de aproximadamente 18 minutos. Os teores de cafeína nas bebidas de café estão representados na Tabela 8.

Tabela 8 Teores de cafeína (\pm desvio padrão) detectados nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

BEBIDA DE CAFÉ	Cafeína (mg/mL)
AI	0,76 \pm 0,01 B
AD	0,05 \pm 0,01 C
RI	1,11 \pm 0,05 A
RD	0,03 \pm 0,01 C

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

A bebida preparada com café robusta integral apresentou os maiores teores de cafeína (Tabela 8). Cafés da espécie robusta apresentam quantidades maiores de cafeína que os cafés da espécie arábica e essa diferença refletiu nas bebidas. As bebidas descafeinadas apresentaram percentual de redução nos teores de cafeína correspondentes a 94% para a bebida de café arábica e 97% para a bebida de café robusta.

Qualquer que seja o método de descafeinação, o café verde descafeinado deve conter menos de 0,1 % de cafeína (à base de peso seco) para cumprir a legislação para café descafeinado (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 1999). Isso corresponde a cerca de 3-5 mg de cafeína numa xícara de café descafeinado (HASKELL et al., 2008).

Nesse estudo foram encontrados valores de cafeína compatíveis com o máximo esperado para cafés descafeinados. Apesar de o diclorometano ser bastante seletivo para a cafeína, outros compostos podem se solubilizar no mesmo, já que se trata de um solvente orgânico. Compostos da fração lipídica do café, por exemplo, podem se solubilizar no diclorometano o que pode levar uma perda de massa no café após o processo de descafeinação (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

Apesar de ser frequentemente assumido que uma xícara de café integral forneça em torno de 100 mg de cafeína, numa análise de 14 diferentes cafés de filtro comprados em cafeterias nos Estados Unidos encontrou-se uma variação no teor de 0,3mg a 0,54 mg de cafeína por mL de bebida, valores inferiores aos encontrados nesse estudo em ambas as espécies.

Segundo Camargo, Toledo e Farah (1988), para cafés brasileiros o teor médio de cafeína encontrado nas bebidas de filtro é de aproximadamente 0,6 mg/mL, esse valor está próximo aos valores encontrados nesse estudo para as bebidas de café arábica integral. Há uma dificuldade em se comparar trabalhos na literatura devido às diferentes concentrações de cafés utilizadas nos estudos.

Os limites máximos recomendados para o consumo de café geralmente estão associados às concentrações de cafeína, sendo o consumo moderado normalmente descrito como a ingestão de até aproximadamente 4 xícaras de café/400mg de cafeína por dia. Existem benefícios à saúde no consumo moderado de café, equivalendo a 3-4 xícaras/dia, fornecendo 300- 400mg/dia de cafeína (HIGDON; FREI, 2006).

4.3.3 Ácidos clorogênicos

A permanência resisual de maiores teores de ácidos clorogênicos após o processamento do café pode ser benéfica, tendo em vista a atividade antioxidante desses compostos, porém teores muito elevados podem promover algum impacto sensorial negativo (GÓMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007).

Os teores dos ácidos clorogênicos foram calculados a partir dos cromatogramas obtidos dos seus principais isômeros presentes no café (MOREIRA et al., 2005; NOGUEIRA; TRUGO, 2003; TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

Os tempos de retenção correspondentes aos ácidos cafeoilquínicos foram aproximadamente: 12 min/3-ACQ, 16 min/5-ACQ e 17 min/4-ACQ a 325nm. A Figura 2 representa o cromatograma e os respectivos tempos de retenção dos ácidos cafeoilquínicos identificados.

Os resultados obtidos estão representados na Tabela 9.

Tabela 9 Teores dos isômeros dos ácidos clorogênicos (\pm desvio padrão) detectados nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

BEBIDA DE CAFÉ	3-ACQ (mg/mL)	4-ACQ (mg/mL)	5-ACQ (mg/mL)	ACQ TOTAIS (mg/mL)
AI	0,087 \pm 0,001	0,136 \pm 0,006	0,199 \pm 0,005	0,582 \pm 0,007 C
AD	0,152 \pm 0,002	0,237 \pm 0,006	0,359 \pm 0,002	0,748 \pm 0,005 B
RI	0,067 \pm 0,002	0,138 \pm 0,007	0,147 \pm 0,002	0,352 \pm 0,007 D
RD	0,258 \pm 0,015	0,420 \pm 0,014	0,590 \pm 0,015	1,268 \pm 0,011 A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

As bebidas preparadas com café arábica integral apresentaram maiores concentrações de ácidos cafeoilquínicos totais, quando comparadas com as bebidas preparadas com café robusta integral. As amostras descafeinadas apresentaram níveis superiores de ácidos cafeoilquínicos totais em relação às amostras integrais em ambas as espécies.

A torração leva a destruição dos ácidos clorogênicos, Lima et al. (2010) e Toci, Farah e Trugo (2006) verificaram uma perda significativa dos ácidos clorogênicos nas amostras cruas descafeinadas das espécies arábica e robusta. Nas amostras torradas no ponto médio de torração observou-se um aumento nos teores de ACQ totais, esse aumento é explicado pela perda de massa ocasionada após a extração da cafeína. Como o café robusta possui quase o dobro de cafeína em relação ao café arábica, o aumento relativo nos teores de ácidos clorogênicos no café robusta descafeinado também é maior.

Alguns trabalhos que compararam os teores de ácidos clorogênicos em amostras de café integrais e descafeinadas observaram um aumento relativo nos níveis dos ACQ e o mesmo foi verificado com as bebidas neste estudo.

Moreira et al. (2005), ao estudarem bebidas preparadas com amostras comerciais de diferentes tipos de café, verificaram que algumas bebidas descafeinadas apresentaram quantidades de ácidos clorogênicos muito superiores a algumas bebidas integrais. Por se tratar de amostras comerciais, de lotes diferentes não foi possível verificar o efeito da descafeinação, pois o ponto de torração e a origem das espécies podem ter influenciado no estudo citado.

Outro estudo realizado com cafés descafeinados e convencionais verificaram que algumas amostras de cafés descafeinados continham níveis inferiores de ácido clorogênico que o seu respectivo café integral, sugerindo que o processo de descafeinação reduziu o teor de ácido. Nesse mesmo estudo outras amostras de cafés descafeinados continham níveis mais elevados de ácido clorogênico que os seus respectivos cafés regulares (FUJIOKA; SHIBAMOTO, 2008).

Nogueira e Trugo (2003), ao estudarem os isômeros dos ácidos clorogênicos em cafés solúveis comerciais verificaram que as amostras descafeinadas apresentaram teores muito superiores aos cafés regulares.

Nesse estudo, os níveis de ACQ nas bebidas de café robusta e arábica descafeinados foram muito superiores aos de suas respectivas bebidas de café integral, com destaque para a bebida de café robusta descafeinada. Uma hipótese para esse aumento seria que as bebidas preparadas a partir de cafés descafeinados tenham extraído maiores quantidades de ACQ que a bebida integral e uma explicação seria o aumento da porosidade criado pela saída da cafeína do grão descafeinado. Outra hipótese estaria relacionada à torração, já que o processo de descafeinação torna o café mais vulnerável, acelerando o processo de torração, portanto, tempo e temperatura mais rápidos e brandos são necessários para dar maior regularidade à bebida (LEE, 1999), ou seja, para que se atinja o mesmo grau de torração o café descafeinado permanece um tempo menor no torrador quando comparado ao seu respectivo café integral, e isso

pode ter ocasionado menores perdas dos ácidos clorogênicos nas amostras descafeinadas.

Uma porção de 200 mL de café de filtro contém de 70 - 200 mg de ácido clorogênico, quando preparado com grãos da espécie arábica e no caso do café robusta contém de 70-350mg (CLIFFORD, 1999). Os resultados encontrados nesse estudo estão de acordo com o estudo citado anteriormente.

A permanência residual de maiores teores de ácidos clorogênicos após o processamento do café pode ser benéfica, tendo em vista a atividade antioxidante desses compostos, porém teores muito elevados podem promover algum impacto sensorial negativo (GÓMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007).

Foi realizado um estudo para se verificar a absorção do ácido clorogênico no intestino delgado e verificou-se uma absorção de 33% do ácido clorogênico e apenas traços deste foram excretados na urina, indicando seu provável metabolismo pós-absortivo, ou seja, alcança o cólon, é metabolizado e influencia a flora microbiana intestinal (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001).

4.3.4 Trigonelina e niacina

Os teores de trigonelina e niacina foram calculados a partir dos cromatogramas obtidos a 265nm para cada amostra. O tempo de retenção correspondente a trigonelina e a niacina foram, respectivamente, ~ 3 e 5 minutos. A Tabela 10 representa os níveis médios de trigonelina e niacina nas bebidas de café.

Tabela 10 Teores de trigonelina e niacina (\pm desvio padrão) detectados nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

BEBIDA DE CAFÉ	Trigonelina (mg/mL)	Niacina (mg/mL)
AI	0,17 \pm 0,010 B	0,016 \pm 0,001 A
AD	0,36 \pm 0,010 A	0,012 \pm 0,001 B
RI	0,09 \pm 0,003 C	0,013 \pm 0,002 B
RD	0,38 \pm 0,020 A	0,016 \pm 0,001 A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

A trigonelina é um composto termossensível do café, sendo assim a torração ocasiona grandes perdas nos teores de trigonelina, Lima et al. (2010) e Toci, Farah e Trugo (2006) verificaram perdas significativa nos teores de trigonelina nas amostras cruas descafeinadas. Nas amostras torradas no ponto médio de torração observou-se um aumento nos teores de trigonelina, assim como foi verificado neste estudo. Parte desse aumento pode ser explicada pela perda de massa ocasionada após a extração da cafeína.

O café robusta possui quase o dobro de cafeína em relação ao café arábica e menores teores de trigonelina, assim o aumento relativo nos teores de trigonelina na amostra de café robusta descafeinado também é maior, no entanto esse grande aumento verificado, principalmente nas bebidas de café robusta descafeinado, pode ser justificado mais uma vez pelo aumento da porosidade no grão, causado pela extração da cafeína que supõe-se ter aumentado a extração de alguns compostos nas amostras descafeinadas. Ao contrário da cafeína a trigonelina não é termoestável, assim como os ácidos clorogênicos, portanto a mesma hipótese pode ser utilizada para explicar os níveis superiores de ácidos clorogênicos e trigonelina nas amostras descafeinadas, se o café descafeinado

fica menos tempo no torrador é provável que menos trigonelina tenha sido degradada.

Nogueira e Trugo (2003) determinaram os teores de trigonelina em cafés solúveis comerciais e verificaram que os cafés descafeinados apresentaram os níveis mais elevados de trigonelina.

As concentrações de trigonelina nas bebidas variaram de acordo com a espécie, sendo que o café arábica apresentou maiores concentrações que o café robusta, resultados que estão de acordo com outros estudos (DAGLIA et al., 2004; PERRONE et al., 2008; SOUZA et al., 2010).

O café é um dos únicos produtos que, mediante um processo tão drástico como a torração, produz uma vitamina importante para o metabolismo humano, a niacina, ácido nicotínico, vitamina B3 ou fator PP (esta última designação advém da sua ação farmacológica: PP = “prevenção da pelagra”). Durante a torração, a trigonelina sofre desmetilação para formar a niacina, em quantidades próximas de 20 mg 100g⁻¹ de café torrado (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009; MONTEIRO; TRUGO, 2005).

Foi suposto que os valores inferiores de trigonelina nas amostras descafeinadas pudessem influenciar negativamente a formação da vitamina niacina (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

Nesse estudo verificou-se uma diminuição significativa nos níveis de niacina na amostra descafeinada da espécie arábica, já na espécie robusta ocorreu um aumento relativo na concentração da mesma, que pode ser explicado devido ao café robusta possuir quase o dobro de cafeína que a espécie arábica, o que leva a uma perda maior de massa seca nessa espécie explicando esse aumento nos níveis de niacina na espécie robusta.

Sabendo que as necessidades exógenas diárias desta vitamina estão em torno dos 15-20 mg e uma xícara de café pode conter até 3 mg da mesma, o consumo moderado de café pode contribuir para a prevenção do

desenvolvimento de pelagra (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). A niacina é utilizada como fármaco devido ao seu efeito hipolipidêmico, sendo necessárias doses mais altas do que aquelas recomendadas para seus efeitos de vitamina (MAHLEY; BERSOT, 2006).

4.3.5 Tocoferóis

Os teores de α -tocoferol e β -tocoferol, bem como os teores de tocoferóis totais nas bebidas de café em estudo estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 Níveis de α – tocoferol, β – tocoferol e tocoferóis (\pm desvio padrão) detectados nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

BEBIDA DE CAFÉ	α -Tocoferol ($\mu\text{g/L}$)	β -Tocoferol ($\mu\text{g/L}$)	Tocoferóis Totais ($\mu\text{g/L}$)
AI	10,31 \pm 0,42	10,63 \pm 0,42	20,94 \pm 0,65 A
AD	7,73 \pm 0,16	7,40 \pm 0,11	15,13 \pm 0,18 C
RI	8,01 \pm 0,17	10,79 \pm 0,92	18,79 \pm 1,05 B
RD	6,56 \pm 0,44	7,46 \pm 0,12	14,01 \pm 0,34 D

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro da última coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

Os tocoferóis, conhecidos como potentes antioxidantes *in vivo*, estão também presentes no óleo do café, especialmente no de café arábica. Sendo insolúveis em água, a sua extração para a bebida irá depender essencialmente do método de preparo desta. Os cafês turco, escandinavo e expresso permitem uma extração bem maior da componente lipídica dos grãos de café comparados ao café de filtro.

Foram detectadas quantidades muito pequenas de tocoferóis, fato que é explicado por se tratar de bebidas de café de filtro, ou seja, a água passa pelo pó de café sob pressão mínima e por isso a extração desses componentes lipídicos é bem pequena. Alves, Casal e Oliveira (2010), ao estudar a influência do método de preparo da bebida de café sobre os níveis de tocoferóis verificaram que as bebidas preparadas pelo método de filtro apresentaram os menores teores de tocoferóis, com valores próximos aos encontrados neste estudo.

As bebidas preparadas a partir do café arábica apresentaram níveis de tocoferóis totais superiores às bebidas preparadas com café robusta. A descafeinação ocasionou uma diminuição significativa nos níveis de tocoferóis totais em ambas as espécies. Os tocoferóis têm caráter lipofílico e podem ter sido solubilizados no solvente diclorometano durante a extração da cafeína. A fração lipídica do café é termoestável, portanto essa diminuição nos níveis de tocoferóis nas amostras descafeinadas se manteve após a torração, refletindo nas bebidas estudadas.

Apesar de estarem presentes em quantidades relativamente pequenas os tocoferóis contribuem para complementar a atividade antioxidante da bebida, já que, devido à sua elevada lipossolubilidade, poderão atuar em locais diferentes dos demais antioxidantes do café (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009).

4.3.6 Diterpenos: kahweol e cafestol

Os diterpenos têm recebido destaque pelos efeitos tanto benéficos, como ação antioxidante e anticarcinogênica, quanto prejudiciais à saúde dos consumidores, como a ação hipercolesterolêmica (HIGDON; FREI, 2006).

Foi possível detectar e quantificar os níveis de kahweol e de cafestol em todas as amostras analisadas.

Tabela 12 Níveis de cafestol e de kahweol (\pm desvio padrão) detectados nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

BEBIDA DE CAFÉ	Kahweol (mg/L)	Cafestol (mg/L)	Diterpenos Totais (mg/L)
AI	0,33 \pm 0,03	0,58 \pm 0,04	0,91 \pm 0,06 B
AD	0,14 \pm 0,05	0,23 \pm 0,05	0,37 \pm 0,07D
RI	0,04 \pm 0,004	0,97 \pm 0,04	1,01 \pm 0,09A
RD	0,09 \pm 0,0004	0,50 \pm 0,01	0,59 \pm 0,03C

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro da última coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

Foi descrito que o teor de diterpenos na bebida do café depende do método de preparo e está diretamente relacionado com o teor total de lipídeos extraídos, que varia de 0,2% para café filtrado chegando a 22% no estilo escandinavo (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006).

O café turco e o fervido contêm níveis relativamente altos (6 a 12mg/xícara), enquanto o filtrado e o instantâneo contêm níveis baixos (0,1 a 0,2mg/xícara), considerando uma xícara equivalente a 150mL de bebida de café.

Nesse estudo, 150mL de café arábica e robusta, ambos integrais, apresentaram respectivamente 0,13mg e 0,15mg de diterpenos, valores similares a literatura para o mesmo tipo de bebida.

Os cafés integrais apresentaram níveis de cafestol ligeiramente superiores aos seus congêneres descafeinados. No entanto para o caveol, esta tendência apenas se verifica para o café arábica, já que o café arábica descafeinado apresenta níveis de caveol superiores ao seu congêneres integral.

Para o café conilon, que possui menor teor de lipídios, existe controvérsia quanto à presença de caveol, alguns pesquisadores não observaram a presença desse composto enquanto outros descrevem concentrações muito

baixas ou apenas traços (SOUZA et al., 2010). Por se tratar de teores muito baixos nas bebidas de café filtrado, é mais viável a análise dos diterpenos totais.

A descafeinação causou uma diminuição nos teores de diterpenos totais nas bebidas de café estudadas, com perdas de 59% na bebida de café arábica descafeinado e perdas de 32% na bebida de café robusta descafeinado. A explicação seria a solubilidade desses compostos lipídicos no solvente diclorometano usado na descafeinação dos grãos, resultando numa perda desses compostos nos grãos descafeinados que se refletiram nas bebidas.

Foi observado na Finlândia, num período de 25 anos, 40% de redução da taxa de colesterol, fato atribuído à mudança no hábito de ingerir café filtrado ao invés de café fervido. A mudança provocou redução de 7% em doenças cardiovasculares. Os autores constataram que para cada 10 mg de cafestol ingeridos por dia ocorre acréscimo do colesterol no soro em 5 mg/dL ou 0,13 mmol/L (WOUW et al., 1994).

4.3.7 Ácidos graxos

Foram identificados 8 ácidos graxos nas bebidas de café, a porcentagem média e o teor de ácidos graxos totais estão representados na Tabela 13.

Tabela 13 Composição de ácidos graxos (%) e teores de ácidos graxos totais nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

ÁCIDOS GRAXOS (%)		BEBIDAS			
		AI	AD	RI	RD
C16:0	Palmítico	35,2	35,6	33,0	31,2
C18:0	Esteárico	11,9	11,0	11,9	11,6
C18:1	Oleico	11,8	10,3	11,0	9,9
C18:2	Linoleico	35,0	36,0	38,0	41,2
C20:0	Araquídico	3,0	2,5	3,2	3,0
C18:3	α -Linolênico	1,3	2,6	0,6	1,2
C22:0	Beênico	0,9	0,8	1,3	0,9
C24:0	Lignocérico	0,9	1,1	1,1	1,0
AG TOTAIS mg/L		11,90 A	9,82 B	11,94 A	12,04 A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro da última linha diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

O café é rico em óleos (Tabela 6 – extrato etéreo) e a maior parte desses óleos é constituída por ácido palmítico (34,5%) e linoleico (40,3%). O perfil de ácidos graxos dos lipídeos do café é similar ao dos óleos vegetais comestíveis (TURATTI, 2001; VIDAL, 2001).

Após o preparo da bebida o perfil de ácidos graxos manteve-se, mas o teor lipídico na bebida de café arábica descafeinado foi muito reduzido, na ordem dos 10-12 mg/L, equivalente a 1,5 a 2 mg por xícara de bebida (150 mL).

Não ocorreram perdas de lipídeos totais nas bebidas da espécie robusta descafeinada. Estudos mostram que os grãos de café robusta possuem menores teores de lipídeos livres que o café arábica, portanto a extração desses lipídeos livres pelo diclorometano durante a descafeinação dos grãos será maior na espécie arábica (TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

Em vegetais com teores moderados de lipídeos e, principalmente com predomínio de ácidos graxos poliinsaturados geralmente há correlação positiva

entre estas porcentagens e a atividade antioxidante. Nesse estudo verificou-se que o ácido linoleico (36% - 41,2%) representa a maior porcentagem entre os ácidos graxos poliinsaturados. O ácido linoleico possui propriedades terapêuticas, de alívio de eczemas crônicos e cura de dermatites (BEVERIDGE et al., 1999).

De acordo com os resultados mostrados, observa-se que as amostras são compostas majoritariamente pelos ácidos linoleico e palmítico, seguidos dos ácidos esteárico e oleico, essa tendência foi observada em outros estudos (JHAM et al., 2008; TURATTI, 2001). Os demais ácidos graxos, foram identificados em quantidades inferiores a 3,5% do total de ácidos graxos.

4.3.8 Furfural e 5-HMF

O furfural e o hidroximetilfurfural são compostos intermediários da reação de Maillard. A polimerização do HMF dá origem a melanoidina. Os furfurais fornecem também as redutonas, de alto poder redutor. As presenças de HMF e de redutonas levam ao escurecimento e aroma característicos da reação de "Maillard" (BOEKEL, 1998). A Tabela 14 demonstra os níveis de furfural e 5-HMF nas diferentes bebidas estudadas.

Tabela 14 Níveis de furfural (ug/mL) e 5-HMF (mg/mL) nas bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

BEBIDA DE CAFÉ	Furfural (ng/mL)	5-HMF (ug/mL)
AI	8±0,01 C	5,2±0,25 D
AD	18±0,01 B	3,8±0,23 C
RI	5±0,01 D	6,8±0,30 B
RD	35±0,10 A	10,0±0,54 A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

As bebidas preparadas com o café arábica integral apresentaram níveis maiores de furfural que as bebidas preparadas com café robusta integral, já os níveis de 5-HMF foram maiores nas amostras de café robusta.

Os valores do furfural aumentaram com a descafeinação, principalmente no café robusta, o que poderá estar relacionado com o seu maior teor de açúcares redutores nos grãos crus, conforme discutido previamente. O 5-HMF livre aumentou também com a descafeinação, mas de forma menos intensa.

Esse aumento nos teores de 5-HMF pode ser explicado mais uma vez pela perda de massa nos grãos com a extração da cafeína, além disso, parte desses compostos está englobada nas melanoidinas, conforme descrito na literatura, o que poderá reduzir o seu teor livre determinado.

As propriedades antioxidantes de alguns compostos voláteis, incluindo furanos foram examinadas por Fuster et al. (2000), segundo esses autores, a atividade antioxidante dos furanos foi comparável a do antioxidante sintético hidroxitolueno butilado (BHT). Entretanto López-Galilea, Peña e Cid (2007) não encontraram nenhuma correlação entre a atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH e FRAP com os compostos voláteis acima mencionados.

4.4 Ensaio Biológico

Foram realizados testes bioquímicos, enzimáticos, antioxidantes e histopatológicos nos animais em estudo.

4.4.1 Perfil lipídico

A Tabela 15 demonstra os níveis séricos de triglicérides, colesterol total, colesterol não *HDL* e *HDL-c* e dos grupos tratados com os diferentes tipos de bebida de café submetidos à dieta hiperlipídica.

Tabela 15 Concentrações médias dos níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol total, colesterol não *HDL* e *HDL-c* (mg/dL) nos grupos controle negativo (C-), controle positivo (C+) e nos grupos tratados com as bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

Tratamentos	Triacilgliceróis (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)	Colesterol <i>HDL-c</i> (mg/dL) não <i>HDL</i> (mg/dL)	
C-	45±4,2 B	57±7,40 C	43±6,80 C	14±1,4
C+	80±8,8 A	108±7,10 A	94±7,90 A	14±0,9
AI	41±2,9 B	87 ±13,5 B	74±12,9 B	14±2,1
AD	45±6,0 B	80 ±13,1 B	65±12,6 B	14±1,5
RI	45±5,0 B	91 ±8,30 B	78±8,90 B	13±1,5
RD	47±6,4 B	83 ±10,4 B	70±11,0 B	13±1,7

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

Ocorreu um aumento significativo nos níveis colesterol total, colesterol não *HDL* e triacilgliceróis no grupo controle positivo quando comparado ao grupo controle negativo, indicando que a dieta foi eficaz na indução da hiperlipidemia.

Os níveis séricos de *HDL-c* não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados. Para os níveis séricos de colesterol total, *HDL-c* e triacilgliceróis observou-se que os grupos tratados com todas as bebidas de café apresentaram uma diminuição significativa quando comparados ao controle positivo.

Todas as bebidas de café exerceram efeito positivo nos níveis de triacilgliceróis, colesterol total e colesterol não *HDL*. Houve uma redução entre 41,25 % a 48,75% nos níveis de triacilgliceróis e 14,13% a 21,74% nos níveis de colesterol não *HDL*. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com os cafés em nenhum dos testes (Tabela 15). As bebidas de café protegeram contra o aumento do colesterol total, colesterol não *HDL* e triacilgliceróis independente da espécie e do processo de descafeinação.

A diminuição nos níveis de triacilgliceróis em ratos diabéticos tratados com ácido cafeico foi também constatada por Chao, Hsu e Yin (2009). Esses dados reforçam os resultados encontrados nesse estudo, pois o ácido cafeico é um dos polifenóis presentes no café que confere atividade antioxidante ao mesmo.

Um dos mecanismos propostos para explicar a ação dos compostos fenólicos na prevenção de hipercolesterolemia é a interação dos mesmos com moléculas transportadoras das microvilosidades intestinais, reduzindo assim a absorção do colesterol, ou promovendo um aumento na excreção de ácidos biliares. Essa redução na absorção leva ao aumento na expressão de receptores de *LDL-c* no fígado, o que resulta em uma redução sérica dessa lipoproteína, que pode ser verificada pelos níveis de colesterol não HDL (HARDIN-FANNING, 2008; REHRAH et al., 2007).

A niacina presente no café pode ter contribuído na proteção contra o aumento nos níveis de triacilgliceróis e *LDL-c*. No tecido adiposo, a niacina inibe a lipólise dos triacilgliceróis pela lipase sensível a hormônio, reduzindo o

transporte de ácidos graxos livres para o fígado e a síntese hepática de triacilgliceróis (MAHLEY; BERSOT, 2006).

4.4.2 Proteína C reativa

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína plasmática de fase aguda produzida principalmente pelos hepatócitos. Essa proteína é sintetizada pelo fígado em resposta a citocinas, que reflete inflamação ativa sistêmica (LIMA et al., 2007).

Tabela 16 Níveis médios de proteína C reativa no soro (mg.L^{-1}) nos grupos controle negativo (C-), controle positivo (C+) e nos grupos tratados com as bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

Tratamentos	Proteína C reativa (mg.L^{-1})
C-	1,04±0,2
C+	1,12±0,1
AI	1,12±0,1
AD	1,04±0,2
RI	1,12±0,1
RD	1,12±0,1

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

Altos níveis de PCR têm sido associados a um alto risco de doença cardiovascular, uma vez que um processo inflamatório crônico está envolvido na aterosclerose (RIDKER, 2001).

Pelos dados da Tabela 16, observa-se que não houve diferença significativa nos valores de PCR entre os grupos, sugerindo que a administração da dieta hiperlipídica, assim como das bebidas de café, não foram capazes de desencadear resposta inflamatória sistêmica nos animais.

4.4.3 Atividade sérica das enzimas SOD e GPx

Os resultados obtidos mostraram que a dieta hiperlipídica proporcionou um aumento significativo na atividade sérica das enzimas superóxido dismutase e glutatona peroxidase no grupo C+ comparado ao grupo C-. Diferentemente, as bebidas de café reduziram às atividades de ambas as enzimas (Tabela 17).

Tabela 17 Atividade sérica das enzimas SOD e GPx nos grupos controle negativo (C-), controle positivo (C+) e nos grupos tratados com as bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

Tratamentos	SOD (U/mg de proteína)	GPx (μmol de NADPH/mg de proteína)
C-	4,54 \pm 0,3B	1,89 \pm 0,8 x10 ⁻¹³ C
C+	5,25 \pm 0,4A	6,83 \pm 1,3 x10 ⁻¹³ A
AI	4,07 \pm 0,3B	3,95 \pm 1,0 x10 ⁻¹³ B
AD	4,46 \pm 0,2B	3,60 \pm 1,0 x10 ⁻¹³ B
RI	4,25 \pm 0,1B	4,27 \pm 0,5 x10 ⁻¹³ B
RD	4,57 \pm 0,2B	3,42 \pm 0,9 x10 ⁻¹³ B

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

De acordo com a Tabela 17, os animais dos grupos tratados com as diferentes bebidas de café apresentaram atividade de SOD semelhante ao grupo que recebeu dieta normal ($p < 0,05$).

Não houve diferença estatística na atividade enzimática (SOD e GPx) entre os grupos que receberam as diferentes bebidas.

A enzima superóxido dismutase (SOD) tem ação antioxidante, pois catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 . Uma vez produzido, o peróxido de hidrogênio precisa ser destruído, já que participa da reação que produz o radical hidroxila. O H_2O_2 então é eliminado pela glutatona peroxidase

(GPx) e outras enzimas. Para exercer sua função antioxidante a GPx utiliza a glutathiona reduzida (GSH) como cofator e em consequência dessa utilização produz a glutathiona oxidada (GSSG).

Nesse estudo foi determinada a atividade das enzimas SOD e GPx, não a sua expressão, porém um aumento na expressão dessas enzimas pode acarretar no aumento da atividade enzimática, sendo uma das hipóteses para o aumento da atividade enzimática no grupo C+. A produção dessas defesas enzimáticas é induzida pela exposição às espécies reativas de oxigênio, via um mecanismo regulado em nível transcricional (KENSLE; WAKABAYASHI; BISWAL, 2007). Sob condições fisiológicas normais, a transcrição do fator de transcrição nuclear 2 (*Nrf2*) é inibida pela proteína repressora Keap1 localizada no citoplasma das células (ITOH et al., 2003). A proteína Keap1 contém resíduos conservados de cisteína, os quais desempenham um papel crítico na manutenção do *Nrf2* no citoplasma.

Entretanto, um aumento na produção de ERO no organismo promove no citoplasma a dissociação desse complexo, fazendo com que o *Nrf2* fique ativado, sendo transportado para o núcleo (VRIES et al., 2008). No núcleo das células este fator de transcrição se liga a elementos de resposta a antioxidantes (ERA) na região promotora dos genes que transcrevem enzimas antioxidantes endógenas (NGUYEN; SHERRATT; PICKETT, 2003).

A ativação *Nrf2-ARE* induz a produção da superóxido dismutase, catalase, glutathiona peroxidase, glutathiona reduzida, peroxiredoxinas, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH): quinona oxidoreduases (NQOs) e hemoxigenases (DRINGEN, 2005). Juntas essas enzimas e peptídeos representam um potente mecanismo antioxidante de defesa. Uma vez restabelecido o balanço redox da célula, o *Nrf2* é dissociado do núcleo pelo Keap1 e subsequentemente transportado para o citoplasma onde é ubiquitinado e degradado (SUN; ERB; MURPHY, 2005).

A dieta hipercolesterolemianta promove uma piora do balanço redox do organismo, impondo uma maior produção de espécies reativas (KUROSAWA et al., 2005).

Neste estudo foi verificado um aumento na atividade da SOD e GPx séricas em ratos alimentados com a dieta hiperlipídica. Isso possivelmente ocorreu devido ao aumento na produção de EROS induzida pela dieta, uma das hipóteses seria a ativação da via *Nrf2-ARE* para que o organismo contornasse o quadro de estresse.

O tratamento dos animais com as bebidas de café impediu o aumento da atividade das enzimas SOD e GPx no soro dos animais. Os resultados sugerem que componentes antioxidantes e hipolipidêmicos presentes na bebida do café, tais como os compostos fenólicos e a niacina, reduziram os níveis de lipídeos no plasma e a formação de espécies reativas com consequente redução dos eventos pró-oxidantes no compartimento plasmático, mantendo o balanço redox do organismo. Dessa forma, a resposta do organismo em relação à indução da atividade sérica de SOD e GPx seria menor que aquela observada nos animais hiperlipidêmicos não tratados com o café.

Diante disso, os resultados apresentados sugerem que as bebidas de café, independente da espécie e do processo de descafeinação, podem ser eficientes no controle do estresse oxidativo no soro de animais hiperlipidêmicos.

4.4.4 Peroxidação lipídica no plasma

As médias dos teores do marcador de peroxidação lipídica (MDA) no plasma dos animais estudados estão representadas na Tabela 18.

Tabela 18 Teores médios de dialdeído malônico no plasma (nmol MDA/mg proteína) dos grupos controle negativo (C-), controle positivo (C+) e nos grupos tratados com as bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

Tratamentos	MDA (nmol de MDA/mg de proteína)
C-	2,32±0,2
C+	2,84±0,2
AI	2,38±0,2
AD	2,41±0,2
RI	2,44±0,3
RD	2,56±0,4

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

Observa-se que não houve diferença significativa nos níveis de MDA entre os grupos estudados.

Quando se compara o nível de dialdeído malônico (Tabela 7) com a atividade enzimática da SOD e GPx (Tabela 6) no soro dos animais pertencentes aos grupos controle negativo (não hiperlipidêmico) e controle positivo (hiperlipidêmico), observa-se que houve aumento da atividade enzimática no grupo controle hiperlipidêmico enquanto que o teor de MDA foi estatisticamente semelhante entre os diferentes grupos analisados.

Esses resultados sugerem que o sistema de defesa antioxidante foi ativado de maneira proporcional à necessidade gerada pelos eventos pró-oxidantes, impedindo assim o aumento da concentração de MDA no plasma dos animais hiperlipidêmicos (CHENNI et al., 2007).

4.4.5 Atividade das enzimas SOD e GPx no fígado

A Tabela 19 demonstra a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutatona peroxidase no fígado dos ratos.

Tabela 19 Atividade hepática das enzimas SOD e GPx nos grupos controle negativo (C-), controle positivo (C+) e nos grupos tratados com as bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

Tratamentos	SOD (U/mg de proteína)	GPx (μmol de NADPH/mg de proteína)
C-	86,10 \pm 12,0	2,03 \pm 0,2 x10 ⁻¹⁴ C
C+	99,73 \pm 2,0	7,22 \pm 1,2 x10 ⁻¹⁴ A
AI	86,64 \pm 5,1	3,54 \pm 1,1 x10 ⁻¹⁴ B
AD	94,90 \pm 9,7	3,89 \pm 0,9 x10 ⁻¹⁴ B
RI	91,96 \pm 12,3	4,14 \pm 0,7 x10 ⁻¹⁴ B
RD	92,67 \pm 12,0	3,39 \pm 1,5 x10 ⁻¹⁴ B

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

De acordo com a Tabela 19, observa-se que ao contrário dos resultados obtidos no soro, não houve diferença significativa na atividade da atividade da SOD hepática entre os diferentes grupos analisados. Porém, a atividade enzimática da GPx nos animais pertencentes ao grupo controle positivo foi superior aos animais do grupo controle negativo.

O ânion superóxido pode interagir com o óxido nítrico formando peroxinitrito, o que diminuiria a disponibilidade do ânion superóxido, substrato da SOD. O peroxinitrito formado é altamente reativo e pode interagir com lipídeos e consequente formação de hidroperóxidos, esses podem ativar a GPx, já que os hidroperóxidos também são substratos dessa enzima (HALLIWELL, 2007). Essa seria uma hipótese para explicar o aumento na atividade da GPx e não da SOD.

O café proporcionou uma redução na atividade da GPx quando comparado ao grupo controle hiperlipidêmico (C+). Não houve diferença significativa na atividade da GPx entre os grupos tratados com as diferentes bebidas de café.

Os ácidos fenólicos podem exercer efeitos distintos nos órgãos, podendo potencializar a atividade de enzimas antioxidantes ou mesmo neutralizarem diretamente as ERO, preservando o sistema antioxidante endógeno (ANDRADE-WHARTA, 2007). Na condição de um estresse oxidativo, quando há um excesso das enzimas do nosso sistema antioxidante endógeno, os polifenóis e demais antioxidantes ingeridos na dieta podem monitorar essas enzimas (DORMAN et al., 2003).

As isoformas de SOD e GPx encontradas no meio intracelular são diferentes daquelas encontradas nos líquidos extracelulares, podendo portanto, apresentar uma variação na afinidade pelos seus respectivos substratos entre os diferentes compartimentos do organismo. Além disso, a proporção entre o conteúdo de substâncias antioxidantes e pró-oxidantes é altamente variável entre os diferentes órgãos e compartimentos do organismo. Dessa forma a resposta do sistema de defesa antioxidante ao aumento de ERO, pode variar não somente em relação à concentração como também em função do tipo de espécies oxidantes produzidas e do conteúdo de antioxidantes presentes no tecido analisado.

4.4.6 Lipídeos hepáticos totais

As médias dos valores dos lipídeos totais hepáticos estão representadas na Tabela 20.

Tabela 20 Porcentagem de lipídeos hepáticos totais dos grupos controle negativo (C-), controle positivo (C+) e nos grupos tratados com as bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

Tratamentos	Lipídeos totais (%)	Relação peso fígado/peso corpóreo
C-	1,6±1,0 C	0,02±0,003 C
C+	10,8±0,8 A	0,04±0,001 A
AI	7,9±1,1 B	0,03±0,002 B
AD	8,0±0,9 B	0,03±0,001 B
RI	8,1±0,7 B	0,03±0,001 B
RD	8,4±0,3 B	0,03±0,001 B

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

A relação peso fígado/peso corpóreo foi significativamente maior no grupo C+ quando comparada aos demais grupos, indicando que a dieta hiperlipídica conduziu a um dano hepático, promovendo uma hepatomegalia. Nossos resultados mostraram que a bebida do café protegeu contra o aumento no peso do fígado.

A mesma tendência foi verificada no teor de lipídeos, mostrando que o aumento significativo no peso dos fígados dos animais tratados com a dieta hiperlipídica é resultado do acúmulo de gordura hepática. O grupo controle positivo, que recebeu dieta acrescida de colesterol e ácido cólico apresentou um teor de lipídeos hepáticos significativamente maior que o grupo controle negativo, que recebeu dieta padrão, indicando que a dieta hiperlipídica elevou o teor de gordura hepática.

O ácido cólico, além de potencializar o efeito do colesterol dietético, aumentando sua absorção, pode, por outro lado, inibir a conversão de colesterol a ácidos biliares, favorecendo o acúmulo de lipídeos no fígado e promovendo o chamado "fígado gorduroso" nos animais, como foi observado neste estudo (MACHADO et al., 2003).

Os grupos tratados com a dieta hiperlipídica em associação com as bebidas de café tiveram uma diminuição nos níveis de lipídeos quando comparados ao C+.

Entre as bebidas de café, não houve diferença significativa. As bebidas de café, independentemente da espécie e da descafeinação, impediram o acúmulo de gordura no fígado, porém os valores diferem significativamente do C-. As bebidas de café protegeram os animais contra o acúmulo de gordura no fígado, mas não se igualaram aos valores normais encontrado no grupo C-, assim como no perfil lipídico (Tabela 15), o que pode justificar esses resultados.

4.4.7 Peroxidação lipídica no fígado

Os resultados da concentração do marcador de peroxidação lipídica avaliado nesse estudo estão representados na Tabela 21.

Tabela 21 Teores médios de dialdeído malônico no fígado (nmol MDA/mg proteína) dos grupos controle negativo (C-), controle positivo (C+) e nos grupos tratados com as bebidas de café arábica integral (AI), arábica descafeinado (AD), robusta integral (RI) e robusta descafeinado (RD)

Tratamentos	MDA (nmol de MDA/mg de proteína)
C-	43,8±7,0 B
C+	85,7±7,7 A
AI	25,7±4,6 C
AD	30,5±2,9 C
RI	28,4±6,2 C
RD	27,7±4,2 C

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes dentro de cada coluna diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Scott-knott.

Os animais do grupo controle hiperlipidêmico apresentaram teores de MDA superiores ao controle não hiperlipidêmico, sugerindo que apesar do aumento na atividade da GPx, este não foi suficiente para conter a peroxidação lipídica no fígado desses animais.

Foi observado que todos os animais hiperlipidêmicos tratados com as bebidas de café apresentaram uma redução significativa no teor de MDA hepático em relação ao controle hiperlipidêmico (C+). O teor de MDA dos grupos tratados com os cafés foi significativamente menor que os valores encontrados no grupo não hiperlipidêmico (C-), sugerindo que GPx e os compostos antioxidantes presentes no café agiram em sinergismo potencializando o efeito protetor contra a lipoperoxidação.

Além disso, o café protegeu os animais contra o acúmulo de lipídeos hepáticos (Tabela 21), o que consequentemente levou a uma menor susceptibilidade a peroxidação nesses grupos.

Os resultados obtidos nesse estudo estão de acordo com relatos da literatura, nos quais foi também constatado que a dieta hiperlipídica não foi capaz de induzir diferença significativa na atividade da SOD, porém aumentou a atividade da GPx e o teor de MDA em amostras de fígado de ratos (GOKKUSU; MASTAFAZADE, 2003).

De acordo com os trabalhos de Fujioka e Shibamoto (2006), Nardini et al. (2002) e Natella et al. (2002), os ácidos clorogênicos presentes na bebida de café podem ser absorvidos e exercem sua atividade antioxidante nos tecidos animais. A redução dos níveis de TBARS observadas no fígado dos animais em nosso estudo pode ser atribuída à presença destes compostos nas bebidas de café administradas aos ratos.

Os potenciais efeitos benéficos à saúde dos ácidos hidroxicinâmicos e de seus derivados estão relacionados à sua capacidade antioxidante. Diversos estudos demonstram a capacidade dos ácidos hidroxicinâmicos em reduzir o

risco de oxidação da *LDL-c* e diminuir a aterogênese. Segundo Andreasen et al. (2001), a capacidade de inibição da oxidação da *LDL-c* humana pelos ácidos hidroxicinâmicos em ordem decrescente foi a seguinte: ácido cafeico > ácido sinápico > ácido ferúlico > ácido p-cumárico.

Estudos mostram que os compostos fenólicos podem inibir a oxidação da *LDL-c* tanto *in vitro* quanto *in vivo*, conferindo proteção contra a peroxidação lipídica dentro e fora da molécula de *LDL-c*, devido a suas características polares e apolares (DANI et al., 2008; REIN et al., 2000). Em outro estudo verificou-se que a incubação de compostos fenólicos com *LDL-c* diminuiu a susceptibilidade dessas lipoproteínas às modificações oxidativas induzidas pelo cobre, reduzindo a lipoperoxidação lipídica (SAFARI; SHEIKH, 2003).

O processo de descafeinação e a espécie do café não influenciaram na prevenção da peroxidação lipídica. As bebidas de café analisadas apresentam compostos fenólicos, o que pode contribuir, pelo menos em parte, para a atividade antioxidante demonstrada neste estudo. Ainda, a complexação do Fe^{+2} a compostos fenólicos pode reduzir a disponibilidade deste metal envolvido na reação de Fenton, na iniciação e propagação da peroxidação lipídica (LIMA et al., 2006).

Alguns autores (LÓPEZ-GALILEA; PEÑA; CID, 2007) sugeriram que os produtos da reação de Maillard, formados durante a torração do café, apresentam atividade antioxidante e podem, portanto ter contribuído para os resultados do presente trabalho.

O consumo de café, durante 42 dias, foi efetivo na redução da produção de *TBARS* no fígado de ratos, indicando efeito protetor na membrana celular contra o ataque oxidativo.

4.4.8 Análise histológica dos fígados

A vacuolização ou degeneração dos hepatócitos (esteatose hepática) ocorre todas as vezes que um agente interfere no metabolismo dos ácidos graxos da célula, aumentando sua síntese ou dificultando sua utilização, transporte ou excreção (BRASILEIRO FILHO, 2004).

O controle hipercolesterolêmico C+ apresentou um grau acentuado de esteatose hepática, caracterizado por grande número de vacúolos lipídicos, ocupando parte do citoplasma na região periportal e mediozonal, a região centrolobular foi levemente afetada em alguns animais (Fig.1, d).

O grupo AD apresentou 80% de esteatose hepática em um grau moderado e os 20% restantes apresentaram grau leve. Houve uma inversão no grupo AI que apresentou lesão de grau leve em 80% dos casos e grau moderado no restante. O grupo RD apresentou em 60% dos casos lesões moderadas, 30% lesões leves e os 10% restantes lesões acentuadas. No tratamento RI, 60% apresentaram grau leve e 40% grau moderado.

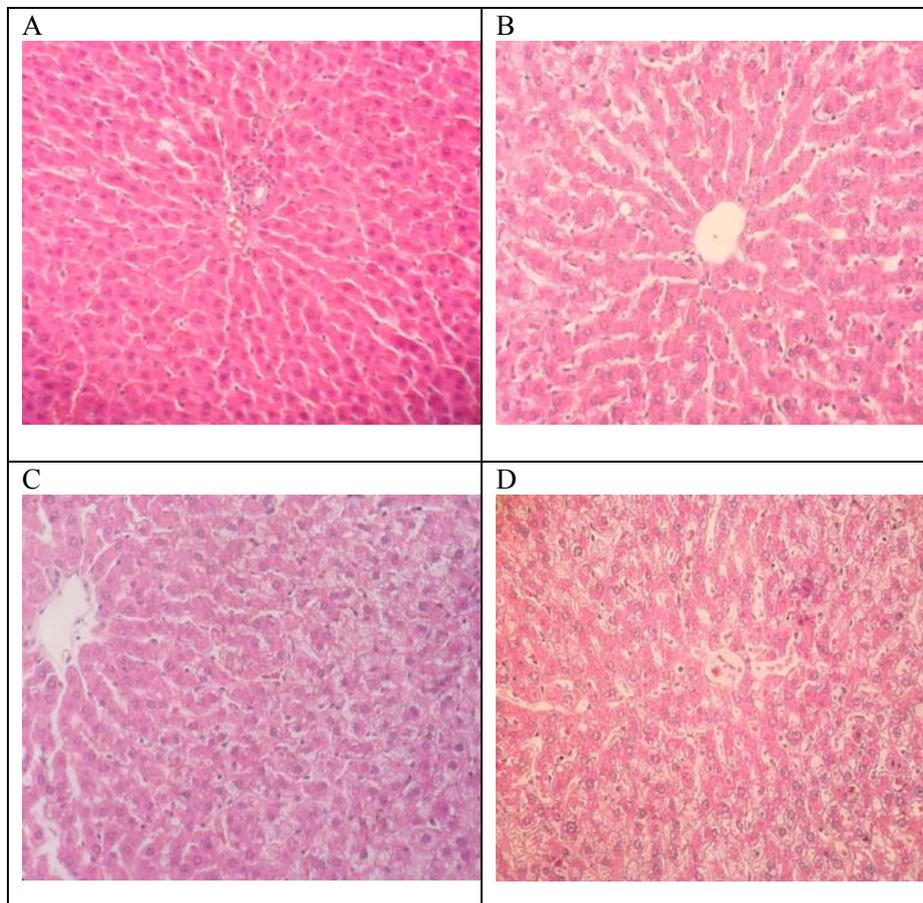


Figura 3 Fotomicrografia do Fígado de Rato. A: normal, tratamento controle; B: Lesão considerada leve (+); C: Lesão considerada moderada (++); D: Lesão considerada acentuada (+++). Coloração: HE, objetiva 40.

Todos os grupos que receberam a bebida do café, integral ou descafeinado, apresentaram uma redução na injúria hepática quando comparados ao grupo C+. Essas observações histológicas reforçam o efeito hepatoprotetor do café e mostra que esse efeito foi dependente da espécie e da descafeinação, com uma clara redução da última em ambas as espécies.

A comparação com a literatura é dificultada devido à variabilidade no preparo e matéria-prima, bem como o método escolhido para avaliação, havendo muita divergência sobre a atividade antioxidante das bebidas de café.

Lima et al. (2010), ao avaliar a atividade antioxidante *in vitro* (DPPH, poder redutor e poder quelante de Fe^{+2}) de amostras de café arábica integral e descafeinado, ambos do mesmo lote, verificaram uma redução significativa da capacidade antioxidante com a descafeinação. Em outro estudo com amostras comerciais de café arábica, robusta, convencional e descafeinado foi observada uma maior capacidade redutora nas amostras da espécie robusta em relação à espécie arábica, entre a amostra convencional e descafeinada não ocorreram diferenças significativas, demonstrando que a cafeína não foi fator determinante na atividade redutora (MOREIRA et al., 2005). Foi verificado ainda que a cafeína, em níveis fisiológicos não demonstrou atividade antioxidante pelo método ORAC e ainda não foi capaz de prevenir a oxidação do *LDL-c* (LEE, 2000).

Eugênio (2010) trabalhou com *blends* de café arábica e robusta e verificou que o aumento da concentração de robusta diminuiu a atividade sequestrante de radicais DPPH.

Ainda não foi completamente esclarecida a real contribuição de cada composto para a atividade antioxidante do café. Quando o produto torrado é avaliado quanto ao seu poder antioxidante, é difícil atribuir qual é a participação relativa aos compostos fenólicos e quanto é devido aos antioxidantes formados pela reação de Maillard.

Além disso, a presença no café 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, ou seja, esses compostos podem atuar de forma aditiva ou mesmo em sinergismo contra a oxidação (YEOMANS; LINSEISEN; WOLFRAM, 2005).

Nos ensaios *in vivo* desse estudo, não foi verificada influência da descafeinação e da espécie na atividade antioxidante demonstrada pelas bebidas de café, com exceção da análise histopatológica que demonstrou uma redução da proteção hepática com a descafeinação e com a espécie de café, entretanto é importante salientar que a avaliação histológica tem um componente subjetivo, depende da avaliação do observador. Diante disso, esse estudo demonstrou que a remoção da cafeína nos cafés não diminui o potencial antioxidante dos mesmos, pois cafés descafeinados apresentaram atividade antioxidante e hipolipidêmica tão relevante quanto os seus respectivos cafés integrais. Os portadores de doenças que não podem ingerir essa substância estimulante, não terão prejuízo em termos de capacidade antioxidante e hipolipidêmica, por utilizarem os cafés descafeinados.

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que:

- a) a descafeinação ocasiona mudanças químicas nas bebidas de café filtrado, em especial uma diminuição nos compostos da fração lipídica do café (ácidos graxos totais, tocoferóis totais e diterpenos totais) e maiores níveis de ácidos cafeoilquínicos e trigonelina foram encontrados nos cafés descafeinados;
- b) as bebidas de café, independente do processo de descafeinação e da espécie, possuem efeito hipolipidêmico e reduzem o estresse oxidativo induzido pela dieta hiperlipídica.

REFERÊNCIAS

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria nº 377**, de 26 de abril de 1999. Regulamento técnico para fixação de identificação e qualidade de café torrado em grão e café torrado e moído. Brasília, 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/377_99.htm>. Acesso em: 12 jun. 2011.

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

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

ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Tocopherols in coffee brews: influence of coffee species, roast degree and brewing procedure. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 23, n. 8, p. 802-808, Dec. 2010.

_____. Tocopherols in espresso coffee: analytical method development and validation. **Food Chemistry**, London, v. 115, n. 4, p. 1549-1555, Aug. 2009.

ANDRADE-WARTHA, E. R. S. **Propriedades antioxidantes de clones do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.):** efeito sobre a lipoperoxidação e enzimas participantes do sistema antioxidante de defesa do organismo animal. 2007. 134 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ANDREASEN, M. F. et al. 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**, Easton, v. 49, n. 8, p. 4090-4096, Aug. 2001.

ASCHERIO, A. et al. Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. **Annals of Neurology**, Boston, v. 50, n. 1, p. 56-63, Jan. 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ. **Curiosidades**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 12 jan. 2012a.

_____. **Dados estatísticos**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 4 nov. 2007.

_____. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 12 jan. 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of the Association of the Agricultural Chemists**. 15th ed. Washington, 2000. 1094 p.

ATLAS eletrônico de histologia: preparação de lâminas histológicas. Disponível em: <http://www.danielbranco.com.br/atlasi/txt_prep.html>. Acesso em: 6 jun. 2011.

BACHSCHMID, M.; SCHILDKNECHT, S.; ULLRICH, V. Redox regulation of vascular prostanoid synthesis by the nitric oxide-superoxide system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 338, n. 1, p. 536-542, Jan. 2005.

BASILE, A. et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 102, n. 1, p. 32-36, Jan. 2005.

BATTRAM, D. S. et al. The glucose intolerance induced by caffeinated coffee ingestion is less pronounced than that due to alkaloid caffeine in men. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 136, n. 5, p. 1276-1280, May 2006.

BELITZ, H. D.; GROSH, W. Coffe, tea, cocoa. In: _____. **Food chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. p. 874-883.

BELL, L. N.; WETZEL, C. R.; GRAND, A. N. Caffeine content in coffee as influenced by grinding and brewing techniques. **Food Research International**, Ottawa, v. 29, n. 8, p. 785-789, Aug. 1996.

BEVERIDGE, T. et al. Sea Buckthorn products: manufacture and composition. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 9, p. 3480-3488, Sept. 1999.

BOEKEL, M. A. J. S. van. Effect of heating on Maillard reactions in milk. **Food Chemistry**, London, v. 62, n. 4, p. 403-414, Apr. 1998.

BOEKSCHOTEM, M. V. et al. Reproducibility of the serum lipid response to coffee oil in healthy volunteers. **Nutrition Journal**, London, v. 2, n. 8, p. 1-8, Aug. 2003.

BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, Dallas, v. 23, n. 1, p. 168-175, Feb. 2003.

BORGES, F. B.; JORGE, J. T.; NORONHA, R. Influence of the fruit's age and ripening at the moment of the harvest on coffee's quality. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 158-163, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. **Portaria nº 377**, de 26 de abril de 1999. Estabelece normas para fixar a identidade e as características mínimas de qualidade do café torrado em grão e café torrado e moído. Brasília, 1999. Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/Legislacao/Portarias/Ant2001/1999/portmf037799.htm>>. Acesso em: 20 out. 2011.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia geral**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 379 p.

BROWN, J. et al. Misclassification of exposure: coffee as a surrogate for caffeine intake. **American Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 153, n. 8, p. 815-820, July 2001.

BURDGE, G. C.; CALDER, P. C. Horizons in nutritional science plasma cytokine response during the postprandial period: a potential causal process in vascular disease? **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 93, n. 1, p. 3-9, Jan. 2005.

BURR, M. L. et al. Instant coffee and cholesterol: a randomised controlled trial. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 49, n. 10, p. 779-784, Oct. 1995.

- CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F.; FARAH, H. G. Caffeine daily intake from dietary sources in Brazil. **Food Additives and Contamants**, London, v. 16, n. 1, p. 79-87, Mar. 1998.
- CAMPA, C. et al. Aspectos morfofisiológicos das cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-416, mar. 2001.
- CAMPANHA, G. et al. Discrimination of coffee species using kahweol and cafestol: effects of roasting and of defects. **Coffee Science**, Lavras, v. 5, n. 1, p. 87-96, jan./abr. 2010.
- CARVALHO, L. M. et al. Aspectos morfofisiológicos das cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 3, p. 411-416, mar. 2001.
- CASAL, S.; OLIVEIRA, B. M.; FERREIRA, M. A. Discriminate analysis of roasted coffees varieties for Trigonelline, Nicotinic acid, and Caffeine content. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 8, p. 3420-3424, Aug. 2000.
- CASTLE, T. J. **The perfect cup: a coffee-lover's guide to buying, brewing, and tasting**. Bedford: Da-Capo, 1991. 244 p.
- CHALFOUN, S. M. **Colheita e preparo do café**. 2000. 36 p. Monografia (Pós-graduação *Lato Sensu* em Cafeicultura Empresarial: Produtividade e Qualidade) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.
- CHAMBEL, P. et al. Development of an HPLC/Diode-Array detector method for simultaneous determination of 5-HMF, Furfural, 5-O-Caffeoylquinic acid and caffeine in coffee. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, New York, v. 20, n. 18, p. 2949-2957, 1997.
- CHAO, P. C.; HSU, C. C.; YIN, M. C. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. **Nutrition and Metabolism**, Basel, v. 6, n. 1, p. 33-39, Mar. 2009.
- CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, n. 9/10, p. 946-962, Sept./Oct. 1999.

CHENNI, A. et al. Effect of aqueous extract of *Ajuca iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 109, n. 2, p. 207-213, July 2007.

CHRISTIAN, M. S.; BRENT, R. L. Teratogen update: evaluation of the reproductive and developmental risks of caffeine. **Teratology**, New York, v. 64, n. 1, p. 51-78, Mar. 2001.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science Food and Agriculture**, Oxford, v. 79, n. 3, p. 363-372, Mar. 1999.

CORDEIRO, M. B. C. Aumento da atividade da superóxido dismutase no eritrócito de retos deficientes em vitamina E e submetidos a nefrectomia subtotal. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, 4., 1996, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: SBAN, 1996. p. 135.

DAGLIA, M. et al. *In vitro* e *ex vivo* antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 6, p. 1700-1704, Feb. 2004.

DANI, C. et al. Intake of purple grape juice as a hepatoprotective agent in wistar rats. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 11, n. 1, p. 127-132, Jan. 2008.

DELGADO-ANDRADE, C.; RUFÍAN-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**, Columbus, v. 53, n. 20, p. 7832-7836, Sept. 2005.

DEVASAGAYAM, T. P. A. et al. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 1282, n. 1, p. 63-70, 1996.

DEVENTER, G. van et al. Lower esophageal sphincter pressure, acid secretion, and blood gastrin after coffee consumption. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 37, n. 4, p. 558-569, Mar. 1992.

DIAS, R. C. E. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) em diferentes graus de torra**. 2005. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

DLUGOSZ, L.; BRACKEN, M. B. Reproductive effects of caffeine: a review and theoretical analysis. **Epidemiology Review**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 83-100, Mar. 1992.

DLUGOSZ, L. et al. Maternal caffeine consumption and spontaneous abortion: a prospective cohort study. **Epidemiological**, Ottawa, v. 7, n. 3, p. 250-255, May 1996.

DOREA, J. G.; COSTA, T. H. M. da. Is coffee a functional food? **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 93, n. 6, p. 773-782, June 2005.

DORMAN, H. J. D. et al. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, London, v. 83, n. 2, p. 255-262, May 2003.

DRINGEN, R. Oxidative and antioxidative potential of brain microglial cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, v. 7, n. 9/10, p. 1223-1233, Aug. 2005.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan. 2002.

DUARTE, S. M. da S. et al. Effect of processing and roasting of the antioxidant activity of coffee brews. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 387-393, dez. 2005.

ESKENAZI, B. et al. Associations between maternal decaffeinated and caffeinated coffee consumption and fetal growth and gestational duration. **Epidemiological**, Ottawa, v. 10, n. 3, p. 242-249, May 1999.

ESQUIVEL, P.; JIMENEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, Barking, v. 46, n. 2, p. 488-495, May 2011.

EUGÊNIO, M. H. A. **Blends de cafés arábica e conilon: avaliações químicas, físicas e sensoriais**. 2010. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

- FLAMENT, I. **Coffee flavor chemistry**. Chichester: J. Wiley, 2002. 424 p.
- FLEMING, I. Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s). **Pharmacological Research**, London, v. 49, p. 525-533, 2004.
- FORTIER, I.; MARCOUX, S.; BEAULAC-BAILLARGEON, L. Relation of caffeine intake during pregnancy to intrauterine growth retardation and preterm birth. **American Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 137, p. 931-940, 1993.
- FRANÇOSO, L. A.; COATES, V. Evidências anatomopatológicas do início da aterosclerose na infância e adolescência. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 131-136, 2002.
- FUJIOKA, K.; SHIBAMOTO, T. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. **Food Chemistry**, London, v. 106, n. 2, p. 217-221, Mar. 2008.
- _____. Quantitation of volatiles and nonvolatiles acids in an extract from coffee beverages: correlation with antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 16, p. 6054-6058, July 2006.
- FUSTER, M. D. et al. Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 48, n. 11, p. 5600- 5603, Nov. 2000.
- GALLARDO, C.; JIMÉNEZ, L.; GARCIA-CONESA, M. T. Hydroxycinnamic acid composition and in Vitro antioxidant activity of selected grain fractions. **Food Chemistry**, Oxford, v. 99, n. 3, p. 455-463, June 2006.
- GOKKUSU, C.; MASTAFAZADE, T. Changes of oxidative stress in various tissues by long-term administration of vitamin E in hypercholesterolemic rats. **Chinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 328, n. 1/2, p. 155-161, Feb. 2003.
- GÓMEZ-RUIZ, J. A.; LEAKE, D. S.; AMES, J. M. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 55, n. 17, p. 6962-6969, Aug. 2007.
- HA, Y. C.; BARTER, P. J. Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. **Comparative and Biochemistry Physiology**, New York, v. 71B, p. 265-269, 1982.

HACKAM, G. D.; ANAND, S. S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. **JAMA**, Rio de Janeiro, v. 290, n. 6, p. 932-940, Dec. 2003.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? **Lancet**, London, v. 344, n. 4, p. 721-724, Apr. 1994.

_____. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs & Aging**, Auckland, v. 18, n. 4, p. 685-716, Aug. 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University, 2007. 266 p.

HARDIN-FANNING, F. The effects of a Mediterranean-style dietary pattern on cardiovascular disease risk. **Nursing Clinics of North America**, Maryland, v. 43, n. 1, p. 105-115, Jan. 2008.

HASKELL, C. et al. Caffeine at levels found in decaffeinated beverages is behaviorally active. **Appetite**, London, v. 50, n. 2/3, p. 555-567, Feb. 2008.

HEUSER, I. Prevention of dementias: state of the art. **Dutsche Medizinische Wochenschrift**, Stuttgart, v. 128, p. 421-422, 2003.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 46, n. 1, p. 101-123, Jan. 2006.

HONING, M. L. H. et al. Endothelial function in diabetes: a disturbed vascular balance. **Diab International Reviews**, Lebanon, v. 8, n. 1, p. 6-10, 1999.

ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: the chemistry of quality**. 3rd ed. San Diego: Academic, 1998. 253 p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo, 1985. v. 1, 533 p.

ITO, G. M. P. et al. Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 94, n. 3, p. 500-509, 2005.

ITO, T. et al. Effect of filtered coffee intake on lipid metabolism. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 52, p. 210-216, 1998.

ITOH, K. et al. Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. **Genes to Cells**, New York, v. 8, p. 379-391, 2003.

IVOGLIO, M. G. F. et al. Divergência genética entre progênies de café robusta. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 4, p. 823-831, dez. 2008.

JHAM, G. N. et al. The use of fatty acid profile as a potential marker for Brazilian coffee (*Coffea arabica* L.) for corn adulteration. **Journal of Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 19, n. 8, p. 1462-1467, 2008.

JOHNSON-KOZLOW, M. et al. Coffee consumption and cognitive function among older adults. **American Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 156, n. 9, p. 842-850, Nov. 2002.

KÁDÁR, A.; GLASZ, T. Development of atherosclerosis and plaque. **Cardiovascular Surgery**, Torino, v. 9, n. 2, p. 109-121, Apr. 2001.

KAWACHI, I. et al. A prospective study of coffee drinking and suicide in women. **Archives International of Medicine**, London, v. 156, n. 5, p. 521-525, 1996.

KENSLER, T. W.; WAKABAYASHI, N.; BISWAL, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annual Review of Pharmacological Toxicology**, Palo Alto, v. 47, p. 89-116, 2007.

KIM, H. G.; HWANG, Y. P.; JEONG, H. G. Kahweol blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 187, n. 1, p. 28-34, Jan. 2009.

KOTEISH, A.; DIEHL, A. M. Animal models of steatosis. **Seminars in Liver Disease**, New York, v. 21, n. 1, p. 89-104, Feb. 2001.

KUROSAWA, T. et al. Suppressive effects of cacao liquor polyphenols (CLP) on LDL oxidation and the development of atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagihypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 179, n. 2, p. 237-246, Apr. 2005.

LAGO, R. C. A. Lipídeos em grãos de café. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 319-340, 2001.

LEE, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 295, n. 1, p. 141-154, Jan. 2000.

LEE, C. M. The art of roasting decaf. **Tea & Coffee Trade Journal**, New York, v. 171, n. 10, p. 90-93, Oct. 1999.

LEE, K. J.; CHOI, J. H.; JEONG, H. G. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 11, p. 2118-2125, Nov. 2007.

LEITE, C. L. **Aceitação e preferência por cafés submetidos a diferentes métodos de extração de cafeína**. 2009. 101 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LEKSE, J. M. et al. Plant catechols prevent lipid peroxidation in human plasma and erythrocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 226, n. 1/2, p. 89-95, Apr. 2001.

LEPAGE, G.; ROY, C. C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 27, n. 1, p. 114-120, Feb. 1986.

LÓPEZ-GALILEA, I.; PEÑA, M. P.; CID, C. Correlation of selected constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: influence of the brewing procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 55, n. 15, p. 6110-6117, July 2007.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, London, v. 420, n. 6917, p. 868-874, Dec. 2002.

LICCIARDI, R. et al. Levels of aqueous xtract, ethereal extract and caffeine in roasted and ground coffees of different brands, from the south of Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 425-429, 2005.

LIMA, A. R. et al. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 4, p. 531-536, dez. 2006.

_____. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 20-24, jan. 2010.

_____. Proteína C reativa ultra-sensível em pacientes com diagnóstico de doença arterial coronariana estabelecido por angiografia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 2, p. 83-86, abr. 2007.

LINDSAY, J. et al. Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. **American Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 156, p. 445-453, 2002.

MACHADO, D. F. et al. Efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e no peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido fólico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 270-275, maio/ago. 2003.

MAHLEY, R. W.; BERSOT, T. P. Terapia farmacológica para a hipercolesterolemia e a dislipidemia. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. (Ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 837-868.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, n. 5, p. 727-747, May 2004.

MANCINI-FILHO, J. et al. Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor* L.) extracts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 104, n. 5, p. 278-281, May 2002.

MARIA, C. A. B. de; MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C. Componentes voláteis do café torrado: parte I, compostos heterocíclicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 209-213, mar./abr. 1999.

MATOBA, T.; SHIMOKAWA, H. Hydrogen peroxide is an endothelium derived hyperpolarizing factor in animals and humans. **Journal of Pharmacological Sciences**, Tokyo, v. 92, n. 1, p. 1-6, Jan. 2003.

MENDONÇA, L. M. V. L.; PEREIRA, R. G. F. A.; MENDES, A. N. G. Parâmetros bromatológicos de grãos crus e torrados de cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 239-243, abr./jun. 2005.

MIYAKE, Y. Relationship of coffee consumption with serum lipids and lipoproteins in Japanese Men. **Annals of Epidemiology**, Sofia, v. 9, n. 2, p. 121-126, 1999.

MONTAGNON, C. et al. Genetic parameters of several biochemical compounds from green coffee, *Coffea canephora*. **Plant Breeding**, Berlin, v. 117, n. 6, p. 576-578, Dec. 1998.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 637-641, jul./ago. 2005.

MORAES, R. C. P.; TRUGO, L. C. Efeito da torrefação e da granulometria na composição química do café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Vitória: UFES, 2001. p. 1511-1517.

MOREIRA, D. P. et al. Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 5, p. 1399-1402, Mar. 2005.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; MARIA, C. A. B. de. Componentes voláteis do café torrado: parte I, compostos heterocíclicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 209-213, mar./abr. 1999.

MOUGIOS, V. et al. Duration of coffee-and exercise-induced changes in the fatty acid profile of human serum. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 94, p. 476-484, 2003.

NAGAI, C. et al. Production of a new low-caffeine hybrid coffee and the biochemical mechanism of low caffeine accumulation. **Euphytica**, Wageningen, v. 164, n. 1, p. 133-142, Nov. 2008.

NAMANE, A. et al. Determination of the adsorption capacity of activated carbon made from coffee grounds by chemical activation with $ZnCl_2$ and H_3PO_4 . **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. B119, p. 189-195, 2005. Supplement.

NARDINI, M. et al. 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**, London, v. 79, n. 1, p. 119-124, Jan. 2002.

NASCIMENTO, E. A. et al. Composição química do café conillon em diferentes graus de torração. **Ciência & Engenharia**, Uberlândia, v. 16, n. 1/2, p. 17-21, 2007.

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

NATELLA, F. et al. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 21, p. 6211-6216, Oct. 2002.

NGUYEN, T.; SHERRATT, P. J.; PICKETT, C. B. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 43, p. 233-260, 2003.

NICOLI, M. C. et al. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. **Lebensmittel - Wissenschaft und - Technologie**, London, v. 30, n. 2, p. 292-297, Apr. 1997.

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

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 131, n. 1, p. 66-71, Jan. 2001.

OYANAGUI, Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 142, n. 2, p. 290-296, Nov. 1984.

PEKER, H. et al. Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide. **Aiche Journal**, New York, v. 38, n. 5, p. 761-770, 1992.

PERRONE, D. et al. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. **Food Chemistry**, London, v. 106, n. 2, p. 859-867, Jan. 2008.

PORTA, M. et al. Coffee drinking: the rationale for treating it as a potential effect modifier of carcinogenic exposures. **European Journal of Epidemiology**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 289-298, Jan. 2003.

PRETE, C. E. C. **Condutividade elétrica do exsudato de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida**. 1992. 125 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1992.

PRIOR, R. L.; XIANLI, W.; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, Apr. 2005.

PUNCHARD, N. A.; KELLY, F. J. **Free radicals: a practical approach**. New York: Oxford University, 1996. 309 p.

QIN, Z. et al. Extracellular superoxido dismutase (ecSOD) in vascular biology: update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. **Translational Research**, New York, v. 51, n. 2, p. 68-78, Apr. 2008.

RAGONESE, P. et al. A case-control study on cigarette, alcohol, and coffee consumption preceding. **Neuroepidemiology**, Basel, v. 22, n. 5, p. 297-304, Oct. 2003.

RAMALAKSHMI, K.; RAGHAVAN, B. Caffeine in coffee: its removal: why and how? **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 39, n. 5, p. 441-456, Sept. 1999.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, jul./ago. 2006.

REHRAH, D. et al. Enhanced cholesterol and triglyceride lowering effect of West African green tea. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, n. 7, p. 1323-1329, May 2007.

REIN, D. et al. Epicatechin in human serum: *in vivo* determination and effect of chocolate consumption on serum oxidation status. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, p. 2109-2114, 2000. Supplement.

RIBEIRO, K. C.; SHINTAKU, R. C. O. A influência dos lipídios da dieta sobre a aterosclerose. **ConScientiae Saúde**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 73-83, 2004.

RICHELLE, M.; TAVAZZI, I.; OFFORD, E. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. **Journal and Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 7, p. 3438-3442, July 2001.

RIDKER, P. M. High-sensitivity C-Reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. **Circulation**, Baltimore, v. 103, n. 13, p. 1813-1818, Apr. 2001.

ROBINSON JUNIOR, W. E. et al. Dicafeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase. **Molecular Pharmacology**, New York, v. 50, n. 4, p. 846-855, Apr. 1996.

ROCHA, D. A. **Avaliação do efeito hipoglicemiante e hipocolesterolêmico do polvilho da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* st. Hil.)**. 2009. 109 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ROGERS, W. J et al. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in development grains from the different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and arabica (*C. arabica*) coffees. **Plant Science**, London, v. 149, n. 2, p. 115-123, Dec. 1999.

ROOS, B. de et al. Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant coffeea. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 8, p. 3065-3069, Aug. 1997.

SABBAGH, N. K.; YOKOMIZO, Y. Efeito da torração sobre algumas propriedades químicas de cafés arábica e robusta. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 7, p. 147-161, 1976.

SAFARI, M. R.; SHEIKH, N. Effects of flavonoids on the susceptibility of lowdensity lipoprotein to oxidative modification. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Victoria, v. 69, n. 1, p. 73-77, 2003.

SALDANA, 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**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 371-376, 1997.

SALVA, T. J. G.; LIMA, V. B. Composição química do café e as características da bebida e do grão. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 57-59, 2007.

SHOLONSKY, A. K.; KLATSKY, A. L.; ARMSTRONG, M. A. Traits of persons who drink decaffeinated coffee. **Annals of Epidemiology**, Sofia, v. 13, n. 4, p. 273, Apr. 2003.

SIGNORI, L. U. et al. O papel da lipemia pós-prandial na gênese da aterosclerose: particularidades do diabetes mellitus. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, São Paulo, v. 51, n. 2, p. 222-231, mar. 2007.

SILVA, C. G. et al. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, London, v. 52, n. 3, p. 229-233, Sept. 2005.

SILVAROLLA, M. B.; MAZZAFERA, P.; FAZUOLI, L. C. A naturally decaffeinated arabica coffee. **Nature**, London, v. 429, n. 6994, p. 826-827, June 2004.

SIN, C. W. M.; HO, J. S. C.; CHUNG, J. W. Y. Systematic review on the effectiveness of caffeine abstinence on the quality of sleep. **Journal of Clinical Nursing**, Oxford, v. 18, n. 1, p. 13-21, Jan. 2009.

SINCLAIR, C. J. D.; GEIGER, J. D. Caffeine use in sport: a pharmacological review. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, Torino, v. 40, n. 1, p. 71-79, Jan. 2000.

SINET, P. M. et al. Increase in glutathione peroxidase activity in erythrocytes from trisomy 21 subjects. **Biochemistry and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 67, p. 910-915, 1975.

SIVETZ, M.; DEROSIER, N. W. **Coffee technology**. Westport: The AVI, 1979. 307 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 88, n. 1, p. 2-19, 2007.

SOMOZA, V. et al. Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using *in vitro* and *in vivo* techniques. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 23, p. 6861-6869, Dec. 2003.

SOUZA, R. M. N. de et al. Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 885-890, jul./ago. 2010.

- SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Pelotas, v. 18, n. 1, p. 201-216, 2006.
- SUN, X.; ERB, H.; MURPHY, T. H. Coordinate regulation of glutathione metabolism in astrocytes by Nrf2. **Biochemistry and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 326, n. 2, p. 371-377, Jan. 2005.
- TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L. C. Effect of decaffeination using dichloromethane on the chemical composition of arabica and robusta raw and roasted coffees. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 965-971, set./out. 2006.
- TRUGO, L. C. Analysis of coffee products. In: TRUGO, L. C.; FINGLAS, P. M. (Ed.). **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. 2nd ed. New York: Academic, 2003. p. 1498-1506.
- TRUGO, L. C.; MORAES, R. C. P. Torrefação e granulometria na composição química. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Brasília: EMBRAPA, 2001. 1 CD-ROM.
- TURATTI, J. M. Extração e caracterização de óleo de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos Expandidos...** Brasília: EMBRAPA Café, 2001. p. 1533-1539.
- URGERT, R. et al. Levels of the cholesterol-elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Columbus, v. 43, n. 8, p. 2167-2172, Aug. 1995.
- VAN-DAM, R. M. Coffee and type 2 diabetes: from beans to beta-cells. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, New York, v. 16, n. 1, p. 69-77, Jan. 2006.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, set./out. 2007.
- VATTEN, L. J.; SOLVOLL, K.; LOKEN, E. B. Coffee consumption and the risk of breast cancer: a prospective study of 14,593 Norwegian women. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 62, p. 267-270, 1990.

- VERSCHUREN, P. M. Functional foods: scientific and global perspectives. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 88, n. 2, p. S125-S130, 2002. Supplement.
- VIDAL, H. M. **Composição lipídica e a qualidade do café (*Coffea arabica* L.) durante armazenamento**. 2001. 93 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- VIGNOLI, J. A. **Efeito da matéria-prima e do processamento nos compostos bioativos e na atividade antioxidante do café**. 2009. 129 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.
- VILAS-BOAS, B. M. et al. Seleção de extratores e tempo de extração para determinação de açúcares em café torrado. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 5, p. 1169-1173, set./out. 2001.
- VRIES, H. E. et al. Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 45, n. 10, p. 1375-1383, Oct. 2008.
- WANG, S. Y. et al. Inhibitory effect on activator protein-1, nuclear factor-kappaB, and cell transformation by extracts of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 10, p. 4187-4193, Oct. 2005.
- WOUW, W. van der et al. Identity of the cholesterol-raising factor from boiled coffee and its effects on liver function enzymes. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 35, n. 4, p. 721-733, Aug. 1994.
- YAMATO, T. et al. Modulation of the stress response by coffee: an *in vivo* microdialysis study of hippocampal serotonin and dopamine levels in rat. **Neuroscience Letters**, Clare, v. 332, n. 2, p. 87-90, Oct. 2002.
- 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**, London, v. 44, p. 422-426, 2005.
- YUKAWA, G. S. et al. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. **Biochemistry**, Moscow, v. 69, n. 1, p. 70-74, Jan. 2004.

ZHAN, H. W. et al. Solvent- and catalyst-free synthesis of dihydropyrimidinthiones in one-pot under focused microwave irradiation conditions. **Chinese Chemical Letters**, Beijing, v. 19, n. 10, p. 1183-1185, Oct. 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabelas de Análise de Variância/ Caracterização das amostras

Variável analisada: CAFÉINA

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFÉS	3	4.188250	1.396083	1345.558	0.0000
erro	16	0.016601	0.001038		

Total corrigido	19	4.204851			

CV (%) =	6.71				
Média geral:	0.4802000	Número de observações:	20		

Variável analisada: TRIGONELINA

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
0.0000					
erro	16	0.008640	0.000540		

Total corrigido	19	0.323320			

CV (%) =	9.37				
Média geral:	0.2480000	Número de observações:	20		

Variável analisada: NIACINA

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFÉS	3	0.000067	0.000022	40.576	0.0000
erro	16	0.000009	5.50000000E-0007		

Total corrigido	19	0.000076			

CV (%) =	5.20				
Média geral:	0.0142500	Número de observações:	20		

Variável analisada: ACQ TOTAIS

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFÉS	3	1.997500	0.665833	380.476	0.0000
erro	16	0.028000	0.001750		
Total corrigido	19	2.025500			
CV (%) =	5.85				
Média geral:	0.7150000	Número de observações:	20		

Variável analisada: TOCOFERÓIS TOTAIS

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFES	3	154.665655	51.555218	164.070	0.0000
erro	16	5.027640	0.314228		
Total corrigido	19	159.693295			
CV (%) =	3.26				
Média geral:	17.2195000	Número de observações:	20		

Variável analisada: ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFÉS	3	17.225500	5.741833	26.011	0.0000
erro	16	3.532000	0.220750		
Total corrigido	19	20.757500			
CV (%) =	4.11				
Média geral:	11.4250000	Número de observações:	20		

Variável analisada: 5-HMF

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFÉS	3	0.000107	0.000036	236.778	0.0000
erro	16	0.000002	1.50000000E-0007		
Total corrigido	19	0.000109			
CV (%) =	6.00				
Média geral:	0.0064500	Número de observações:		20	

Variável analisada: FURFURAL

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFÉS	3	0.002685	0.000895	5115.048	0.0000
erro	16	0.000003	1.75000000E-0007		
Total corrigido	19	0.002688			
CV (%) =	2.57				
Média geral:	0.0163000	Número de observações:		20	

Variável analisada: ACIDEZ TITULÁVEL

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
cafe	7	155390.625000	22198.660714	77.494	0.0000
erro	16	4583.333333	286.458333		
Total corrigido	23	159973.958333			
CV (%) =	4.38				
Média geral:	386.4583333	Número de observações:		24	

Variável analisada: SÓLIDOS SOLÚVEIS

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFÉ	7	192.291667	27.470238	19.391	0.0000
erro	16	22.666667	1.416667		
Total corrigido	23	214.958333			
CV (%) =	4.40				
Média geral:	27.0416667	Número de observações:		24	

Variável analisada: UMIDADE

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFÉ	7	400.111667	57.158810	1652.785	0.0000
erro	16	0.553333	0.034583		
Total corrigido	23	400.665000			
CV (%) =	3.09				
Média geral:	6.0250000	Número de observações:		24	

Variável analisada: AÇÚCARES REDUTORES

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFES	7	2.947497	0.421071	58.592	0.0000
erro	24	0.172475	0.007186		
Total corrigido	31	3.119972			
CV (%) =	14.27				
Média geral:	0.5940625	Número de observações:		32	

Variável analisada: AÇÚCARES TOTAIS

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFES	7	339.544038	48.506291	459.567	0.0000
erro	24	2.533150	0.105548		
Total corrigido	31	342.077188			
CV (%) =	8.44				
Média geral:	3.8493750	Número de observações:		32	

Variável analisada: DENSIDADE APARENTE

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFE	7	0.708729	0.101247	2209.026	0.0000
erro	16	0.000733	0.000046		
Total corrigido	23	0.709463			
CV (%) =	1.26				
Média geral:	0.5387500	Número de observações:		24	

Variável analisada: EXTRATO ETÉREO

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFÉS	7	384.773333	54.967619	258.165	0.0000
erro	16	3.406667	0.212917		
Total corrigido	23	388.180000			
CV (%) =	3.93				
Média geral:	11.7500000	Número de observações:		24	

Variável analisada: FENÓLICOS TOTAIS

VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFÉS	3	2.165080	0.721693	12.804	0.0001
erro	16	0.901800	0.056362		
Total corrigido	19	3.066880			
CV (%) =	3.41				
Média geral:	6.9540000	Número de observações:		20	

TABELA DE ANÁLISE DE

Variável analisada: DITERPENOS

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFÉS	3	1.294215	0.431405	4424.667	0.0000
erro	16	0.001560	0.000098		
Total corrigido	19	1.295775			
CV (%) =	1.38				
Média geral:	0.7175000	Número de observações:		20	

APÊNDICE B– Tabelas de Análise de Variância/ Ensaio biológico

Variável analisada: GPx FÍGADO

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTOS	5	72.204227	14.440845	12.963	0.0000
erro	24	26.736360	1.114015		
Total corrigido	29	98.940587			
CV (%) =	25.66				
Média geral:	4.1126667	Número de observações:		30	

Variável analisada: GPx SORO

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFES	5	65.012267	13.002453	13.493	0.0000
erro	24	23.126680	0.963612		
Total corrigido	29	88.138947			
CV (%) =	24.57				
Média geral:	3.9953333	Número de observações:		30	

Variável analisada: COLESTEROL NÃO HDL

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFE	5	7057.866667	1411.573333	22.353	0.0000
erro	24	1515.600000	63.150000		
Total corrigido	29	8573.466667			
CV (%) =	10.97				
Média geral:	72.4666667	Número de observações:		30	

Variável analisada: SOD FÍG

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFÉS	5	660.356297	132.071259	1.410	0.2562
erro	24	2247.720600	93.655025		
Total corrigido	29	2908.076897			
CV (%) =	10.52				
Média geral:	91.9996667	Número de observações:		30	

Variável analisada: SOD SORO

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFE	5	4.087707	0.817541	7.429	0.0002
erro	24	2.641160	0.110048		
Total corrigido	29	6.728867			
CV (%) =	7.33				
Média geral:	4.5266667	Número de observações:		30	

Variável analisada: COLESTEROL TOTAL

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFE	5	6826.000000	1365.200000	12.773	0.0000
erro	24	2565.200000	106.883333		
Total corrigido	29	9391.200000			
CV (%) =	12.22				
Média geral:	84.6000000	Número de observações:		30	

Variável analisada: LIPÍDEOS TOTAIS NO FÍGADO

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFÉS	5	237.739667	47.547933	67.029	0.0000
erro	24	17.024720	0.709363		
Total corrigido	29	254.764387			
CV (%) =	11.32				
Média geral:	7.4406667	Número de observações:		30	

Variável analisada: HDL-C

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFÉ	5	6.166667	1.233333	0.484	0.7849
erro	24	61.200000	2.550000		
Total corrigido	29	67.366667			
CV (%) =	11.60				
Média geral:	13.7666667	Número de observações:		30	

Variável analisada: MDA FÍGADO

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTOS	5	13427.793667	2685.558733	81.742	0.0000
erro	24	788.496000	32.854000		
Total corrigido	29	14216.289667			
CV (%) =	14.22				
Média geral:	40.2966667	Número de observações:		30	

Variável analisada: MDA PLASMA

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTOS	5	0.879577	0.175915	2.438	0.0638
erro	24	1.731960	0.072165		
Total corrigido	29	2.611537			

Variável analisada: PROTEÍNA C REATIVA

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFE	5	0.042667	0.008533	0.229	0.9464
erro	24	0.896000	0.037333		
Total corrigido	29	0.938667			
CV (%) =	17.67				
Média geral:	1.0933333	Número de observações:		30	

Variável analisada: TRIACILGLICERÓIS

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CAFES	5	5307.466667	1061.493333	30.620	0.0000
erro	24	832.000000	34.666667		
Total corrigido	29	6139.466667			
CV (%) =	11.65				
Média geral:	50.5333333	Número de observações:		30	