

**EFEITO DA DESCAFEINAÇÃO DO CAFÉ  
SOBRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
PREVENÇÃO DE LESÃO HEPÁTICA EM  
RATOS**

**ADRIENE RIBEIRO LIMA**

**2008**

**ADRIENE RIBEIRO LIMA**

**EFEITO DA DESCAFEINAÇÃO DO CAFÉ SOBRE A ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E PREVENÇÃO DE LESÃO HEPÁTICA EM RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

**Orientadora:**

**Prof. Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2008**

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

Lima, Adriene Ribeiro.

Efeito da descafeinação do café sobre a atividade antioxidante e prevenção de lesão hepática em ratos / Adriene Ribeiro Lima . -- Lavras : UFLA, 2008.  
90 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga

Bibliografia.

1. Café. 2. Descafeinação. 3. Antioxidante. 4. Radicais livres.  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-663.93

**ADRIENE RIBEIRO LIMA**

**EFEITO DA DESCAFEINAÇÃO DO CAFÉ SOBRE A ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E PREVENÇÃO DE LESÃO HEPÁTICA EM RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre.

**APROVADA em 25 de junho de 2008**

**Profa. Dra. Stella Maris da Silveira Duarte** **UNIFAL-MG**

**Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula** **UNIFAL-MG**

**Prof. Dr. Raimundo Vicente de Souza** **UFLA**

**Profa. Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira**  
**UFLA**  
**(Orientadora)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS - BRASIL**  
**2008**

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Evandro pelo carinho e paciência durante toda a realização deste trabalho.

A Sheila, minha parceira de trabalho, pela amizade e pela colaboração essencial.

Às minhas companheiras de república e amigas Cíntia, Cynthia, Fernanda e Vívian pelo apoio e pelos momentos alegres proporcionados durante os anos de convivência.

A Glêndara pelo companheirismo e pela valiosa ajuda no abstract.

Às minhas amigas Carol, Joyce, Marry, Valéria e Stefânia pelo apoio e amizade que muito acrescentaram ao meu trabalho.

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

À professora Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira pela oportunidade, pela valorização do meu trabalho, por sua amizade e valiosos ensinamentos que só me fizeram crescer.

À Universidade Federal de Alfenas, à professora Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula pelo apoio nas análises e, em especial, à minha co-orientadora professora Dra. Stella Maris da Silveira Duarte pela calorosa recepção em Alfenas, pela colaboração, amizade e ensinamentos transmitidos durante o desenvolvimento do trabalho.

A Eliana pelo valioso auxílio no tratamento das cobaias.

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

Ao pessoal do Laboratório de Produtos Vegetais, meus primeiros contatos no DCA, Tina, Creusa, Sandra, Sr. Miguel, pessoas especiais que com certeza contribuíram para o meu ingresso no mestrado.

À CAPES por financiar meu curso com o pagamento mensal da bolsa de estudos.

À COCAM pela concessão das amostras de café.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1 Características das espécies e importância econômica do café.....	3
2.2 Torração, moagem e preparo da bebida.....	4
2.3 Composição química.....	7
2.4 Propriedades bioquímicas e antioxidantes da cafeína.....	14
2.5 Processos de descafeinação.....	20
2.6 Oxidações biológicas.....	23
2.6.1 Lipoperoxidação.....	25
2.7 Proteção antioxidante do café.....	26
2.8 Café e saúde.....	27
2.9 Hepatoproteção do café.....	29
2.10 Fígado e o sistema de biotransformação.....	30
2.11 Indicadores biológicos de injúria hepática.....	31
2.12 Injúria hepática por tetracloreto de carbono.....	33
2.13 Esteatose hepática.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Matéria-prima e locais de execução.....	36
3.2 Preparo da amostra.....	36
3.3 Análise de cor.....	36

3.4 Preparo da bebida.....	37
3.5 Análise de sólidos solúveis.....	37
3.6 Determinação de fenólicos totais.....	38
3.7 Determinação dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico....	38
3.8 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	39
3.8.1 Atividade seqüestrante de radicais livres DPPH.....	39
3.8.2 Avaliação do poder redutor.....	39
3.8.3 Avaliação da atividade quelante de íons Fe <sup>2+</sup> .....	40
3.9 Ensaio biológico.....	40
3.9.1 Determinação de marcadores de função hepática.....	41
3.9.2 Determinação da inibição da peroxidação de lipídeos.....	41
3.9.3 Determinação da concentração de proteínas do homogeneizado de fígado.....	42
3.9.4 Determinação de lipídeos totais no fígado.....	43
3.10 Delineamento experimental.....	43
3.11 Análise estatística.....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Análise de cor.....	46
4.2 Compostos fenólicos.....	46
4.3 Sólidos solúveis.....	47
4.4 Cafeína, trigonelina e ácido clorogênico.....	48
4.5 Atividade seqüestrante de radicais DPPH.....	51
4.6 Poder redutor.....	54
4.7 Poder quelante de Fe <sup>2+</sup> .....	56
4.8 Provas de função hepática.....	58
4.8.1 Atividade das transaminases ALT e AST.....	58
4.8.2 Albumina e proteínas totais séricas.....	61
4.9 Lipídeos totais do fígado.....	63

4.10 Inibição da peroxidação de lipídios <i>in vivo</i> .....	65
5 CONCLUSÕES.....	67
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXOS.....	84

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>TABELA 1</b> Teores (%) de alguns constituintes de grãos crus e torrados das espécies arábica e robusta.....	8
<b>TABELA 2</b> Quantidade de xícaras de café necessárias para causar determinados efeitos fisiológicos relacionados à cafeína.....	16
<b>TABELA 3</b> Análise de cor dos grãos de café torrado e moído, de acordo com os parâmetros de cromaticidade da escala CIE L* a* b*.....	45
<b>TABELA 4</b> Conteúdo de polifenóis (g eq. ac. tânico / 100g) de dois tipos de bebida do café submetido a dois tipos de processamento.....	46
<b>TABELA 5</b> Conteúdo de sólidos solúveis totais (%) das bebidas de cafés verdes e torrados.....	47
<b>TABELA 6</b> Atividade sequestrante do radical DPPH (%) das bebidas de café integral e descafeinado, verde e torrado, em quatro concentrações.....	52
<b>TABELA 7</b> Poder redutor (%) da bebida de café integral e descafeinado, verde e torrado.....	55
<b>TABELA 8</b> Poder quelante de Fe <sup>2+</sup> (%) da bebida de café integral e descafeinado, verde e torrado.....	56
<b>TABELA 9</b> Concentração da enzima ALT (U/L) nos grupos tratados com as amostras de café integral e descafeinado submetidos a dois processamentos (verde e torrado) e nos grupos controle.....	59
<b>TABELA 10</b> Concentração da enzima AST (U/L) nos grupos tratados com as amostras de café integral e descafeinado submetidos a dois processamentos (verde e torrado) e nos grupos controle.....	60

<b>TABELA 11</b> Concentração sérica de albumina (g/dL) nos grupos tratados com as amostras de café integral e descafeinado submetidos a dois processamentos (verde e torrado) e nos grupos controle.....	61
<b>TABELA 12</b> Concentração sérica de proteínas totais (g/dL) nos grupos tratados com as amostras de café integral e descafeinado submetidos a dois processamentos (verde e torrado) e nos grupos controle.....	62
<b>TABELA 13</b> Concentração de lipídeos totais no fígado (%) em relação à matéria integral nos grupos tratados com as amostras de café integral e descafeinado submetidos a dois processamentos (verde e torrado) e nos grupos controle.....	64
<b>TABELA 14</b> Teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol de MDA/mg de proteína) nos grupos tratados com as amostras de café integral e descafeinado submetidos a dois processamentos (verde e torrado) e nos grupos controle.....	65

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>FIGURA 1</b> Estrutura química da trigonelina (A), do ácido 5-cafeoilquínico (B) e da cafeína (C).....	11
<b>FIGURA 2</b> Teores médios de ácido clorogênico (5-ACQ), cafeína e trigonelina em cafés integral verde (IV), descafeinado verde (DV), integral torrado (IT) e descafeinado torrado (DT). Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Scott-knott.....	49
<b>FIGURA 3</b> Atividade sequestrante de radicais livres DPPH de diferentes concentrações do padrão BHT e das bebidas de café verde e torrado, integral e descafeinado.....	53
<b>FIGURA 4</b> Atividade quelante de $Fe^{2+}$ (%) de diferentes concentrações das bebidas de café verde e torrado, integral e descafeinado.....	57

## RESUMO

LIMA, Adriene Ribeiro. **Efeito da descafeinação do café sobre a atividade antioxidante e prevenção de lesão hepática em ratos**. 2008. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG\*.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da descafeinação do café sobre a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e sobre a prevenção de lesão hepática em ratos. Em todos os experimentos, a bebida foi preparada segundo uma mesma metodologia. Foram determinados os teores de compostos fenólicos, ácido clorogênico, cafeína, trigonelina e sólidos solúveis nas bebidas. A avaliação *in vitro* da atividade antioxidante foi verificada através dos métodos de seqüestro do radical DPPH, poder redutor e atividade quelante de metais. Os animais receberam doses intraperitoneais de tetracloreto de carbono e doses diárias das bebidas de café por gavagem. Após o tratamento, foram avaliados os parâmetros bioquímicos AST, ALT, proteínas totais e albuminas séricas, além da avaliação da peroxidação lipídica. As bebidas não apresentaram diferenças significativas de cor e sólidos solúveis. A concentração de polifenóis, ácido clorogênico, trigonelina e cafeína diminuiu com o processo de descafeinação. A bebida do café, independentemente do processo de descafeinação, apresentou poder redutor, atividade quelante de metais e atividade seqüestrante de DPPH. As bebidas de café inibiram significativamente a injúria hepática induzida pelo tetracloreto de carbono quando comparada ao grupo controle. Os resultados demonstram que a bebida do café tem ação hepatoprotetora, independentemente do processo de descafeinação.

**Palavras-chave:** café, descafeinação, antioxidantes, radicais livres.

---

\*Comitê Orientador: Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira - UFLA (Orientadora); Dra. Stella Maris da Silveira Duarte – UNIFAL-MG (Co-Orientadora).

## ABSTRACT

LIMA, Adriene Ribeiro. **Effect of decaffeination of coffee on the antioxidant activity and prevention of liver injury in rats**. 2008. 90 p. Dissertation (Master degree in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG\*.

The present study aimed at evaluating the effect of the coffee decaffeination on the antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* and on the prevention of liver injury in rats. In all experiments the beverages was prepared according to a same methodology. There were certain the content of phenolic compounds, chlorogenic acids, caffeine, trigonelline and soluble solids in beverages. The assessment *in vitro* antioxidant activity was detected by the methods of scavenging of radical DPPH, reducing power and chelation activity of metals. The animals had received intraperitoneally doses from carbon tetrachloride and daily doses of coffee for gavages. After the treatment, the AST, ALT parameters, serum total protein and serum albumin were assessed in addition to the assessment of lipid peroxidation. The beverages did not present significant differences in color and soluble solids. The concentration of polyphenols, chlorogenic acids, caffeine and trigonelline decreased with the decaffeination process. The coffee drink, irrespective of the decaffeination process, presented reducing power, chelating activity of metals and scavenging activity of DPPH. The coffee drinks inhibited significantly the liver injury caused by carbon tetrachloride when compared to the control group. The results prove that the coffee drink has a hepatoprotector action, irrespective of the decaffeination process.

**Key words:** coffee, decaffeination, antioxidants, free radicals.

---

\*Guidance Committee: Dra. Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga Pereira - UFPA (Adviser); Dra. Stella Maris da Silveira Duarte – UNIFAL-MG (Co-Adviser).

## 1 INTRODUÇÃO

O café é um dos mais valiosos produtos da economia global e sua bebida é uma das mais consumidas no mundo. Dentro do cenário brasileiro, é uma das commodities mais economicamente expressivas dada a sua participação na receita cambial, transferência de renda aos outros setores da economia, contribuição à formação de capital no setor agrícola do país, além de sua capacidade de absorção de mão-de-obra.

O alto consumo mundial do produto tem estimulado o desenvolvimento de estudos relacionados à atividade biológica do grão e de constituintes do café verde, especialmente do café torrado que é utilizado para preparar diferentes tipos de bebidas. Cada vez mais pesquisas apontam o café como uma bebida com efeitos terapêuticos, já que possui propriedades benéficas quando consumido em doses adequadas. Entre os efeitos biológicos encontram-se ações antioxidantes, antimutagênicas, antibióticas, antihipercolesterolêmicas, antihipertensivas e anticarcinogênicas (Cavin et al., 2002).

Vários estudos indicam que o café exerce efeito protetor no fígado contra doenças graves como a cirrose e reduz o risco de desenvolver hepatocarcinoma, que é a forma de câncer mais freqüente no fígado, devido aos compostos antioxidantes presentes na bebida. Entre os compostos químicos investigados, destacam-se os ácidos clorogênicos, melanoidinas e a cafeína.

A cafeína é uma das substâncias psicoativas mais consumidas no mundo. Muitos trabalhos têm sido realizados sobre os efeitos fisiológicos desta substância, enquanto alguns estudos sugerem uma possível associação entre consumo de café integral e incidência de câncer (Avanzo et al., 1993), outros estudos correlacionam seu consumo à diminuição da incidência de cirrose (Klatsky et al., 1993).

As variações nas concentrações da cafeína e dos outros componentes,

assim como o volume do café consumido, são freqüentemente ignorados nos estudos que buscam relacionar as taxas de consumo e o seu efeito à saúde. Isto explica parcialmente a ocorrência de discrepâncias nos resultados relatados por estudos epidemiológicos. Tal dicotomia acaba por acarretar um aumento do consumo de café descafeinado, muitas vezes por aconselhamento médico.

As análises de dados do perfil dos consumidores de café descafeinado revelaram que as pessoas que consomem café descafeinado o fazem devido a algum tipo de doença, principalmente as cardiovasculares, ou simplesmente porque procuram um estilo de vida mais saudável, com baixa incidência de tabagismo, baixo consumo de bebidas alcoólicas e cafeinadas e aumento do consumo de medicamentos para prevenir doenças (Shlonsky et al., 2003).

A descafeinação é realizada nos grãos crus inteiros, antes do processo de torrefação. A maioria dos métodos de descafeinação existentes utiliza solventes para extração da cafeína, como o diclorometano, clorofórmio, álcool, acetona, água e outros, sendo o diclorometano, o mais utilizado no Brasil. Durante a extração da cafeína, a perda de outros componentes é muito provável. No entanto, embora existam vários estudos sobre a composição química do café integral, pouco se sabe sobre a composição do café descafeinado e seu efeito na saúde.

Durante as últimas cinco décadas, o consumo mundial, *per capita*, de cafeína dobrou através do consumo de água cafeinada, de bebidas energéticas e, principalmente, do café (Durrant, 2002). Por este motivo, muitos trabalhos têm sido realizados sobre os efeitos fisiológicos desta substância, cujos resultados, no entanto, ainda não consensuais sobre seus efeitos positivos e negativos.

Dessa forma, o presente estudo pretende contribuir para o conhecimento dessa questão na medida em que tem por objetivo avançar na análise de um de seus aspectos: o efeito da descafeinação sobre a atividade antioxidante da bebida do café *in vitro* e *in vivo* e prevenção de lesão hepática em ratos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Características das espécies e importância econômica do café

O cafeeiro pertence à família botânica Rubiaceae, constituída por aproximadamente 500 gêneros e cerca de 6.000 espécies. Existe um grande número de variedades, sendo que as duas mais cultivadas no Brasil são Catuaí, aproximadamente 60% do total e Mundo Novo, com cerca de 35% (Matiello, 2004). Dentre as espécies mais importantes economicamente, destacam-se *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre, conhecidas como café arábica e café robusta (conilon), respectivamente (Associação Brasileira da Indústria de café – ABIC, 2007a). Os cafés arábica e conilon diferem consideravelmente no preço, qualidade e aceitabilidade, produzindo tipos de bebidas diferentes. Com o café arábica são feitas bebidas de melhor qualidade, enquanto que o conilon é utilizado preferencialmente para a fabricação de cafés solúveis por apresentar elevado teor de sólidos solúveis (Mendes, 1999).

Estima-se que o café tenha sido descoberto há mais de mil anos no Oriente Médio, quando um pastor etíope observou que suas cabras tornavam-se mais espertas e resistentes após comerem uma pequena cereja, o fruto do cafeeiro. Os árabes foram os primeiros a cultivar o café e a usá-lo como bebida, por isso o nome científico *Coffea arabica* L. Embora os árabes tenham tomado certas medidas para manter o monopólio da produção de café, os holandeses conseguiram contrabandear frutos frescos e, graças a eles, o café começou a ser conhecido pelo mundo. Por intermédio de comerciantes venezianos, o café foi levado para a Europa em 1615, onde passou a ser utilizado como bebida, principalmente devido à crença difundida de que possuía qualidades medicinais. Dessa forma, o café foi rapidamente disseminado pelos continentes, chegando ao continente americano em 1668 e tornando-se uma das bebidas mais aceitas pela

população de grande número de países. O produto só chegou ao Brasil em 1727, sendo cultivado no Vale do Paraíba em São Paulo, região cujas terras férteis e clima favorável transformaram o país no maior produtor mundial a partir do final do século XIX (International Coffee Organization - ICO, 2005).

Ainda hoje, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor, atrás apenas dos Estados Unidos. O café é um dos mais valiosos produtos na economia global, sendo o produto mais consumido no mundo e o segundo maior mercado depois do petróleo, movimentando anualmente recursos na ordem de 15 bilhões de dólares (ABIC, 2007b).

As áreas produtoras de café no Brasil estão distribuídas, sobretudo, na região centro-sul, nos estados de Espírito Santo, São Paulo, Paraná e Minas Gerais, particularmente, a região Sul do estado que se caracteriza pela produção de cafés de excelente qualidade devido às suas condições de clima e solo favoráveis ao desenvolvimento da cultura, sendo responsável pela produção de 25% do café brasileiro (Silva et al., 2005).

## **2.2 Torração, moagem e preparo da bebida**

A torração provoca mudanças nos grãos tanto físicas, com 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).

Desde a entrada do grão verde até a descarga, o tempo total gasto na torração varia em geral de 5 a 10 minutos em torrador contínuo até mais de 20 minutos em torrador não contínuo. A maioria das máquinas artesanais de torra 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, M. et al., 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 em torno de 100 a 104°C (Borges, M. et al., 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 torra propriamente dita, a cor dos grãos varia de marrom claro a escuro (Borges, M. et al., 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, ácido acético e seus homólogos aldeídos, cetonas, furfural, ésteres, ácidos graxos, aminas, CO<sub>2</sub>, sulfetos, entre os principais. 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 torra desejado, determinado pela mudança de coloração do grão (Vilas-Boas et al., 2001). A partir deste ponto, faz-se necessário o resfriamento imediato dos grãos (terceiro estágio), para evitar a carbonização (Borges, M. et al., 2002). Os torrefadores usam resfriamento com banhos, o que provoca uma absorção de água pelos grãos. Para evitar efeitos sensoriais indesejáveis, é necessário que a umidade máxima na torra seja de aproximadamente 3%, valores superiores correspondem a grãos amolecidos, reduzindo o número de partículas finas na moagem (Carvalho et al., 1997).

Existe escassez de informação que permita o estabelecimento de

correlação entre as características da matéria-prima, os parâmetros do processo de torra e a qualidade final do produto (Borges, F. et al., 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 torra 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 (ABIC, 2007c).

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 também pode ser 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). Com moagem muito fina, a água levará mais tempo para passar pelo pó, resultando numa extração superior. A temperatura final da bebida pode diminuir, tornando-a desagradável. Porém, se a moagem for muito grossa, a água passará rapidamente pelo pó, não permitindo extração adequada. Por isso, a moagem média é a mais encontrada no mercado (ABIC, 2007c).

O preparo da bebida é feito através de diversos processos entre os quais o de infusão, em que se adiciona água quente ao café torrado e moído; de filtração, percolação, prensagem ou pressão, sendo que cada um destes processos 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 (ABIC, 2007c).

A qualidade da bebida do café, caracterizada por seu sabor e aroma, é influenciada por diversos fatores pré e pós-colheita que garantem a expressão final da qualidade do produto (Carvalho et al., 1997). Dentre os fatores pré-colheita, destacam-se a espécie e variedades de café, o local de cultivo, a maturação dos grãos, a incidência de microrganismos e o efeito de adubações. Em relação aos fatores pós-colheita, destacam-se as fermentações enzimáticas e microbianas, os processos de armazenamento do café beneficiado, as misturas (*blending*) e a torração dos grãos (Amstalden et al., 2001).

### **2.3 Composição química**

A composição química do grão cru do café depende de fatores genéticos, ambientais e condições de manejo pré e pós-colheita, sendo a torração uma etapa essencial para a produção de compostos que conferem as características de aroma e sabor do café. Alguns dos principais compostos presentes nos grãos de cafés verdes e torrados são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 Teores (%) de alguns constituintes de grãos crus e torrados das espécies arábica e robusta.

	Composição média			
	(% matéria seca)			
	Arábica Cru	Arábica torrado	Robusta cru	Robusta torrado
Caféina	0,9-1,2	1,0-1,3	1,6-2,0	1,7-2,4
Trigonelina	1,0-1,2	0,5-1,0	0,7-1,0	0,3-0,7
Cinzas	3,0-4,2	3,0-4,5	4,0-4,4	4,0-6,0
Ácido Clorogênico	5,5-8,0	2,5-4,5	7,0-10,0	3,8-4,6
Outros ácidos	1,5-2,0	1,0-2,4	1,5-2,0	1,0-2,6
Sacarose	6,0-8,0	0,0	5,0-7,0	0,0
Açúcares redutores	0,1-1,0	0,2-0,3	0,4-1,0	0,2-0,3
Polissacarídeos	44,0-55,0	24,0-39,0	37,0-47,0	25,0-37,0
Proteínas	11,0-13,0	7,8-10,4	11,0-13,0	7,8-10,4
Aminoácidos	0,5	0,0	0,8	0,0
Lipídeos	14,0-16,0	14,0-20,0	9,0-13,0	11,0-16,0

Fonte: Ramalakshmi & Raghavan (1999).

Os açúcares e as proteínas dos grãos crus 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 muito complexo, sendo que alguns de seus precursores são os lipídios, 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).

Em ordem de abundância, os constituintes do café torrado solúveis em água são: polímeros fenólicos 8%, polissacarídeos 6%, ácidos clorogênicos 4%, minerais 3%, cafeína 1%, ácidos orgânicos 0,5%, açúcares 0,3%, lipídeos 0,2% e compostos aromáticos 0,1% (Clarke & Macrae, 1989).

A trigonelina (Figura 1) 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 torra, entre os quais estão as piridinas e o N-metilpirrol (Moreira et al., 1999). O café é um dos únicos produtos que, mediante um processo tão drástico como a torrefação, produz uma vitamina importante para o metabolismo humano, a niacina ou ácido nicotínico. Durante a torrefação, a trigonelina sofre desmetilação para formar a niacina, por isso o grau e o tempo de torrefação do café, versus temperatura, podem ser estimados fazendo-se a relação do teor de trigonelina com o de niacina resultante da sua degradação térmica (Clarke & Macrae, 1985).

A niacina presente no café tem mais biodisponibilidade que a niacina em forma ligada, presente em outras fontes alimentares (Trugo, 2003). O ácido nicotínico é uma importante vitamina para o metabolismo humano, podendo ser encontrado em quantidades que chegam próximo a 20 mg para cada 100 g de café torrado dependendo, evidentemente, do grau de torrefação do café (Monteiro & Trugo, 2005).

A cafeína é o mais conhecido constituinte do café devido às suas propriedades fisiológicas e farmacológicas. É um alcalóide farmacologicamente ativo pertencente ao grupo das xantinas, altamente resistente ao calor, inodoro e com sabor amargo bastante característico que contribui de forma importante para o sabor e aroma do café (Monteiro & Trugo, 2005). Embora a cafeína seja o principal alcalóide presente no café, também são encontradas quantidades

reduzidas de teofilina e teobromina. Os três compostos contêm um esqueleto de purina que é amplamente difundido pela natureza, sendo detectado em compostos metabólicos importantes, tais como a xantina, ácidos nucleicos e ácido úrico (Trugo et al., 2000).

A cafeína (Figura 1) (1,3,7-trimetilxantina) é uma substância presente em uma ampla variedade de bebidas, entre as quais se destaca o café. Ela é desmetilada por enzimas do citocromo hepático P-4501A2 a 1,7-dimetilxantina e, em menor extensão, a 3,7-dimetilxantina e 1,3-dimetilxantina em humanos. Após esta 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. A cafeína se encontra na polpa e no endosperma -- no citoplasma do grão -- ligada à parede celular (Trugo, 2001).

O teor de cafeína no café apresenta uma variação que depende, dentre outros fatores, da espécie da planta utilizada. O tipo arábica apresenta um teor médio de 1,22 % e o conilon, 2,54 % (teores em base seca) (KY et al., 2001). Estes valores são alterados após a torra: em torno de 1 % para o arábica e 2 % para o conilon. Observa-se que a cafeína tem relativa estabilidade à torração mesmo com o emprego de altas temperaturas (200 - 230°C) (Trugo et al., 2000).

Seu consumo de baixas a moderadas doses pode resultar em efeito estimulante do sistema nervoso central, com possível diminuição do sono e aumento na capacidade de concentração. No entanto, em altas doses e em indivíduos com sensibilidade aumentada, a cafeína pode causar efeitos negativos como ansiedade, inquietação, insônia e taquicardia (Nehlig, 1999; Trugo, 2003).

Na literatura científica, os principais aspectos relacionados a possíveis efeitos adversos do consumo excessivo de cafeína estão descritos em relação ao sistema cardiovascular, ao desenvolvimento fetal e à tolerância metabólica.

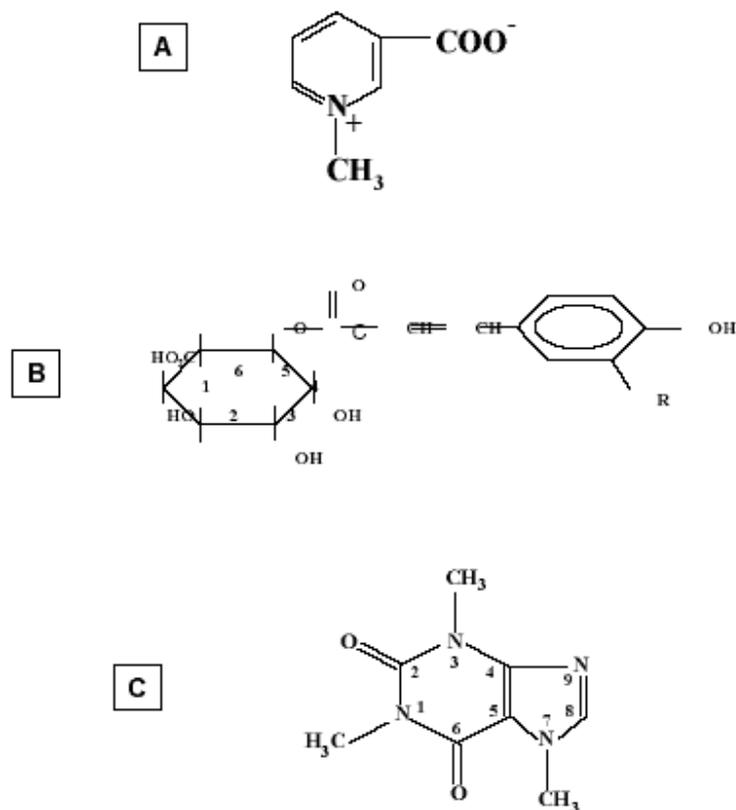


FIGURA 1 Estrutura química da trigonelina (A), do ácido 5-cafeoilquínico (B) e da cafeína (C) (Nogueira & Trugo, 2003).

Diferentes constituintes do café têm sido sugeridos como potencialmente quimioprotetores em diferentes sistemas químicos e biológicos. Os compostos fenólicos presentes em vegetais têm recebido considerável atenção por serem os principais componentes com atividade antioxidante, embora não sejam os únicos. Os ácidos clorogênicos (Figura 1) constituem os principais e mais abundantes compostos fenólicos com propriedades antioxidantes no café (Monteiro & Trugo, 2005) e são de grande interesse econômico devido à sua degradação, durante a torração, originando pigmentos e componentes voláteis do

aroma, como fenol e vinilguaiacol (Moreira et al., 2000).

De acordo com a sistematização de Clifford (1985), podemos dizer que os ácidos clorogênicos são um conjunto de 5 grupos principais de compostos fenólicos e seus isômeros formados, principalmente, pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos derivados do ácido cinâmico: os ácidos cafeico e ferúlico, ou o *p*-cumárico. Estes grupos são ácidos cafeoilquínicos, com três isômeros principais (3, 4, 5); ácidos dicafeoilquínicos, cujos isômeros principais são 3,4; 3,5; 4,5; ácidos feruloilquínicos (3, 4, 5); ácidos *p*-cumaroilquínicos, e ácidos cafeoilferuloilquínicos.

Recentemente, os principais isômeros dos ácidos clorogênicos foram identificados e quantificados em amostras de cafés comerciais, observando-se para todas as amostras uma predominância dos ácidos cafeoilquínicos com cerca de 77 a 81% do total de ácidos clorogênicos (Monteiro & Trugo, 2005).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos tem sido atribuída às suas propriedades de óxido-redução, que desempenham importante papel na adsorção ou neutralização de radicais livres (Basile et al., 2005). Os compostos fenólicos, principalmente os ácidos clorogênicos e cafeico, exercem uma ação protetora antioxidante dos aldeídos (Trugo et al., 1999). Os ácidos clorogênicos têm chamado atenção devido à sua atividade anticancerígena comprovada para alguns tipos de câncer, bem como a sua ação benéfica no combate a doenças cardiovasculares devido às suas propriedades antioxidantes (Del Castillo et al., 2002; Mattila & Kumpulainen, 2002).

Numerosos estudos *in vitro* indicam que polifenóis encontrados em plantas podem efetivamente participar de processos que possam ter implicações anti-carcinogênicas e anti-aterogênicas. Entre estes processos, o mais evidente é a capacidade antioxidante destes compostos atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, que reduz radicais livres reativos e produz o radical fenoxila estabilizado por ressonância. A capacidade antioxidante dos polifenóis

é influenciada pelo número e posição dos grupos OH, assim como pelas posições de glicosilação (McKay & Blumberg, 2002; Sun et al., 2002). O ácido tânico, outro constituinte do café, faz parte de um grupo heterogêneo de polifenóis denominado taninos. A ingestão dietética de ácido tânico em baixas doses apresenta forte atividade quimioprotetora contra o desenvolvimento espontâneo de neoplasias hepáticas em camundongos (Nepka et al., 1999).

O caveol e cafestol são constituintes da fração lipídica do café e estão presentes no grão e também no café como bebida. A concentração destes compostos na bebida depende fortemente do procedimento de preparo, aparecendo em quantidade mais elevada em cafés não-filtrados, como o café turco ou escandinavo, em menor valor no café expresso e praticamente inexistente no café filtrado (Gross et al., 1997). Estes diterpenos são também considerados bons exemplos de constituintes biologicamente ativos encontrados no café.

Estudos mostram que o caveol e cafestol protegem contra a formação de aductos (ligação de um grupo funcional de uma substância química em uma base nitrogenada do DNA que pode levar a célula a originar um câncer) no cólon de animais (Huber et al., 1997) e em diferentes sistemas de células humanas e animais, exercendo efeito protetor antimutagênico e anticarcinogênico (Cavin et al., 2001, 2003). Os aductos são definidos como a ligação de um grupo funcional de uma substância química em uma base nitrogenada do DNA, ocorrendo uma intercalação desse composto na molécula do DNA, o que gera danos no DNA que se não forem restaurados, podem levar a célula a originar um câncer (Umemoto et al., 2001).

As atividades quimioprotetoras do caveol e cafestol parecem estar associadas com modificações benéficas no metabolismo de xenobióticos que incluem inibição de enzimas do citocromo P450, com conseqüente redução na ativação de substâncias mutagênicas/carcinogênicas (Cavin et al., 2001), e

indução de enzimas da FASE II do metabolismo de xenobióticos, como a glutationa S-transferase e UDP-glicuronosil transferases (Huber et al., 2002a, 2003). O caveol e cafestol também aumentam os teores de glutationa, cofator da desintoxicação relacionada à glutationa S-transferase, e de  $\gamma$ -glutamylcisteíναςintetase, a enzima limitante da síntese de glutationa (Huber et al., 2002b, 2003).

#### **2.4 Propriedades bioquímicas e antioxidantes da cafeína**

O interesse pelo estudo da cafeína começou em meados da década de 70, quando estudos em animais indicaram que a cafeína estaria relacionada a uma diminuição no crescimento, redução do peso ao nascer e anormalidades esqueléticas (Heller, 1987; Dlugosz & Bracken, 1992). Além disso, dada a similaridade química entre a cafeína e componentes do ácido desoxirribonucléico (DNA), investigadores têm se interessado pelo potencial mutagênico da cafeína (Dlugosz et al., 1996; 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). Embora a cafeína seja mutagênica em organismos inferiores e sistemas celulares simples, seu efeito mutagênico em humanos é ainda desconhecido (Kihlman, 1980).

A média de cafeína em cafés brasileiros é de 37mg/xícara, com um desvio-padrão de 6,0 (Camargo & Toledo, 1998). Para o cálculo da quantidade diária total de cafeína ingerida, considerou-se que: 50mL de café = 35,6mg de cafeína; 165mL de mate = 47,1mg de cafeína e 11g de chocolate em pó = 6,5mg de cafeína (Bunker & McWilliams, 1979). Entretanto, um dos poucos estudos sobre o consumo de cafeína em alimentos nacionais Camargo et al. (1999), utilizando-se de uma amostra representativa com seiscentos indivíduos entre 9 e

80 anos, mostraram que, para todas as faixas etárias, o café foi a principal fonte de cafeína, o que pode ser atribuído aos maiores níveis de cafeína no café quando comparado a outras fontes.

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.

Uma xícara de café do consumidor norte-americano tem em média 150mL (aproximadamente 85 mg de cafeína) no café torrado. Portanto, para alcançar a dose letal, aproximadamente 10 g segundo Macrae (1989), seria necessária a ingestão de 118 xícaras (ou 18 litros). Por outro lado, uma xícara brasileira tem o volume de 50 mL, com 60 mg de cafeína para o café torrado ou moído (Mazzafera & Carvalho, 1991).

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

O nível de cafeína no sangue tem alguns efeitos fisiológicos no ser humano, a ingestão de 70-100 mg de cafeína por uma pessoa com 70 kg faria com que em seu sangue fosse encontrada uma concentração de 5-10  $\mu\text{M}$  de cafeína (Smith, 1985). Convertendo esse dado em xícaras de café torrado, segundo os estilos norte-americano e brasileiro, obtiveram-se os dados da Tabela 2.

TABELA 2 Quantidade de xícaras de café necessárias para causar determinados efeitos fisiológicos relacionados à cafeína.

Nível de cafeína no sangue	Quantidade de cafeína ingerida	Quantidade ingerida de café xícaras (litros)		Efeitos Fisiológicos
		Americano	Brasileiro	
5 - 10	70 - 100	1 (0,15)	1,5 (0,08)	Diminuição de fadiga e sono
15 a 30	210 a 420	2,5 (0,38) a 5 (0,75)	3,5 (0,16) a 7 (0,35)	Ansiedade, aumento da taxa respiratória, diurese e aumento da secreção gástrica
50	700	8,2 (1,20)	12 (0,60)	Dose terapêutica
150 a 200	2100 a 2800	25 (1,20) a 33 (4,95)	35 (1,75) a 47 (2,35)	Níveis de toxicidade
500 a 1000	7000 a 14000	82 (12,30) a 165 (24,65)	117 (5,85) a 233 (11,65)	Faixa de dose letal

Fonte: Smith (1985).

Fortier et al. (1993) encontraram que o café descafeinado não foi associado com restrição de crescimento intra-uterino, 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.

Os teores de cafeína na bebida são influenciados pelo tipo do produto (torrado ou instantâneo, descafeinado ou comum) e o processo utilizado no seu preparo (Camargo & Toledo, 1998; Carregaro et al., 2001).

Em pesquisa realizada por Camargo & Toledo (1998), verificou-se que a quantidade de cafeína extraída foi 19 a 30 % superior à obtida da bebida preparada com pó das mesmas marcas que não tenham sido submetidas à fervura. Os teores médios de cafeína do café expresso são relativamente maiores visto que, neste tipo de preparação, a quantidade de pó utilizada é praticamente o dobro do café tipo caseiro. Bracken et al. (2002) observaram variação até quando o mesmo respondente fervia o café ou chá em condições aparentemente idênticas no mesmo dia.

O efeito ocasionado pelo consumo de café sobre o metabolismo da glicose não é semelhante ao ocasionado pela cafeína isolada -- a cafeína aumenta a intolerância à glicose e o café não tem esse efeito (Dam, 2006). O café descafeinado tem efeito ainda mais pronunciado de melhorar a tolerância à glicose. Este trabalho tem grande relevância, pois foi realizado em protocolo duplo-cego e randomizado o efeito do consumo de cápsulas de cafeína, café integral, café descafeinado e placebo (dextrose) que evidenciaram o erro perpetuado de assumir como semelhante o consumo de café e cafeína. Na verdade, o consumo de cafeína (substância) tem o efeito de favorecer a intolerância à glicose, enquanto o 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).

Em 1993, vários pesquisadores realizaram inúmeros estudos em

pacientes, os quais revelaram que o café aumenta a capacidade de raciocínio e concentração entre 4 e 5%, além de melhorar a memória na mesma proporção. Ele também melhora o desempenho físico por relaxar a musculatura brônquica, facilitando a entrada de oxigênio na circulação. Portanto, sua atividade nos pulmões é broncodilatadora. Também melhora a coordenação motora e estimula a contração dos músculos. Devido a sua ação vasoconstritora, a cafeína diminui o calibre das artérias dilatadas no cérebro, responsáveis pela cefaléia, mostrando seu efeito importante na diminuição da dor de cabeça. Isto justifica sua presença na maioria dos medicamentos contra esta enfermidade. Além disto, parece também estar ligada à liberação de endorfinas, neurotransmissores produzidos pelo cérebro que têm efeito analgésico. A dose normal de cafeína utilizada para fins farmacêuticos é de 100-200mg (Gilman et al., 1992).

Foi realizado um trabalho no qual se concluiu que a administração prolongada de cafeína, 250mg/dia em pacientes hipertensos, não teve associação com a elevação significativa na pressão sanguínea, com os níveis de catecolamina do plasma, ou com a atividade da renina no plasma nesses pacientes (Robertson et al., 1984).

A cafeína possui dois mecanismos de ação no organismo humano: antagoniza os receptores de adenosina, neurotransmissor que atua nos receptores purinérgicos, e também inibe a enzima fosfodiesterase, responsável pela destruição do mediador químico intracelular denominado adenosina monofosfato cíclico (AMP-cíclico), o que causa um aumento do AMP cíclico intracelular. Esses efeitos nas membranas e no interior das células determinam alterações no movimento do cálcio intracelular, o principal íon envolvido no processo de contração das fibras musculares. Talvez alterações iônicas semelhantes ocorram nas células nervosas e glandulares, onde a cafeína possui um efeito estimulante (Trugo, 2001).

Além de exercer efeito sobre o sistema nervoso central, a cafeína é outro

constituente do café com atividade antioxidante exercida pelo mecanismo de captação de radicais hidroxil e oxigênio singlete e reação com elétrons (George et al., 1999).

A cafeína apresenta efetiva inibição da peroxidação lipídica *in vitro* induzida por espécies reativas de oxigênio em microsomas de fígado de rato. A lesão oxidativa foi induzida pelos radicais hidroxil (OH•), peroxil (ROO•) e oxigênio singlete (O<sub>2</sub>). A cafeína apresentou efetiva inibição sobre a peroxidação lipídica, em concentrações milimolares, contra as três espécies reativas do metabolismo de oxigênio. A ordem decrescente da atividade inibitória foi igual a: OH• > O<sub>2</sub> > ROO•. A ação antioxidante da cafeína foi semelhante a da glutatona e significativamente maior do que do ácido ascórbico (Devasagayam et al., 1996).

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

A atividade antioxidante da cafeína e de seus metabólitos foi avaliada em concentrações fisiológicas (40  $\mu$ mol/L) empregando o método ORAC. A capacidade antioxidante também foi avaliada pelo método de TBARS e de oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade) humana. Todos os compostos avaliados reduziram significativamente os níveis de TBARS e de dienos conjugados produzidos durante a peroxidação da LDL humana (Lee, 2000).

## 2.5 Processos de descafeinação

A primeira remoção da cafeína do café foi realizada pelo Dr. Ludwig Roselius e Dr. Karl Wimmer da Kaffee-Handels-Aktien-Gellschaft, em Bremen, Alemanha, no começo do século XX (Katz, 1987). Sua invenção foi descrita na patente Alemã 'Deutsches Reich Patentsschirift' (DRP) 198279 em 1905, surgindo com a descoberta da possibilidade do uso da cafeína, fundando em 1906, a firma Kaffe H.A.G. na Alemanha (Sivetz & Derosier, 1979).

A descafeinação convencional envolve: i) enchimento dos grãos com água, ii) extração da cafeína com o solvente orgânico (insolúvel em água), iii) vaporização dos grãos para remover resíduos do solvente e iv) secagem.

O primeiro solvente orgânico usado foi o benzeno. Porém devido a sua toxicidade e pelo fato de ser inflamável e muito caro foi substituído por compostos orgânicos clorados como o tricloroetileno, o cloreto de metileno (não-inflamáveis e possuem alta volatilidade), o acetato de etila, o triclorometano entre outros (Katz, 1987). Devido ao fato de ser cancerígeno, o triclorometano foi substituído pelo diclorometano (Sivetz & Derosier, 1979; Katz, 1980).

Patel & Wolfson (1972) elaboraram um processo de descafeinação que consiste em carrear os grãos verdes dentro de uma série de colunas de extração para serem vaporizados durante 75 minutos a 110°C, aumentando a umidade de 16-18% para 40-50% em peso. Em seguida, submete-se os grãos a um processo de extração semi-contínuo, usando o clorometano numa série de colunas. O solvente com a cafeína sai da coluna para uma unidade de separação, onde o alcalóide precipita e o solvente é separado e saturado com água para ser reciclado na primeira coluna. As temperaturas de extração variam de 50 a 105°C com pressões de 2 a 14 bar. Após 10 horas, o conteúdo de cafeína no grão diminui de 3% para 0,02% ou 3% em relação ao valor inicial.

A água também tem sido usada como solvente, apesar de possuir uma baixa seletividade, dissolvendo muitos outros compostos presentes no grão de café (aproximadamente 20% em peso do grão). Podem ser citados pelo menos dois processos distintos de descafeinação utilizando água como solvente:

i) a cafeína é removida dos grãos através de lavagem com água, em seguida o extrato aquoso obtido é descafeinado com o uso de solventes orgânicos imiscíveis na água, os quais são destilados para concentrar o alcalóide até alcançar um maior grau de pureza.

ii) a extração da cafeína com água e utilizando adsorventes como carbono ativado, substâncias de substrato de café ou ainda substâncias de estrutura molecular semelhante à da cana de açúcar que separem a cafeína das impurezas do extrato aquoso. Em seguida, os adsorventes são lavados para remover a cafeína a fim de reutilizá-los posteriormente (Katz, 1987).

O uso de CO<sub>2</sub> líquido como solvente de extração operando a pressões baixas resulta em solubilidades baixas de cafeína e o uso de grandes quantidades de solvente (Vitzthum & Hunbert, 1978).

Com o surgimento de novas técnicas de extração a alta pressão, Kurt Zosel, cientista do Max Plank Institute, desenvolveu, em 1970, um processo de descafeinação de café utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico como solvente. O processo foi licenciado para a café HAG e General Foods, que instalaram plantas em Bremen (Alemanha) e Houston (Texas, USA) em 1989.

Comparado com os métodos convencionais que usam hidrocarbonetos clorados como solvente, o CO<sub>2</sub> supercrítico apresenta-se melhor. O dióxido de carbono apresenta uma temperatura crítica relativamente baixa (31,2 °C), permitindo uma extração sem risco de degradação térmica de produtos termossensíveis freqüentemente encontradas na destilação, diminuindo a perda do sabor e aroma, gerados durante a torrefação (Peker et al., 1992). Os hidrocarbonetos clorados não só extraem a cafeína, mas também as ceras e óleos

de aroma, mudando a cor do extrato de verde claro para tons escuros.

Na descafeinação dos grãos de café com fluidos supercríticos, remove-se também uma quantidade pequena de compostos de sabor e cor junto com a cafeína, porém essa quantidade é significativamente inferior às quantidades removidas com a extração em água quente, cloreto de metileno, ou acetato de etila. A água como co-solvente facilita o processo de descafeinação (Lack & Seidlitz, 1993).

A extração de café torrado não é muito usada devido às perdas de sabor e aroma (Vitzthum & Hunbert, 1978). Em 1905, na Alemanha, Ludwig Roselius patenteou um processo que descreve a preparação do café torrado descafeinado por tratamento com vapor, extraíndo a cafeína com solventes orgânicos (benzeno) ou por torrefação. O grão de café é comercialmente descafeinado antes de ser torrado, para uma melhor retenção do sabor no produto final.

Os processos de descafeinação vêm evoluindo rapidamente à medida que cresce o consumo do produto. O mercado para produtos descafeinados é potencialmente muito grande. No entanto, a descafeinação com CO<sub>2</sub> não tem alcançado o nível de uso completamente.

Para o período 1970-1990, houve um aumento de 60% nas importações de café robusta (*Coffea canephora* Pierre) pelos EUA. A explicação para tal aumento, segundo Sivetz & Derosier (1979), é o fato de que o preço desse café é menor, perde as características desagradáveis da bebida quando descafeinado e rende maior quantidade de cafeína e sólidos solúveis.

Desde 1970, as vendas de café descafeinado têm aumentado marcadamente já que a ingestão de grandes quantidades de cafeína pode ter efeitos adversos sobre a saúde, especialmente para pessoas idosas.

O café descafeinado tem um mercado muito grande nos EUA e na Europa. O café canephora (com teor de cafeína maior a 2%) é menos valorizado que o café arábica (com um teor de 1%). Portanto, a descafeinação do café

canephora apresenta-se valiosa tanto na valorização do café como na obtenção da cafeína (Saldaña et al., 1997).

A biotecnologia e projetos genômicos têm buscado o desenvolvimento de plantas de café (selecionadas naturalmente ou geneticamente modificadas) que possuam baixos índices de cafeína. De fato, nessas plantas já foram constatadas reduções de até 70% nos teores de cafeína (Ogita et al., 2003).

## **2.6 Oxidações biológicas**

Os organismos vivos interagem com o meio ambiente visando à manutenção de um ambiente interno que favoreça a sobrevivência, o crescimento e a reprodução. O oxigênio molecular ( $O_2$ ) obtido da atmosfera é vital para organismos aeróbios; contudo, espécies reativas formadas intracelularmente a partir do oxigênio ameaçam a integridade celular por meio da oxidação de biomoléculas, podendo comprometer processos biológicos importantes (Augusto, 2006).

O dano oxidativo de biomoléculas pode levar à inativação enzimática, mutação, ruptura de membrana, ao aumento na aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade e à morte celular. Estes efeitos tóxicos do oxigênio têm sido associados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças crônicas, inflamatórias e degenerativas (Halliwell & Gutteridge, 1999). Apesar deste paradoxo, a vida aeróbia tornou-se possível graças às adaptações biológicas que levaram ao desenvolvimento de defesas antioxidantes contra a toxicidade do oxigênio e espécies derivadas deste.

As adaptações biológicas às mudanças do meio ambiente guiam o processo evolutivo. Neste sentido, as adaptações podem ser definidas como características que se tornam aumentadas e mantidas sob seleção. Embora as defesas antioxidantes endógenas sejam efetivas, não são infalíveis. Constantemente, há formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio

(ERO/ERN) que interagem em diferentes níveis com o ambiente celular antes de serem eliminadas, o que, à primeira vista, pode parecer uma falha evolutiva.

Todavia, há evidências recentes de que certo nível destas espécies é imprescindível para muitas funções fisiológicas. Por exemplo, o enovelamento de proteínas nascentes no retículo endoplasmático ocorre em um meio mais oxidante que o restante da célula para a formação de pontes dissulfeto (Augusto, 2006). Também, muitos genes são transcritos após oxidação transitória e baixas concentrações de alguns oxidantes estimulam a proliferação celular, como exemplificado pela adição de 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à cultura de células. Os componentes celulares não são protegidos totalmente por antioxidantes endógenos e é bem estabelecido que antioxidantes obtidos através da dieta alimentar são indispensáveis para a defesa apropriada contra oxidação e, dessa forma, passam a ter um importante papel na manutenção da saúde (Cerqueira et al., 2007).

Halliwell & Gutteridge (1999) definiram antioxidante como alguma substância presente em concentrações baixas, comparadas às concentrações do substrato oxidante, que previne significativamente ou atrasa a oxidação de substratos susceptíveis. Os principais mecanismos de ação de compostos antioxidantes incluem captadores de radicais e supressores de estados excitados; sistemas catalíticos que neutralizam ou eliminam ERO/ERN e a ligação de íons metálicos a proteínas, o que os torna indisponíveis para a produção de espécies oxidantes.

A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina (Halliwell et al., 1995).

Os antioxidantes podem otimizar não somente o sistema natural de defesa antioxidante do corpo, podem também fortalecer o sistema imunológico,

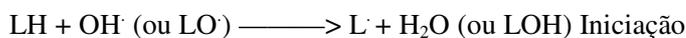
controlar a resposta inflamatória e ajudar a restaurar o controle sobre o estresse oxidativo e evitar esse ciclo vicioso (Bianchi & Antunes, 1999).

### 2.6.1 Lipoperoxidação

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas do oxigênio (ERO), porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (Mello Filho et al., 1983). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (Hershko, 1989).

A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, cancerígenos e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (Shan et al., 1990). Assim como na formação das ERO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (Ross & Moldeus, 1991).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio:



A reação acima se inicia com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo

polinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo  $\text{OH}^\cdot$  ou pelo  $\text{LO}^\cdot$  (radical alcoxila), com conseqüente formação do  $\text{L}^\cdot$  (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o  $\text{L}^\cdot$  reage rapidamente com o  $\text{O}_2$ , resultando em  $\text{LOO}^\cdot$  (radical peroxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o  $\text{L}^\cdot$  na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ( $\text{L}^\cdot$  e  $\text{LOO}^\cdot$ ) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até se destruírem (Gardès-Albert et al., 1991).

## **2.7 Proteção antioxidante do café**

O café é o único alimento que passa por processo de torrefação cuja as altas temperaturas permitem que se destruam alguns dos compostos fenólicos, favorecendo o desenvolvimento de outras substâncias antioxidantes (Halsted, 2003). O desenvolvimento de substâncias antioxidantes durante a torrefação se dá por meio dos produtos da reação de Maillard, entre substâncias que contêm nitrogênio e trigonelina ou carboidratos. A estocagem dos grãos torrados, bem como as condições de torra, podem modificar os teores dessas substâncias na bebida (Nicoli et al., 1997).

O mecanismo ainda não foi inteiramente elucidado, mas os fenóis vegetais têm uma potente ação antioxidante e o café é uma das fontes dietéticas mais ricas de ácido clorogênico (Daglia et al., 2000). O ácido clorogênico, que é uma combinação dos ácidos caféico e quínico, pode assim representar uma proporção substancial dos antioxidantes presentes no café e em nossa dieta. Estudos também demonstram que absorvemos cerca de um terço do ácido clorogênico e virtualmente todo o ácido caféico que ingerimos (Olthof et al., 2001) e que o teor de antioxidantes no plasma sanguíneo aumenta depois de tomarmos café (Natella et al., 2002). A fração absorvida do ácido clorogênico e do ácido caféico são suficientes para exercer ação protetora e antioxidante

(Daglia et al., 2000), provocar alterações na circulação sanguínea e inibir a oxidação de LDL *in vitro*, protegendo assim o organismo contra doenças cardiovasculares (Olthof et al., 2001) e contra efeitos inibitórios *in vitro e in vivo* induzidos por produtos carcinogênicos (Tanaka et al., 1993; Kasai et al., 2000). A fração não absorvida, no cólon, inibe a formação de compostos mutagênicos N-nitrosos (nitrosaminas) exercendo assim efeito anticancerígeno.

Os compostos heterocíclicos voláteis encontrados na infusão de café – pirróis, furanos, tiofenos, pirazinas, imidazóis – são dotados de potente atividade antioxidante, sendo atribuído a algumas destas frações, potencial semelhante ao encontrado para o  $\alpha$ -tocoferol (Fuster et al., 2000; Yanagimoto et al., 2004).

Os compostos fenólicos podem inibir os processos da oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Esses compostos podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (Decker, 1997).

## **2.8 Café e saúde**

O café é uma bebida com potencial para "bebida funcional", pois contém cálcio, vitamina B (niacina) e nutrientes básicos para a saúde humana. Alguns aspectos devem ser levados em consideração em relação aos alimentos funcionais. Segundo Roberfroid (2002), além do valor nutritivo inerente à sua composição química, eles devem exercer efeitos metabólicos ou fisiológicos positivos, contribuindo para o bem-estar e a saúde e/ou reduzindo o risco de ocorrência de doenças. Devem ser consumidos na dieta usual, podendo ser um alimento natural ou um alimento no qual um componente ativo tenha sido adicionado ou retirado. Pode também ser um alimento cuja natureza e/ou bioatividade de um ou mais componentes tenha sido modificada. Em adição, a alegação da propriedade funcional deve ter embasamento científico.

Nos aspectos relacionados à saúde, o café e a cafeína foram taxados

durante muitos anos como causadores dos mais diversos danos. Neste sentido, foram realizados inúmeros estudos visando a esclarecer os efeitos do consumo de café na saúde humana. Dentre os principais temas abordados, destacam-se as doenças cardiovasculares, câncer, disfunções hematológicas e de reprodução (Almeida et al., 2003). Em todas as áreas pesquisadas os resultados são conflitantes. Enquanto alguns estudos sugerem uma possível associação entre consumo de café (integral) e doenças coronarianas e incidência de câncer; outros estudos correlacionam seu consumo à diminuição do risco de suicídios e da incidência de cirroses, ao aumento do estado de alerta, à diminuição da fadiga e à melhora do estado de espírito (Smith et al., 1992; Avanzo et al., 1993; Klatsky et al., 1993; Nehlig, 1999).

Diversos estudos epidemiológicos mostram relação inversa entre o consumo de café e o risco de câncer em diferentes órgãos como pulmão (Mendilaharsu et al., 1998), mama (Michels et al., 2002), faringe, esôfago (Tavani et al., 2003) e fígado (Gelatti et al., 2005).

Com relação as dislipidemias, os fatores responsáveis pelo aumento do colesterol em indivíduos que consomem café fervido são os diterpenos cafestol e caveol, presentes na fração lipídica do café, que fica retida no filtro durante o preparo tradicional da bebida (Thelle, 1995). Investigações realizadas ao longo dos últimos anos indicam que o consumo moderado de café/cafeína não apresenta risco para mulheres grávidas (aproximadamente 4 xícaras de café) e que não há associação positiva entre o consumo de café e a ocorrência de câncer em geral (Almeida et al., 2003). Vale ainda ressaltar que adultos que ingerem café diariamente, em doses moderadas, têm o sistema de vigília do cérebro estimulado, aumentando a capacidade de atenção, de concentração e de memória, reduzindo a apatia e a fadiga (Encarnação & Lima, 2003).

Há, entretanto, estudos epidemiológicos que contradizem os efeitos benéficos da ingestão do extrato do café torrado, isto é, bebidas do café (Tanaka

et al., 1998; Nurminen et al., 1999). Esses estudos indicam que o café torrado não afeta a pressão sanguínea em indivíduos hipertensos. No trabalho de Suzuki et al. (2002), foi observado que uma única ingestão oral do extrato do café torrado teve pouco efeito na pressão sanguínea em ratos espontaneamente hipertensos e que o efeito hipotensivo do extrato de café verde nesses ratos não foi afetado por adição de cafeína.

## **2.9 Hepatoproteção do café**

Injúrias no fígado resultam de um aumento de radicais livres do oxigênio devido a várias causas etiológicas e que pode levar a cirrose. Muitos estudos testam diferentes substâncias como antioxidantes com o propósito de proteger as injúrias hepáticas e os processos que levam a cirrose (Chen et al., 2005). Além da atividade antioxidante dos constituintes do café, estudos mostram que o café ativa o sistema de antioxidação endógeno, conduzindo ao aumento hepático dos teores de glutatona, inibindo a peroxidação lipídica e protegendo o fígado de ratos da ação hepatotóxica do paracetamol (Abreu, 2005). Estudos mostram um efeito benéfico do café em pacientes com doença hepática crônica, esses efeitos são atribuídos a vários componentes do café, incluindo a cafeína (He et al., 2001; Huber et al., 2002b).

As propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas do café parecem estar associadas com modificações benéficas sobre o sistema de biotransformação hepático (Cavin et al., 2002; Huber et al., 2003) e ao aumento na atividade da O6-metilguanina-DNA metiltransferase (Huber et al., 2003). Outro mecanismo que poderia explicar a ação moduladora do café sobre a hepatocarcinogênese se refere à sua ação no sistema de desintoxicação hepático. Muitos carcinógenos químicos, como a dietilnitrosamina (DEN) e o 2-acetilaminofluoreno (2-AAF), necessitam de ativação microsomal antes de reagirem com o DNA e causarem mutações e/ou alterações epigenéticas

(Yamada et al., 2006). Dessa forma, a inibição de enzimas envolvidas na ativação de carcinógenos e/ou aumento na atividade de enzimas envolvidas na desintoxicação dos metabólitos tóxicos ativos pode representar importante mecanismo de quimioprevenção da carcinogênese.

O consumo de café está também associado à redução nos níveis séricos de GGT e aminotransferases em consumidores de bebidas alcoólicas, sugerindo que o café inibe a indução da GGT no fígado pelo consumo de álcool e possivelmente protege contra o dano celular hepático devido a este consumo (Tanaka et al., 1998). Estudo posterior mostrou relação inversa dose-efeito entre o consumo de café e o risco de cirrose hepática, sugerindo que o café poderia inibir o início da cirrose hepática em pacientes alcoolistas e não alcoolistas (Corrao et al., 2001).

### **2.10 Fígado e o sistema de biotransformação**

O fígado é a maior glândula do corpo humano, pesando cerca de 1400 a 1600 g em um adulto, o que corresponde a aproximadamente 2,5% do peso corporal. Ele situa-se no quadrante superior direito da cavidade abdominal, na superfície inferior do diafragma (Robbins et al., 2000).

O fígado recebe a maior parte do seu sangue pela veia porta (cerca de 70%) e menor quantidade através da artéria hepática. Pela veia porta, chega ao órgão todo o material absorvido no intestino delgado, com exceção de parte dos lipídios que é transportada por via linfática (Junqueira & Carneiro, 1995). É um órgão de múltiplas funções entre as quais estão o processamento e síntese de substâncias que são transportadas para outras áreas do organismo. Desempenha, ainda, funções específicas para o organismo no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios e de inúmeras outras no armazenamento de vitaminas e de ferro (Guyton & Hall, 2002; Klover & Mooney, 2004). O fígado é também o principal órgão envolvido na biotransformação e eliminação de compostos

química e estruturalmente diversos, de natureza endógena e exógena, aos quais o organismo está frequentemente exposto. Estes últimos são chamados de xenobióticos e incluem compostos como fármacos, poluentes ambientais e outros (Hodgson & Rose, 2007).

Durante o processo de biotransformação, enzimas transformam compostos orgânicos em moléculas mais solúveis e, portanto, mais facilmente excretáveis. O processo de biotransformação de xenobióticos é classificado em reações de FASE I, catalisadas por enzimas microsossomais, e de FASE II, que envolvem enzimas principalmente citossólicas (Chen & Kong, 2004). As enzimas das FASES I e II coexistem numa mesma célula e o equilíbrio entre suas funções determina a adequada atividade biológica das mesmas (Hodgson & Rose, 2007).

### **2.11 Indicadores biológicos de injúria hepática**

Os efeitos de substâncias químicas no fígado têm sido estimados tradicionalmente por determinação da atividade de várias enzimas, como, por exemplo, aminotransferases, álcool desidrogenase, lactato desidrogenase, glutatona-S-transferase, entre outras. A hepatotoxicidade é causada por várias substâncias que são metabolizadas pelo Sistema Citocromo P-450 a intermediários reativos. Por exemplo, para o tetracloreto de carbono, tem sido extensivamente estudada e bem documentada a sua ação hepatotóxica. O metabólito reativo do tetracloreto de carbono inicialmente reduz a glutatona peroxidase (GPx) intracelular a um nível que predispõe a reação do metabólito com macromoléculas críticas, levando à morte celular e à hepatotoxicidade. Neste caso, os biomarcadores de efeito poderiam incluir níveis de glutatona, peroxidação lipídica ou número de células necrosadas (Yiin et al., 1996).

As aminotransferases séricas – aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) – são marcadores sensíveis de danos às células

hepáticas, sendo úteis no reconhecimento de doenças hepatocelulares agudas e crônicas, em vários tipos de hepatite assim como de lesões experimentais promovidas pela remoção de tecido hepático nos estudos de regeneração hepática (Araujo, 1992). A elevação nos níveis de atividade destas enzimas reflete o aumento de permeabilidade das membranas celulares, o que favorece seu extravasamento, desencadeando necrose do parênquima hepático, constituindo-se em identificadores de lesão hepática (Araújo, 1992).

A ALT é uma enzima citossólica com alta atividade em nível hepático e com baixa atividade no coração, músculo esquelético, rins, pâncreas e baço. A AST é encontrada no citossol e mitocôndrias das células hepáticas, cardíacas, musculares esqueléticas e renais, onde apresentam elevada atividade, bem como no pâncreas, baço e pulmões, onde a concentração é desprezível. Os níveis de AST são mais elevados do que os da ALT, em função da primeira ser encontrada simultaneamente em dois compartimentos biológicos (Araújo, 1992). Desta forma, a determinação laboratorial destas enzimas tem grande significado clínico para diagnóstico de doenças hepatocelulares em humanos, tais como: hepatite viral e tóxica, cirrose hepática, hepatopatia alcóolica aguda, metástase hepática, necrose amebiana do fígado entre outras.

Algumas proteínas plasmáticas são classificadas como proteínas de fase aguda uma vez que, embora naturalmente presentes no sangue, apresentam sua síntese alterada pelas células parenquimais do fígado em resposta a uma variedade de estresses como inflamações, infecção bacteriana, radiações, toxinas, isquemia, choque térmico, entre outros, independentemente do fator desencadeante (Silva et al., 2005).

A albumina é a mais importante proteína plasmática e corresponde a cerca de 60% das proteínas plasmáticas totais, sendo que, por volta de 40% está presente no plasma e 60% no espaço extracelular. O fígado produz 12 g de albumina/dia, representando 25% do total de proteínas sintetizadas pelo fígado e

metade das proteínas secretadas. Entre as funções importantes da albumina está a capacidade de se ligar a várias substâncias, que incluem hormônios esteróides, bilirrubina e triptofano do plasma. Além disso, a albumina se liga a aproximadamente 10% do cobre plasmático. Acredita-se, também, que a albumina seja responsável por cerca de 75% a 80% da pressão osmótica do plasma (Ribeiro et al., 2006).

A síntese de albumina é afetada em uma série de moléstias, particularmente aquelas do fígado. O plasma de pacientes com doença do fígado freqüentemente apresenta decréscimo da relação A:G (albumina: globulina). A hipoalbuminemia é promovida pela diminuição ou defeito da síntese devido ao dano hepatocelular, deficiência na ingestão de aminoácidos, aumento de perdas de albumina por doença e catabolismo induzido por estresse fisiológico (Ribeiro et al., 2006).

### **2.12 Injúria hepática por tetracloreto de carbono**

A primeira investigação caracterizando cirrose por tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) foi descrita por Cameron & Karunaratne (1936). Desde essa data, numerosos estudos têm sido desenvolvidos para uma melhor compreensão dos mecanismos operacionais envolvidos na hepatotoxicidade causada pelo  $\text{CCl}_4$ . Este xenobiótico é uma potente droga hepatotóxica, a qual é metabolizada no fígado pelo complexo de enzimas oxidativas denominado complexo enzimático citocromo P-450. Esse processo oxidativo gera o radical triclorometil ( $-\text{CCl}_3$ ) e parte do radical triclorometil gera o radical triclorometil-peróxil ( $-\text{O}_2\text{CCl}_3$ ). A seguir, ocorre uma série de processos bioquímicos e fisiológicos secundários, que são os últimos responsáveis pelas conseqüências patológicas do metabolismo do  $\text{CCl}_4$  (Lee et al., 2004; Ozercan et al., 2006).

A alteração oxidativa dos lipídios das membranas celulares, formadas em grande parte por ácidos graxos polinsaturados, pode levar à perda de sua

funcionalidade através de alterações nos mecanismos de homeostase celular. A propagação em cadeia da peroxidação lipídica forma compostos reativos com o oxigênio, ampliando o seu dano. Esta agressão acaba por interferir em mecanismos celulares importantes, incluindo sistemas enzimáticos, expressão gênica e mecanismos de segundo mensageiro, entre outros (Peres et al., 2000; Lee et al., 2004).

### **2.13 Esteatose hepática**

O termo esteatose ou alteração de gordura no fígado é definido pelo acúmulo anormal de triacilgliceróis dentro do parênquima celular. A alteração de gordura é observada mais frequentemente no fígado, já que este é o principal órgão envolvido no metabolismo de gordura, apesar de poder ocorrer em outros órgãos, tais como, o coração, os músculos e os rins. O conteúdo de lipídeos nos hepatócitos é regulado pelas atividades integradas de enzimas celulares que catalisam a captação de lipídeos, sua síntese, oxidação e sua exteriorização da célula. Quando a quantidade de gordura que entra nos hepatócitos excede a capacidade para a sua oxidação ou exteriorização, então a esteatose hepática se instala (Koteish & Diehl, 2001).

Diferentes mecanismos propiciam o acúmulo de triacilgliceróis no fígado. Ácidos graxos livres vindos do tecido adiposo ou da alimentação são esterificados para triacilgliceróis, convertidos em colesterol ou fosfolipídeos, ou oxidados para corpos cetônicos. Uma dieta com alto teor de gordura pode, então, favorecer a instalação de esteatose hepática. Outra situação que propicia o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos e desencadeia disfunção deste órgão, ocorre pela elevação da lipogênese, devido, por exemplo, ao excessivo consumo de carboidratos. Concorre também para esta situação, o aumento da taxa de mobilização dos lipídios do tecido adiposo para o fígado, como ocorre no diabetes mellitus, jejum, e hipoglicemia ou por influência de fatores hormonais

(Alba & Lindor, 2003).

As causas de esteatose incluem toxinas, baixa ingestão protéica, diabetes mellitus, obesidade e anóxia celular (Koteish & Diehl, 2001). A esteatose no fígado é uma condição clínica-patológica que inclui um amplo espectro de danos hepáticos. A doença pode partir de uma simples esteatose, evoluir para hepatite-esteatótica e avançar para fibrose chegando até a cirrose hepática (Alba & Lindor, 2003).

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Matéria-prima e locais de execução**

As amostras de café (*Coffea arabica* L.) foram gentilmente cedidas pela empresa COCAM de Catanduva – SP e foram analisadas antes e após o processo de descafeinação com diclorometano. Para execução deste projeto, foram utilizadas as instalações dos laboratórios de Bioquímica Clínica e Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Alfenas (Unifal - MG), Laboratório de Produtos Vegetais do Departamento de Ciência dos Alimentos, Laboratório de Microbiologia Agrícola do Departamento de Biologia e o Pólo de Tecnologia em Qualidade do Café da Universidade Federal de Lavras (UFLA - MG).

### **3.2 Preparo da amostra**

Amostras de cafés foram torradas em torrador de laboratório da marca Probat com capacidade para 1kg, no grau de torração médio. O ponto ideal de torração foi determinado visualmente e por instrumentação. Em seguida, os grãos torrados foram moídos (moedor elétrico Probat) em granulometria fina (70% retenção em peneira 20), empacotados em embalagens de polietileno/alumínio, selados e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o uso. Os grãos verdes foram moídos em granulometria fina em moinho refrigerado a  $4^{\circ}\text{C}$  (Tecnal) com auxílio de nitrogênio líquido.

### **3.3 Análise de cor**

A cor do café torrado e moído foi analisada usando-se 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 de Eclairage (CIE)  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . A coordenada  $L^*$  representa quão clara ou escura 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  $h_{ab} = \tan^{-1}(b^*/a^*)$ . Estes foram obtidos, empregando-se o software Colorpro (Colorpro, 2007).

### **3.4 Preparo da bebida**

A bebida do café foi preparada de acordo com a recomendação da ABIC. Dez gramas de café em pó (verde e torrado) foram colocados em filtro de papel Whatman n. 3 e, em seguida, foram vertidos 100 mL de água destilada, a 90°C, sobre o pó contido no filtro. Todos os experimentos foram realizados com bebida preparada no momento de uso. Para os ensaios *in vivo* a bebida foi mantida a temperatura ambiente até atingir aproximadamente 30 °C.

### **3.5 Análise de sólidos solúveis**

O teor de sólidos solúveis nas bebidas de café foi determinado pelo método de extrato aquoso de acordo com Trugo & Moraes (2001). Uma alíquota de 1 mL de cada extrato foi transferida quantitativamente para pesa-filtros, previamente secos em estufa a 105°C e secados 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.

### **3.6 Determinação de fenólicos totais**

A concentração de fenólicos totais das bebidas foi determinada como descrito por Woisk & Salatino (1998). Amostras de 0,1 mL da bebida do café diluída foram misturadas com 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu diluído em água (1:10). Depois de 8 min, foram adicionados 0,4 mL de solução de carbonato de sódio a 4% (m/v) e os tubos foram mantidos no escuro a temperatura ambiente por 2 h. Decorrido o tempo, a absorvância foi determinada a 740 nm. A concentração de fenólicos foi calculada utilizando-se ácido tânico como padrão.

### **3.7 Determinação dos teores de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico**

Para determinação de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) foram utilizados procedimentos de extração com água quente segundo Vitorino et al. (2001) com diluição de 0,5g/100mL de água destilada e análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se cromatógrafo da marca Shimadzu com coluna em fase reversa C-18. O sistema encontrava-se acoplado a um detector espectrofotométrico UV/visível Shimadzu (modelo SPD-10A) conectado por uma interface (CBM-101) a um microcomputador para processamento de dados. As condições de análise utilizadas foram fluxo de 1 mL/min; fase móvel: metanol, água e ácido acético (20:80:1); temperatura ambiente; comprimento de onda 272 nm. A concentração dos compostos foi determinada pela relação entre as áreas dos picos de cafeína, trigonelina e ácido clorogênico da amostra e dos respectivos padrões de concentrações conhecidas.

### **3.8 Atividade antioxidante *in vitro***

#### **3.8.1 Atividade seqüestrante de radicais livres DPPH**

A atividade seqüestrante de radicais DPPH (1,1-diphenyl-1,2-picrylhydrazyl) foi determinada de acordo com o método de Yen et al. (2005). Para a análise da atividade seqüestrante de radicais livres DPPH (1,1- difenil-2- picrilidrazil) da bebida de café cada amostra foi diluída em etanol a 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em 4 mL da amostra, foi adicionado 1 mL de DPPH ( $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) igualmente diluído em etanol. A mistura foi acondicionada em tubo de ensaio âmbar e agitada. Decorridos 30 min, foi realizada a leitura a 517 nm. A diminuição na absorbância indica atividade seqüestrante de radicais livres. Os testes foram realizados em triplicata. A atividade seqüestrante de radicais livres foi expressa em porcentagem por comparação ao controle, BHT nas mesmas diluições das amostras de café, segundo a equação:

$$\text{Atividade seqüestrante de DPPH (\%)} = 100 - \left[ \left( \frac{Ac - At}{Ac} \right) \times 100 \right]$$

Onde, Ac é absorbância controle, que não foi incubado com o café e At a absorbância teste (amostras).

#### **3.8.2 Avaliação do poder redutor**

A avaliação do poder redutor foi realizada de acordo com Yildirim et al. (2001), alíquotas de 0,01 mL da bebida do café, na concentração final de 200 ppm, foram diluídas em 1 mL de etanol absoluto e transferidas para tubo de ensaio contendo 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 6,6 e 2,5 mL de ferricianeto de potássio a 1% (p/v). A mistura foi incubada em banho-maria a 45°C, por 20 minutos. Alíquotas de 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (p/v) foram adicionadas ao tubo de ensaio, com posterior agitação. Alíquotas de 2,5 mL da mistura foram transferidas para outro tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de  $\text{FeCl}_3$  a 0,1% (p/v), com

posterior agitação. A leitura da absorbância foi realizada a 700 nm. O aumento da absorbância indica o aumento do poder redutor. A atividade redutora da bebida foi expressa como porcentagem de inibição em comparação ao BHT, usado como padrão.

### 3.8.3 Avaliação da atividade quelante de íons Fe<sup>2+</sup>

A atividade quelante de íons Fe<sup>2+</sup> foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Tang et al. (2002), com modificações. Uma alíquota de 1mL das amostras foi transferida para tubos de ensaio âmbar de 25 mL. A esta alíquota foram adicionados 3,7 mL de água deionizada; 0,1 mL de FeSO<sub>4</sub> 2mM e 0,2 mL de ferrozina 5mM [3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-ácido fenil sulfônico) - 1,2,4-triazina]. O padrão neste teste foi feito substituindo 1 mL da amostra por água deionizada. A mistura foi agitada e após 20 min feita a leitura a 562nm acertando o aparelho com o branco (neste caso substitui a amostra por EDTA 2%). A redução na absorbância indica atividade quelante de Fe<sup>2+</sup>.

$$AQ (\%) = 100 - \left[ \left( \frac{Ap - At}{Ap} \right) \times 100 \right]$$

Onde, AQ é atividade quelante de Fe<sup>2+</sup>, Ap é absorbância do padrão, que não foi incubado com o café e At a absorbância teste (amostras).

### 3.9 Ensaio biológico

Para o ensaio biológico, foram utilizados ratos machos adultos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando  $270 \pm 20$  g, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Alfenas (Unifal – MG), que foram mantidos em caixas de polietileno, recebendo água e ração comercial *ad libitum*. Para indução da injúria hepática, foram administrados aos animais doses de tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) de 1,5 mL.Kg<sup>-1</sup> solubilizados em óleo de oliva 1:1 via intraperitoneal no terceiro,

quinto e sétimo dia da última semana dos 15 dias de tratamento. Os animais foram divididos em 6 grupos de 8 animais cada um:

Grupo 1 – Controle negativo (receberam água)

Grupo 2 – Controle positivo (receberam água e CCl<sub>4</sub>)

Grupo 3 – Café integral verde (CIV) + CCl<sub>4</sub>

Grupo 4 – Café descafeinado verde (CDV) + CCl<sub>4</sub>

Grupo 5 – Café integral torrado (CIT) + CCl<sub>4</sub>

Grupo 6 – Café descafeinado torrado (CDT) + CCl<sub>4</sub>

A bebida de café recém-preparada foi administrada aos animais por gavagem, uma vez ao dia, por 15 dias, como a água do controle. A dose utilizada foi de 5,7 mL.kg<sup>-1</sup> por dia correspondendo ao consumo humano (homem de 70 kg) de 8 xícaras de 50 mL da bebida de café. No décimo sexto dia, os animais foram anestesiados para retirada do sangue por punção cardíaca, e logo após, submetidos à eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub> para retirada do fígado. O sangue foi centrifugado em seguida para separação do soro. O fígado foi lavado com solução salina 0,9% e armazenado a -20°C submerso em solução tampão fosfato (pH 7,4). Todo o experimento foi conduzido com a devida aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Alfenas (MG).

### **3.9.1 Determinação de marcadores de função hepática**

Os parâmetros ALT, AST, proteínas totais e albumina foram determinados por método colorimétrico no soro dos ratos. O sangue foi coletado nos animais em jejum de 12 horas por punção cardíaca, após anestesia.

### **3.9.2 Determinação da inibição da peroxidação de lipídeos**

A fim de determinar se a bebida de café foi capaz de reduzir o estresse oxidativo, foi analisada a peroxidação de lipídeos isolados de fígados de ratos. A peroxidação de lipídios foi determinada pela formação de substâncias reativas

com ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Winterbourn et al. (1981). Os produtos da peroxidação de lipídeos reagem com o ácido tiobarbitúrico produzindo um composto que apresenta absorvância a 532 nm.

Os fígados dos animais foram pesados e homogeneizados em homogeneizador de tecidos, em banho de gelo, após adição de PBS 0,1 M, pH 7,4 (volume equivalente a 4 vezes o peso fresco de tecido). O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 g, por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante, mantido em banho de gelo, foi utilizado nos ensaios. Alíquotas de 500 µL do sobrenadante foram misturadas a 500 µL de ácido clorídrico a 25% (v/v), 500 µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (p/v, em NaOH 0,05 M) e 45µL de BHT 2% (p/v, em etanol). A mistura foi aquecida em banho de água fervente, durante 10 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo por 10 minutos foram adicionados 1,5 mL de butanol e as amostras agitadas vigorosamente em vórtex. A seguir, foram centrifugadas a 900g, por 5 minutos e a fração contendo butanol foi recolhida e utilizada para a determinação da absorvância a 532 nm. A concentração de TBARS foi calculada a partir da curva padrão de dialdeído malônico (MDA; 1,1,3,3 tetraetoxipropano). Os resultados foram expressos nmoles de MDA/g de proteína.

### **3.9.3 Determinação da concentração de proteínas do homogeneizado de fígado**

A concentração de proteínas do homogeneizado do fígado foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Uma alíquota contendo 10µL de homogeneizado de fígado foi adicionada a 790 µL de água destilada e 200 µL de comassie Brilliant Blue G-250 em etanol 95% m/v. Em seguida, foi determinada a densidade ótica a 595 nm, em espectrofotômetro. A concentração protéica (µg/10µL) foi

calculada por inserção numa curva de calibração previamente feita com BSA (5 – 25  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### **3.9.4 Determinação de lipídeos no fígado**

Os lipídeos totais do fígado foram determinados seguindo a metodologia proposta por Folch et al. (1957), com modificações. Os fígados foram liofilizados em liofilizador Liobrás (L101) e triturados em almofariz, 1g do pó resultante foi colocado em cartuchos de celulose e os lipídeos foram extraídos com éter etílico 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.

#### **3.10 Delineamento experimental**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Para os parâmetros sólidos solúveis, polifenóis, cafeína, trigonelina, ácido clorogênico e poder redutor utilizou-se 4 tipos de café (café integral verde, café descafeinado verde, café integral torrado e café descafeinado torrado) e 5 repetições para cada tratamento.

Para a atividade seqüestrante de radicais livres DPPH e atividade quelante, foram utilizados 4 tipos de bebida (café integral verde, café descafeinado verde, café integral torrado e café descafeinado torrado), 4 concentrações (0,0125; 0,025; 0,05 e 0,1  $\text{g.dL}^{-1}$ ) e 3 repetições para cada tratamento. Para o poder quelante de metais, foram utilizados 4 tipos de bebida (café integral verde, café descafeinado verde, café integral torrado e café descafeinado torrado), 3 concentrações (0,15; 0,20 e 0,40  $\text{g.dL}^{-1}$ ) e 3 repetições para cada tratamento.

Para o ensaio biológico foi utilizado um delineamento inteiramente

casualizado em esquema fatorial  $2 \times 2 + 2$  (dois tipos de café – integral e descafeinado – duas formas de processamento – verde ou torrado – e dois tratamentos adicionais – com e sem  $\text{CCl}_4$ ), totalizando seis tratamentos com quatro repetições.

### **3.11 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% . Para observar a influência da concentração das bebidas de café sobre a atividade sequestrante de DPPH e atividade quelante de metais, foi utilizado o teste de Regressão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Sistema para Análise de Variância), desenvolvido por Ferreira (2000). Para o ensaio biológico, efetuou-se análise de variância global, com todos os tratamentos, a fim de se obter o quadrado médio do resíduo para testar o fatorial e realizar o teste Dunnet a 5%, comparando-se os tratamentos controles (positivo e negativo) a cada um dos tratamentos. O teste F foi utilizado para testar os tratamentos no esquema fatorial.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise de cor

As amostras foram torradas e em seguida sua cor foi mensurada. Os resultados médios obtidos referentes aos cafés integral e descafeinado para a variável cor estão apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 Análise de cor dos grãos de café torrado e moído, de acordo com os parâmetros de cromaticidade da escala CIE L\* a\* b\*.

Tipo de Bebida	Parâmetros de Cromaticidade				
	L*	a*	b*	c*	h <sub>ab</sub> *
<i>Integral</i>	20,17	14,64	26,40	30,19	60,99
<i>Descafeinado</i>	20,02	15,43	27,97	31,94	61,12
<b>Média</b>	20,25	15,04	27,19	31,07	61,06

L\*= luminosidade; c\*= croma; h= tonalidade.

Não foi observada diferença entre os parâmetros de cromaticidade das amostras. 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, F. et al., 2002), demonstrando que foi obtido o mesmo grau de torração em ambas as amostras.

## 4.2 Compostos fenólicos

Determinou-se a concentração de compostos fenólicos totais das bebidas de café verde e torrado. Os valores percentuais médios das determinações dos compostos fenólicos são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4 Conteúdo de polifenóis (g eq. ac. tânico / 100g) de dois tipos de bebida do café submetido a dois tipos de processamento.

Tipo de Bebida	Processamento		Média
	Verde	Torrado	
<i>Integral</i>	5,30 aA	4,73 aB	5,02a
<i>Descafeinado</i>	5,05 bA	4,13 bB	4,59b
<b>Média</b>	5,18A	4,43B	

CV (%) = 1,49

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

Os cafés verdes apresentaram um maior teor de compostos fenólicos comparados aos cafés torrados. Durante o processo de torração, parte desses compostos são degradados. A amostra verde integral apresentou teor de polifenóis significativamente maior que a amostra verde descafeinada. O café integral, ao passar pelo processo de descafeinação, perde, além da cafeína, parte dos seus compostos fenólicos (Toci et al., 2006), o que pode explicar a diferença nos teores entre as amostras verdes.

Os compostos fenólicos são compostos bioativos do café, sendo assim, a diferença nos teores entre as amostras analisadas pode interferir na atividade antioxidante entre as bebidas de café analisadas.

A análise do teor de compostos fenólicos é de grande importância quando se pretende verificar atividade antioxidante de uma amostra. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (Basile et al., 2005).

### 4.3 Sólidos solúveis

A técnica indicada para análise de sólidos solúveis, de acordo com a portaria nº 377, de 26 de abril de 1999, é a do extrato aquoso. O extrato aquoso do café torrado e moído representa a quantidade de substâncias capazes de se solubilizarem em água fervente.

Os teores médios de sólidos solúveis de grãos verdes e torrados das bebidas analisadas estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 Conteúdo de sólidos solúveis totais (%) das bebidas de cafés verdes e torrados.

Tipo de Bebida	Processamento		Média
	Verde	Torrado	
<i>Integral</i>	2,38	2,28	2,53
<i>Descafeinado</i>	2,23	2,2	2,09
<b>Média</b>	2,38	2,24	
<b>CV (%) = 4,07</b>			

A concentração de sólidos solúveis está ligada ao rendimento industrial e ao corpo da bebida. Durante a torração, os teores de sólidos solúveis

diminuem, como consequência da perda de ácidos orgânicos e da volatilização de alguns compostos no processo pirolítico (Mendonça et al., 2005). Porém, essa redução não foi significativa entre as amostras de café analisadas. Os teores de sólidos solúveis totais encontrados estão próximos aos valores de 2% encontrados por Santos et al. (2007) e indicam que foram comparadas amostras com o mesmo rendimento.

#### **4. 4 Cafeína, trigonelina e ácido clorogênico**

Os teores de trigonelina, ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) e cafeína foram calculados a partir de padrões e dos cromatogramas obtidos para cada amostra. Os tempos de retenção identificados foram os seguintes: trigonelina (~3 minutos), ácido clorogênico (~9 minutos) e cafeína (~10 minutos).

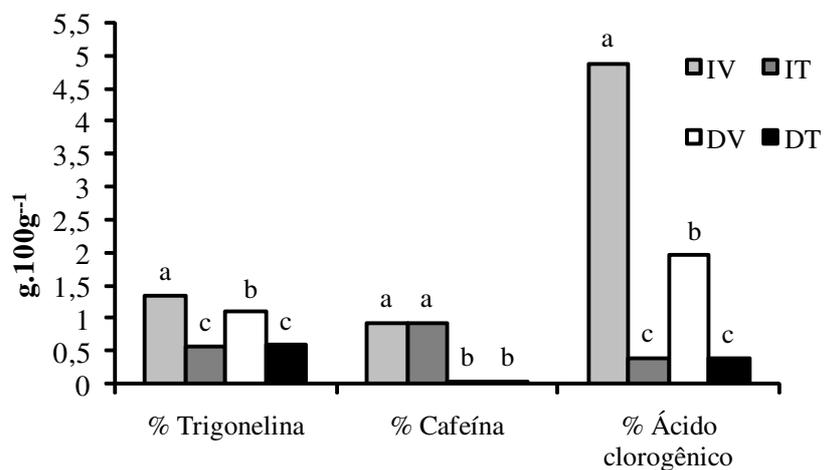


FIGURA 2 Teores médios de ácido clorogênico (5-ACQ), cafeína e trigonelina em cafés integral verde (IV), descafeinado verde (DV), integral torrado (IT) e descafeinado torrado (DT). Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Scott-knott.

Ao contrário da cafeína, a trigonelina não apresenta estabilidade térmica, sendo bastante sensível à torração, semelhantemente aos ácidos clorogênicos, (Nogueira & Trugo, 2003).

Foi encontrado teor de trigonelina de 1,34% na amostra integral verde. A amostra descafeinada verde (1,11%) apresentou uma redução significativa de 17% no teor de trigonelina em relação à amostra integral. Grandes perdas foram observadas durante o processo de torração (Figura 2), com perdas de 57 e 48%, nas amostras integral (0,57%) e descafeinada (0,58%), respectivamente. Valores próximos foram encontrados por Perrone et al. (2008), que verificaram teores de trigonelina de 1,03% em amostras de café arábica verde e uma faixa de 0,3 a 1%

em amostras de cafés torrados comerciais. Em amostras de café descafeinado encontraram 0,7% de trigonelina.

De acordo com Clifford (1975), a degradação da trigonelina é fortemente dependente do tempo e da temperatura de torra. As perdas de trigonelina podem variar de 50 a 100%, de acordo com o grau de torra.

As amostras torradas não apresentaram diferença significativa no teor de trigonelina (Figura 2), porém a diferença nos teores entre as amostras verdes deve se refletir tanto no valor nutricional quanto no aspecto sensorial do café descafeinado, já que a degradação térmica da trigonelina gera a vitamina niacina (ácido nicotínico) e compostos voláteis responsáveis pelo *flavor* da bebida. Sendo assim, é muito provável que durante a torração a amostra integral tenha gerado uma quantidade maior de niacina e de compostos voláteis que a amostra descafeinada.

O teor de cafeína (0,92 %) encontrado na amostra integral verde está de acordo com os valores encontrados por Perrone et al. (2008), ambos em acordância com os valores relatados na literatura para grãos verdes de café arábica – de 0,9 a 1,3 g% (Clifford, 1975). O teor de cafeína da amostra verde descafeinada (0,03 g%) encontra-se de acordo com a legislação brasileira, que define um patamar de 0,1% de cafeína em café descafeinado (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, 1999).

Durante o processo de torração, observou-se a estabilidade da cafeína na amostra de café integral. Sabe-se que pequenas perdas de cafeína podem ocorrer por sublimação a 178°C. Com o processo de torração, as temperaturas no interior do torrador variaram em torno de 170-230 °C, podendo haver perdas dessa substância. A perda de compostos termolábeis durante a torração ocasiona um aumento percentual relativo nos teores de cafeína (Figura 2). 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 (Clarke, 2003).

O teor de ácido clorogênico (5-ACQ) foi reduzido com o processo de descafeinação, com perda de 60% na amostra descafeinada verde. Essa perda pode ter ocorrido, em parte, devido à complexação entre cafeína e ácido 5-cafeoilquínico descrita na literatura (Waldhauser & Baumann, 1996). No entanto, tendo em vista o baixo teor de 5-ACQ complexado à cafeína no café, outras causas devem ser consideradas. A diminuição deve ter ocorrido, em sua maior parte, devido à isomerização do 5-ACQ quando em contato com altas temperaturas para evaporação do solvente e secagem dos grãos durante o processo de descafeinação com diclorometano (Toci et al., 2006).

Os valores de ácido clorogênico encontrados para os cafés verdes integral (4,87%) e descafeinado (1,95%) e para os cafés torrados integral (0,4%) e descafeinado (0,38%) estão de acordo com os valores encontrados por Fujioka & Shibamoto (2008), que analisaram cafés comerciais integral e descafeinado, que apresentaram perdas de 93% de ACG com o processo de torração, valor próximo ao encontrado nesse estudo (92%). Após a torração, encontraram a mesma concentração de ACG entre as amostras torradas integral e descafeinada, o mesmo foi observado neste estudo.

A permanência residual de maiores teores de ácidos clorogênicos após o processamento do café pode ser benéfica, tendo em vista a atividade antioxidante dessa classe de compostos (Stadler et al., 1994).

#### **4.5 Atividade seqüestrante de radicais DPPH**

O mecanismo de redução de radicais livres DPPH envolve a doação de hidrogênio. Neste sistema, tanto a estrutura planar como espacial do composto antioxidante é importante. Baseando-se em dados da literatura, é possível inferir que a potente atividade antioxidante de extratos polares é dada pela presença de

substâncias com hidroxilas (Harborne & Williams, 2001; Mensor et al., 2001).

Assim, os resultados indicam que todas as amostras analisadas apresentam capacidade para doar hidrogênio, pois apresentaram atividade seqüestrante de DPPH.

Na Tabela 6, estão representados os resultados da atividade seqüestrante de radicais DPPH das bebidas de café. O butil hidroxi tolueno (BHT) foi utilizado como padrão.

TABELA 6 Atividade sequestrante do radical DPPH (%) das bebidas de café integral e descafeinado, verde e torrado, em quatro concentrações.

Tipo de Bebida	Concentração (g.dL <sup>-1</sup> )				Média
	0,0125	0,025	0,05	0,1	
<i>Integral torrado</i>	55,86b	64,77b	68,47b	70,20b	64,82b
<i>Integral verde</i>	50,49d	53,91c	54,40d	55,51d	53,58d
<i>Descaf. torrado</i>	52,99c	64,04b	64,66c	68,46c	62,53c
<i>Descaf. verde</i>	47,50e	49,89d	50,92e	54,80d	50,78e
<i>BHT</i>	57,61a	74,67a	88,69a	94,80a	78,94a
<b>Média</b>	52,89d	61,45c	65,43b	68,75a	

CV (%) = 1,3

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

O padrão BHT apresentou a maior atividade sequestrante de DPPH em todas as concentrações com um patamar de 94,8%. Entre as amostras de café analisadas, as torradas apresentaram a maior porcentagem de seqüestro, chegando a 70,2% de atividade na concentração máxima testada (0,1 g.dL<sup>-1</sup>) (Tabela 6).

O teste de regressão mostrou que a atividade sequestrante de radicais DPPH foi dose-dependente para todas as amostras avaliadas, ou seja, quanto maior a concentração das amostras maior a sua atividade antioxidante (Figura 3).

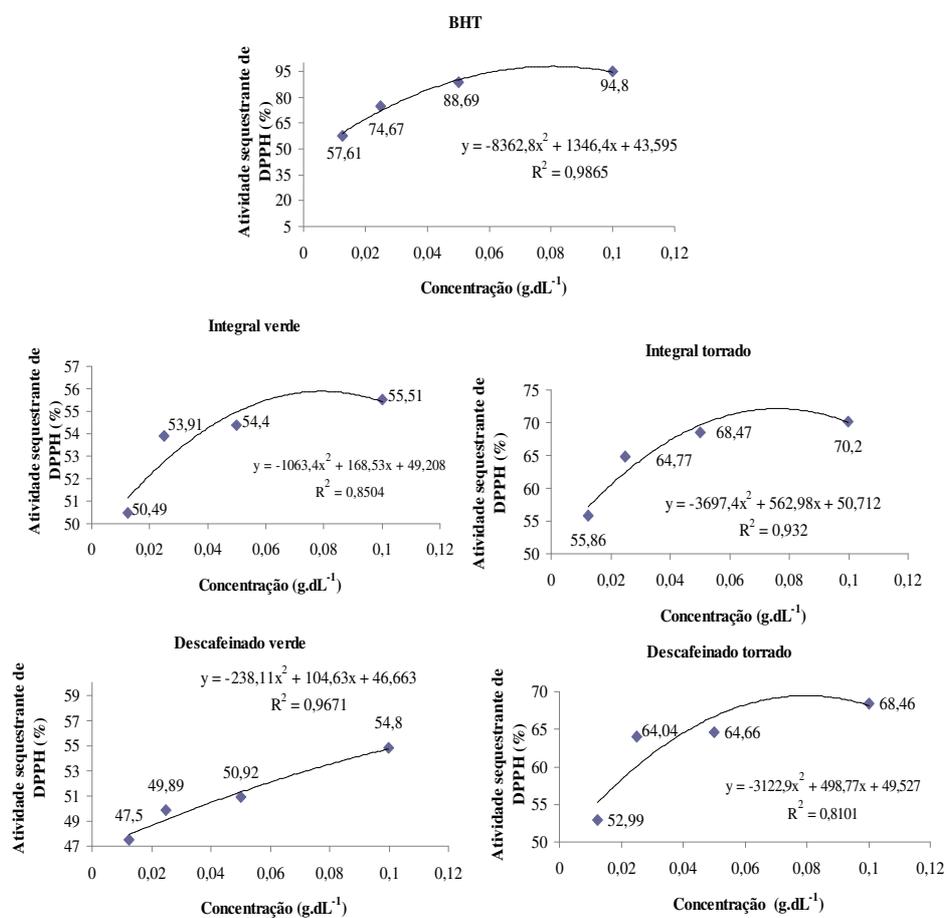


FIGURA 3 Atividade sequestrante de radicais livres DPPH de diferentes concentrações do padrão BHT e das bebidas de café verde e torrado, integral e descafeinado.

O processo de descafeinação e a torração influenciaram na atividade antioxidante das bebidas de café ( $p < 0,05$ ). As bebidas preparadas a partir dos cafés descafeinados apresentaram menor atividade, demonstrando que substâncias seqüestradoras de radicais livres foram, em parte, perdidas durante o processo de descafeinação (Tabela 6). A atividade sequestrante de radicais livres dos cafés verdes foi menor que a apresentada por Naidu et al. (2007), que encontrou valores próximos a 80% em cafés verdes da espécie arábica.

A atividade antioxidante das bebidas foi potencializada com a torração. O mesmo comportamento foi verificado em grãos de café torrados que apresentaram maior atividade antioxidante quando comparados a grãos verdes, que por sua vez contêm maiores concentrações de antioxidantes polifenólicos (Nicoli et al., 1997; Daglia et al., 2000), sugerindo assim que outros compostos, que não os fenólicos, poderiam ser responsáveis pela atividade antioxidante em grãos de café submetidos à torração.

Os resultados apresentados indicam que as bebidas de café torradas, independentemente da descafeinação, apresentam uma maior capacidade de doar hidrogênio, pois apresentaram as maiores porcentagens sequestrante de DPPH.

#### **4.6 Poder redutor**

O teste de avaliação do poder redutor baseia-se na redução do íon ferricianeto a ferrocianeto que, na presença do íon férrico (proveniente do  $\text{FeCl}_3$ ) forma o azul da Prússia (Santos et al., 2007). A redução é dada tomando-se o BHT como 100%.

As médias das porcentagens do poder redutor das bebidas de café amostradas estão apresentadas na Tabela 7.

TABELA 7 Poder redutor (%) da bebida de café integral e descafeinado, verde e torrado.

<b>Tipo de Bebida</b>	<b>Processamento</b>		<b>Média</b>
	<i>Verde</i>	<i>Torrado</i>	
<i>Integral</i>	53,48 aB	76,75 aA	65,12a
<i>Descafeinado</i>	48,10 bB	58,99 bA	53,55b
<b>Média</b>	50,79B	67,87A	
<b>CV (%) = 3,18</b>			

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

O processo de descafeinação diminuiu a capacidade redutora das bebidas em 10%. Neste caso, é muito provável que essa diferença se deva ao menor teor de polifenóis e de cafeína na amostra verde descafeinada. Já a torração do café integral aumentou em 43% o poder redutor da bebida, esse efeito não foi tão pronunciado na amostra descafeinada que após a torração aumentou em 23% seu poder redutor ( $p < 0,05$ ) (Tabela 7).

Nicoli et al. (1997) ao estudarem o efeito do processamento e armazenamento de alimentos (tomates e café) relataram que, apesar de a concentração dos antioxidantes naturais ter sido significativamente reduzida em consequência dos tratamentos térmicos, as propriedades antioxidantes dos alimentos estavam preservadas ou mesmo aumentadas pelo desenvolvimento de novos produtos com atividade antioxidante. Daglia et al. (2000) também verificaram um aumento no poder redutor com a torração em cafés arábica.

Os resultados obtidos indicam novamente a presença de outras substâncias com propriedades antioxidantes formadas durante o processo de

torração, como as melanoidinas formadas através da reação de Maillard (López-Galilea et al., 2006).

#### 4.7 Poder quelante de Fe<sup>2+</sup>

Na avaliação da atividade quelante, o ferrozine, um reagente cromogênico, torna a solução rósea de acordo com a quantidade de ferro disponível em solução. Assim, quanto menor a quelação de íons pela amostra, maior o número de íons disponíveis para reação com a ferrozina e maior será a absorvância. Os resultados do poder quelante estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8 Poder quelante de Fe<sup>2+</sup> (%) da bebida de café integral e descafeinado, verde e torrado.

Tipo de Bebida	Concentração (g.dL <sup>-1</sup> )			Média
	0,15	0,2	0,4	
<i>Integral torrado</i>	5,78c	16,77c	38,28c	20,27c
<i>Integral verde</i>	36,58a	51,04a	72,73a	53,45a
<i>Descafeinado torrado</i>	5,13c	15,67c	28,42d	16,40d
<i>Descafeinado verde</i>	25,68b	44,12b	63,27b	44,35b
<b>Média</b>	18,29c	31,9b	50,67a	

CV (%) = 5,69

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

Assim como nos testes anteriores, houve influência da descafeinação e da torração no poder quelante das amostras (p<0,05). Através da regressão, verificou-se que todas as amostras apresentaram poder quelante de metais dose-dependente, que atingiu o seu máximo com a amostra verde integral apresentando 72,73% de atividade quelante. Esse teste promoveu boa

visualização das diferenças ocorridas, pois os dados foram bem ajustados ao modelo quadrático (Figura 4).

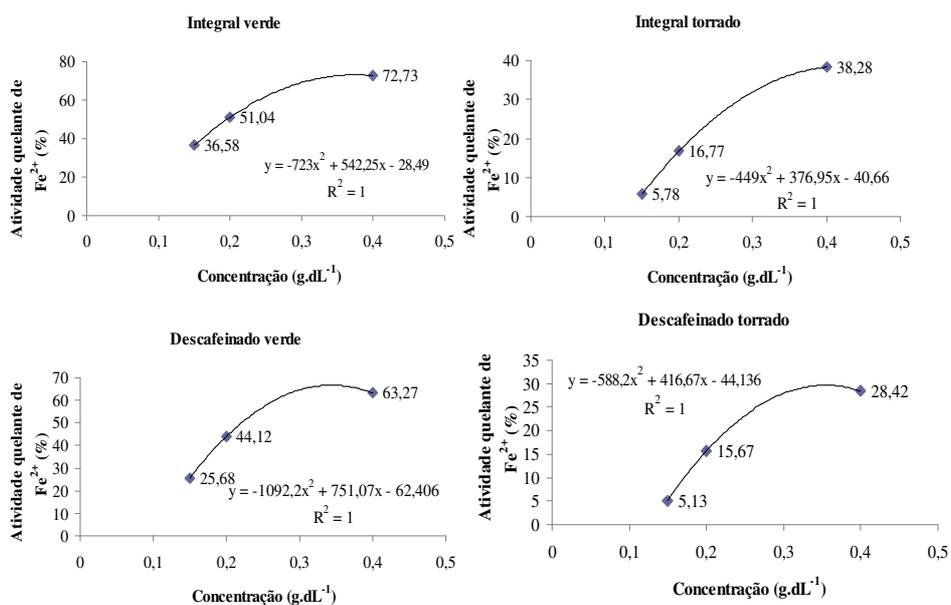


FIGURA 4 Atividade quelante de Fe<sup>2+</sup> (%) de diferentes concentrações das bebidas de café verde e torrado, integral e descafeinado.

As amostras de café verde superaram as amostras torradas (Tabela 8). Os resultados apresentados estão de acordo com Santos et al. (2007), que encontraram uma maior atividade quelante nas amostras de café verde, provavelmente devido à presença de compostos fenólicos funcionais.

A diminuição de compostos com atividade quelante como polifenóis e cafeína durante o processo de descafeinação pode ter levado à diminuição dessa atividade nas amostras descafeinadas. Os cafés torrados independente do processo de descafeinação mostraram o mesmo poder quelante de metais, com

exceção na concentração de  $0,4 \text{ g.dL}^{-1}$ , na qual o café torrado integral superou o café torrado descafeinado.

Nesta análise, os cafés verdes demonstraram maior atividade antioxidante que os torrados diferentemente do resultado obtido na análise da atividade seqüestrante de radicais livres e poder redutor. Uma maior concentração de polifenóis neste caso é favorável, pois um dos seus mecanismos de ação antioxidante de especial relevância é a capacidade de se ligar a metais tais como íons ferro e cobre, impedindo ou minimizando a participação destes em reações de Fenton (Lopes et al., 1999).

Assim, a bebida de café pode ser considerada como antioxidante e sua ingestão pode contribuir para a quelação de metais de transição, que pode levar à peroxidação lipídica, com conseqüente lesão às membranas plasmáticas e à oxidação do DNA, causando injúria ou morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Nota-se que a atividade antioxidante das amostras analisadas variou conforme a metodologia utilizada, o que demonstra a importância da realização de mais de uma análise para que se tenha uma maior confiabilidade dos resultados.

## **4.8 Provas de função hepática**

### **4.8.1 Atividade das transaminases ALT e AST**

De acordo com Jimenez et al. (1992), a administração aguda de tetracloreto de carbono causa necrose e esteatose centrolobular, corroborando os resultados do presente estudo, em que o tetracloreto aplicado intraperitoneal causou injúria no fígado dos ratos, injúria esta comprovada a partir da diferença significativa nos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e de aspartato aminotransferase (AST) entre os grupos controle negativo e controle positivo.

Os resultados de ALT e AST estão apresentados respectivamente nas Tabelas 9 e 10.

TABELA 9 Concentração da enzima ALT (U/L) nos grupos tratados com as amostras de café integral e descafeinado submetidos a dois processamentos (verde e torrado) e nos grupos controle.

Tipo de café	Processamento		Média
	Verde	Torrado	
Integral	141,24* <sup>†</sup>	141,91* <sup>†</sup>	141,57
Descafeinado	144,57* <sup>†</sup>	145,39* <sup>†</sup>	144,98
Média	142,91	143,65	
Controle negativo	39,68		
Controle positivo	233,0		
CV (%)	9,11		

\* diferem do controle positivo pelo teste Dunnett (P<0,05)

<sup>†</sup> diferem do controle negativo pelo teste Dunnett (P<0,05)

TABELA 10 Concentração da enzima AST (U/L) nos grupos tratados com as amostras de café integral e descafeinado submetidos a dois processamentos (verde e torrado) e nos grupos controle.

Tipo de café	Processamento		Média
	Verde	Torrado	
Integral	248,05* <sup>†</sup>	259,22* <sup>†</sup>	253,63
Descafeinado	243,47* <sup>†</sup>	244,88* <sup>†</sup>	244,18
Média	245,76	252,05	
Controle negativo	108,19		
Controle positivo	327,49		
CV (%)	5,75		

\* diferem do controle positivo pelo teste Dunnett (P<0,05)

<sup>†</sup> diferem do controle negativo pelo teste Dunnett (P<0,05)

O grupo tratado com tetracloreto de carbono apresentou índices de AST e ALT significativamente maiores que o grupo tratado com água. Em todos os grupos tratados com café, houve uma diminuição significativa nos índices de AST e ALT quando comparados ao grupo controle positivo (tratado com tetracloreto de carbono). Porém, esses índices não chegaram aos seus valores basais (controle negativo). Entre os grupos tratados com as diferentes bebidas, não houve diferença significativa, mostrando que as bebidas de café, independentemente do processo de descafeinação e da torração, protegeram os fígados da injúria causada pelo tetracloreto de carbono.

Um estudo verificou o efeito do café solúvel sobre danos hepáticos causados por tetracloreto de carbono e os resultados apresentados estão de acordo com os resultados do presente estudo. Encontraram níveis de AST e ALT no grupo tratado com tetracloreto de carbono significativamente maior que os do grupo controle. Neste mesmo trabalho, verificaram níveis de AST e ALT no grupo tratado com tetracloreto mais café solúvel significativamente menor que

nos grupos tratados apenas com tetracloreto de carbono ( $p < 0.05$ ) (Ozercan et al., 2006).

#### 4.8.2 Albumina e proteínas totais séricas

Das proteínas do plasma sanguíneo, a albumina é a mais abundante, constituindo cerca de 50 a 65 %. A albumina é sintetizada no fígado e o fator mais determinante para a sua concentração sanguínea é a capacidade do fígado em sintetizá-la. O acúmulo de gordura hepática causa uma redução na capacidade de síntese deste órgão, com conseqüente redução na concentração da albumina (Nicoluzzi et al., 2000). As concentrações de albumina e proteínas totais estão apresentadas nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

TABELA 11 Concentração sérica de albumina (g/dL) nos grupos tratados com as amostras de café integral e descafeinado submetidos a dois processamentos (verde e torrado) e nos grupos controle.

Tipo de café	Processamento		Média
	Verde	Torrado	
Integral	4,77* <sup>†</sup>	5,22* <sup>†</sup>	5,00
Descafeinado	4,90* <sup>†</sup>	5,24* <sup>†</sup>	5,07
Média	4,84 b	5,23 a	
Controle negativo	5,73		
Controle positivo	4,27		
CV (%)	2,09		

\* diferem do controle positivo pelo teste Dunnett ( $P < 0,05$ )

<sup>†</sup> diferem do controle negativo pelo teste Dunnett ( $P < 0,05$ )

O grupo controle positivo, tratado com  $CCl_4$ , apresentou teor de albumina significativamente menor que o grupo controle negativo, indicando que o tetracloreto de carbono diminuiu os índices de albumina no soro dos ratos.

Os grupos tratados com tetracloreto associado às bebidas de café tiveram valores significativamente maiores que o grupo controle positivo e valores menores que o grupo negativo.

Os índices séricos de albumina nos grupos tratados com café torrado (integral e descafeinado) foram significativamente maiores que os grupos tratados com café verde (integral e descafeinado).

Esses resultados mostram que houve uma proteção maior dos cafés torrados quando comparados aos cafés verdes. Não houve influência da descafeinação sobre os níveis séricos de albumina.

A Tabela 12 mostra a concentração de proteínas totais no soro dos grupos tratados com as diferentes bebidas de café, comparados aos grupos controle.

TABELA 12 Concentração sérica de proteínas totais (g/dL) nos grupos tratados com as amostras de café integral e descafeinado submetidos a dois processamentos (verde e torrado) e nos grupos controle.

Tipo de café	Processamento		Média
	Verde	Torrado	
Integral	5,275 <sup>†</sup>	6,150*	5,713
Descafeinado	4,848 <sup>†</sup>	6,045*	5,446
Média	5,061 b	6,098 a	
Controle negativo	7,523		
Controle positivo	4,108		
CV (%)	10,95		

\* diferem do controle positivo pelo teste Dunnett (P<0,05)

<sup>†</sup> diferem do controle negativo pelo teste Dunnett (P<0,05)

A administração de  $\text{CCl}_4$  levou à diminuição nos níveis séricos de proteínas totais, evidenciado através da diferença significativa entre os grupos negativo e positivo.

A concentração de proteínas séricas nos grupos tratados com as bebidas de café torrado diferiu do grupo controle positivo e não diferiu do grupo controle negativo, ou seja, a administração da bebida de café torrado aumentou os níveis séricos de proteínas totais retornando aos valores basais encontrados no controle negativo.

Os níveis séricos de proteínas totais dos grupos tratados com as bebidas de café verde não diferiram dos níveis encontrados no grupo controle positivo, demonstrando que não houve influência das bebidas de café verde sobre os valores de proteínas totais. Esses resultados mostram que houve uma proteção apenas dos cafés torrados sem influência da descafeinação.

#### **4.9 Lipídeos totais do fígado**

A presença de xenobióticos no fígado, como o tetracloreto de carbono, causa injúria e conseqüente acúmulo de lipídeos no fígado levando a um quadro de esteatose hepática. Os resultados foram expressos em porcentagem de gordura em relação à matéria integral e estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 Concentração de lipídeos totais no fígado (%) em relação à matéria integral nos grupos tratados com as amostras de café integral e descafeinado submetidos a dois processamentos (verde e torrado) e nos grupos controle.

Tipo de café	Processamento		Média
	Verde	Torrado	
Integral	4,06* <sup>†</sup>	4,08* <sup>†</sup>	4,07
Descafeinado	4,77* <sup>†</sup>	3,91* <sup>†</sup>	4,34
Média	4,42	4,00	
Controle negativo	2,53		
Controle positivo	7,34		
CV (%)	12,69		

\* diferem do controle positivo pelo teste Dunnett (P<0,05)

<sup>†</sup> diferem do controle negativo pelo teste Dunnett (P<0,05)

O teor de lipídeos totais no fígado dos grupos tratados com tetracloreto de carbono foi significativamente maior que no grupo controle negativo (tratado com água), indicando que o xenobiótico eleva os índices lipídicos hepáticos. Os grupos tratados com tetracloreto de carbono em associação com as bebidas de café tiveram uma diminuição nos níveis de lipídeos quando comparados ao controle positivo. Já entre as bebidas de café, não houve diferença significativa. As bebidas de café, independentemente do tipo e do processamento, impediram o acúmulo de gordura no fígado, porém não retornando aos valores basais encontrados no grupo controle negativo.

Substâncias capazes de combater o estresse oxidativo são capazes de proteger o fígado do acúmulo indevido de gordura, portanto as substâncias antioxidantes presentes nas bebidas de café podem ter contribuído na diminuição do acúmulo de gordura hepática.

#### 4.10 Inibição da peroxidação de lipídios *in vivo*

A peroxidação lipídica é uma das principais conseqüências da injúria hepática causada por CCl<sub>4</sub> e é mediada pela produção de radicais livres derivados do CCl<sub>4</sub>. Entretanto, a atividade antioxidante e/ou inibitória da geração de radicais livres é importante em termos de proteção contra danos no fígado causados por CCl<sub>4</sub> (Campo et al., 2001).

A inibição da peroxidação lipídica foi calculada através da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA). Os teores de MDA nos diferentes grupos estão apresentados na Tabela 14.

TABELA 14 Teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol de MDA/mg de proteína) nos grupos tratados com as amostras de café integral e descafeinado submetidos a dois processamentos (verde e torrado) e nos grupos controle.

Tipo de café	Processamento		Média
	Verde	Torrado	
Integral	0,290* <sup>†</sup>	0,240* <sup>†</sup>	0,265
Descafeinado	0,295* <sup>†</sup>	0,230* <sup>†</sup>	0,263
Média	0,293 a	0,235 b	
Controle negativo	0,148		
Controle positivo	0,378		
CV (%)	12,22		

\* diferem do controle positivo pelo teste Dunnett (P<0,05)

<sup>†</sup> diferem do controle negativo pelo teste Dunnett (P<0,05)

Todas as amostras apresentaram inibição da peroxidação lipídica e a torração influenciou positivamente nessa inibição. Já o processo de descafeinação não influenciou a lipoperoxidação.

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  $\text{Fe}^{+2}$  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).

Como o conteúdo de compostos fenólicos foi reduzido com a torração e descafeinação, provavelmente outras substâncias formadas durante a torração podem agir sinergisticamente com os compostos fenólicos para a inibição da peroxidação de lipídeos observada nas bebidas de café. Alguns autores têm sugerido que os produtos da reação de Maillard, formados durante a torração do café, apresentam atividade antioxidante e podem ter contribuído com o resultado encontrado (López-Galilea et al., 2006).

Apesar de alguns autores terem demonstrado atividade antioxidante da cafeína (Devasagayam et al., 1996), nenhuma correlação foi observada neste estudo *in vivo*. Vale ressaltar que quando a bebida é administrada como um todo e não como componentes isolados, mesmo doses baixas de um determinado composto, podem exercer um efeito protetor importante se diferentes componentes interagirem aditivamente.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados desse trabalho permitiram concluir que:

- Todas as bebidas de café analisadas, independentemente do processo de torração ou de descafeinação, apresentam poder redutor, atividade seqüestrante de radicais livres e atividade quelante de metais;
- A descafeinação diminui a atividade antioxidante *in vitro* da bebida do café;
- As bebidas preparadas a partir de amostras de café verde, independentemente do processo de descafeinação, apresentam capacidade quelante de  $Fe^{2+}$  superior às bebidas de café preparadas a partir de amostras de café torrado;
- O processo de torração potencializa a atividade seqüestrante de radicais livres e o poder redutor das bebidas do café;
- A torração potencializa a atividade antioxidante *in vivo* do café;
- O processo de descafeinação não interfere na proteção hepática entre as amostras verdes e entre as amostras torradas verificadas no ensaio biológico.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, R. V. **O sistema de biotransformação hepático, induzido pela desnutrição e pelo paracetamol, é modulado pela ingestão de café.** 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Legislação sobre descafeinação:** portaria nº 377, de 26 de abril de 1999. Brasília, DF, 1999.

ALBA, L. M.; LINDOR, K. Review article: non-alcoholic fatty liver disease. **Aliment Pharmacology Therapy**, v. 17, p. 977-986, 2003.

ALMEIDA, A. A. P.; OLIVEIRA, L. S. de; SANTOS, T. M.; GLÓRIA, M. B. A. Café e saúde: três décadas de estudos. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 7, p. 56-63, 2003. Especial Café.

AMSTALDEN, L. C.; LEITE, F.; MENEZES, H. C. Identificação e quantificação de voláteis de café através da cromatografia gasosa de alta resolução: espectrometria de massas empregando um amostrador automático de "headspace". **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 123-128, 2001.

ARAÚJO, C. E. P. **Efeito de um antifúngico derivado imidazólico – Cetoconazol sobre o perfil enzimático da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase no soro de ratos parcialmente hepatectomizados.** 1992. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, SP.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Exportação.** Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 4 nov. 2007a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Estatísticas.** Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 4 nov. 2007b.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Sabor do café.** Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>. Acesso em: 4 nov. 2007c.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais.** São Paulo: Oficina de Textos, 2006. 120 p.

AVANZO, B. d'; SANTORO, L.; NOBILL, A.; LA VECCHIA, C. Coffee consumption and serum cholesterol: GISSI-EFRIM study group. **Prev. Med.**, v. 22, n. 2, p. 219-224, 1993.

BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL POZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 32-36, 2005.

BATTRAM, D. S.; ARTHUR, R.; WEEKES, A.; GRAHAM, T. E. The glucose intolerance induced by caffeinated coffee ingestion is less pronounced than that due to alkaloid caffeine in men. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1276-1280, 2006.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Nutrição**, v. 112, p. 123-130, 1999.

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. 3-8, 2002.

BORGES, M. L. A.; FRANÇA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; CORREA, P. C.; GLORIA, M. B. A. Estudo da variação da coloração de café arábica durante a torrefação em diferentes condições de aquecimento. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 5, p. 3-8, 2002. Edição especial.

BRACKEN, M. B.; TRICHE, E. W.; GROSSO, L.; HELLENBRAND, K.; BELANGER, K.; LEADERER, B. P. Heterogeneity in assessing self-reports of caffeine exposure: implications for studies of health effects. **Epidemiology**, v. 13, p. 165-171, 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.

BRENELLI, E. C. S. Extração de caféina em bebidas estimulantes: uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 136-138, 2003.

BROWN, J.; KREIGER, N.; DARLINGTON, G. A.; SLOON, M. Misclassification of exposure: coffee as a surrogate for caffeine intake. **American Journal Epidemiology**, v. 153, p. 815-820, 2001.

BUNKER, M. L.; MCWILLIAMS, M. Caffeine content of common beverages. **Journal American Diet Association**, v. 74, n. 1, p. 28-32, 1979.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F. Teor de cafeína em cafés brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, p. 421-424, 1998.

CAMARGO, M. C. R.; TOLEDO, M. C. F.; FARAH, H. G. Caffeine daily intake from dietary sources in Brazil. **Food Additives Contamination**, v. 16, p. 79-87, 1999.

CAMERON, J. R.; KARUNARATE, W. A. E. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. **Journal Pathology Bacteriology**, v. 92, p. 1-4, 1936.

CAMPO, G. M.; SQUADRITO, F.; CECCARELLI, S.; CALO, M.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; SQUADRITO, G.; ALTAVILLA, D. Reduction of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by IRFI 042, a novel dual vitamin E-like antioxidant. **Free Radic. Research**, v. 34, p. 379-393, 2001.

CARREGARO, A. B.; WOODS, W. E.; TOBIN, T.; QUEIROZ-NETO, A. Comparison of the quantification of caffeine in human plasma by gas chromatography and ELISA. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v. 34, n. 6, p. 821-824, 2001.

CARVALHO, V. D.; CHAGAS, S. J. R.; SOUZA, S. M. C. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 5-20, 1997.

CAVIN, C.; BEZENCON, C.; GUIGNARD, G.; SCHILTER, B. Coffee diterpenes prevent benzo[a]pyrene genotoxicity in rat and human culture systems. **Biochemistry Biophysic Research**, v. 306, p. 488-495, 2003.

CAVIN, C.; HOLZHAUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W. W.; SCHILTER, B. Cafestol and Kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1155-1163, 2002.

CAVIN, C.; MACE, K.; OFFORD, E. A.; SCHILTER, B. Protective effects of coffee diterpenes against aflatoxin B1-induced genotoxicity: mechanisms in rat and human cells. **Food Chemical Toxicology**, v. 39, p. 549-556, 2001.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Dietetic

antioxidants: controversies and perspectives. **Química Nova**, – São Paulo, – v. 30, – n. 2, p. 441-449, mar./abr. 2007.-

CHEN, A. S.; TAGUCHI, T.; SAKAI, K.; MATAHIRA, Y.; WANG, M. W.; MIWA, I. Effect of chitobiose and chitotriose on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in rats. **Biology Pharmacology Bulletin**, v. 28, p. 1971-1973, 2005.

CHEN, C.; KONG, A. N. T. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. **Free Radic. Biology Medical**, v. 36, p. 1505-1516, 2004.

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

CLARKE, J. **Encyclopedia of food and nutrition**. London: Elsevier Applied Science, 2003. v. 3.

CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee: chemistry**. London: Elsevier Applied Science, 1985. 116 p.

CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee: chemistry**. 2. ed. New York: Elsevier, 1989. 305 p.

CLIFFORD, M. N. The composition of green and roasted coffee beans. **Process Biochemistry**, v. 10, p. 20-29, 1975.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee**. London: Elsevier Applied Science, 1985. v. 1, p. 153-202.

COLORPRO. **Color metric converter**. Disponível em: <<http://www.colorpro.com/info/tools/convert.htm>>. Acesso em: 10 maio 2007.

CORRAO, G.; ZAMBON, A.; BAGNARDI, V.; AMICIS, A. d'; KLATSKY, A. Coffee, caffeine, and risk of liver cirrhosis. **Annual Epidemiology**, v. 11, n. 7, p. 458-465, 2001.

DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; GREGOTTI, C.; BERTÈ, F.; GAZZANI, G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 48, p. 1449-1454, 2000.

DAM, R. M. van. Coffee and type 2 diabetes: from beans to beta-cells.

**Nutrition Metabolism Cardiovascular Disease**, v. 16, p. 69-77, 2006.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 11, p. 396-407, 1997.

DEL CASTILLO, M. D.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3698-3703, 2002.

DEVASAGAYAM, T. P. A.; KAMAT, J. P.; MOHAN, H.; KESAVAN, P. C. Caffeine as an antioxidant: Inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimical Biophysical Acta**, v. 1282, p. 63-70, 1996.

DLUGOSZ, L.; BELANGER, K.; HOLFORD, T. R.; LEADERER, B.; BRACKEN, M. B. Maternal caffeine consumption and spontaneous abortion: a prospective cohort study. **Epidemiology**, v. 7, p. 250-255, 1996.

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

DURRANT, K. L. Known and hidden sources of caffeine in drug, food, and natural products. **Journal American Pharmacology**, v. 42, p. 625-637, 2002.

ENCARNAÇÃO, R. O.; LIMA, D. R. **Café e saúde humana**. Brasília, DF: Embrapa Café, 2003. 64 p.

ESKENAZI, B.; STAPLETON, A. L.; KHARRAZI, M.; CHEE, W. Y. Associations between maternal decaffeinated and caffeinated coffee consumption and fetal growth and gestational duration. **Epidemiology**, v. 10, p. 242-249, 1999.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FOLCH, J.; FESS, M.; SLOANNE STANLEY, G. H. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FORTIER, I.; MARCOUX, S.; BEAULAC-BAILLARGEON, L. Relation of

caffeine intake during pregnancy to intrauterine growth retardation and preterm birth. **American Journal Epidemiology**, v. 137, p. 931-940, 1993.

FUJIOKA, K.; SHIBAMOTO, T. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. **Food Chemistry**, v. 106, p. 217-221, 2008.

FUSTER, M. D.; MITCHELL, A. E.; OCHI, H.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 48, p. 5600-5603, 2000.

GARDÈS-ALBERT, M.; JORE, D.; FERRADINI, C. Membrane lipid peroxidation: pulse and g-radiolysis in oxyradical research. In: VIGO-PELFREY, C. (Ed.). **Membrane lipid oxidation**. Santa Clara: CRC, 1991. p. 2-30.

GELATTI, U.; COVOLO, L.; FRANCESCHINI, M.; PIRALI, F.; TAGGER, A.; RIBERO, M. L.; TREVISI, P.; MARTELLI, C.; NARDI, G.; DONATO, F. Coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: a case-control study. **Journal Hepatology**, v. 42, p. 528-534, 2005.

GEORGE, K. C.; HEBBAR, S. A.; KALE, S. P.; KESAVAN, P. C. Caffeine protects mice against whole-body lethal dose of  $\gamma$ -irradiation. **Journal of Radiology Protection**, v. 19, n. 2, p. 171-176, 1999.

GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

GROSS, G.; JACCAUD, E.; HUGGETT, A. C. Analysis of the content of the diterpenes cafestol and kahweol in coffee brews. **Food Chemical Toxicology**, v. 35, p. 547-554, 1997.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLINGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 5. ed. Oxford: Clarendon, 1999.

HALSTED, C. H. Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin?

**America Journal Clinical Nutrition**, v. 77, n. 4, p. 1001S-1007S, 2003.  
Supplement .

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Anthocyanins and other flavonoids.  
**Nat. Prod. Rep.**, v. 18, p. 310-333, 2001.

HE, P.; NODA, Y.; SUGIYAMA, K. Suppression of lipopolysaccharideinduced liver injury by various types of tea and coffee in Dgalactosamine-sensitized rats.  
**Bioscience Biotechnology Biochemical**, v. 65, p. 670-673, 2001.

HELLER J. What do we know about the risks of caffeine consumption in pregnancy? **Brazilian Journal Addictives**, v. 82, p. 885-889, 1987.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin. Hematology**, v. 26, p. 277-285, 1989.

HILL, P. G. The measurement of albumin in serum and plasma. **Annual Clinical Biochemistry**, v. 22, p. 565-578, 1985.

HODGSON, E.; ROSE, R. L. The importance of cytochrome P450 2B6 in the human metabolism of environmental chemicals. **Pharmacology Therapy**, v. 113, p. 420-428, 2007.

HUBER, W. W.; MCDANIEL, L. P.; KADERLIK, K. R.; TEITEL, C. H.; LANG, N. P.; KADLUBAR, F. F. Chemoprotection against the formation of colon DNA adducts from the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-*b*)pyridine (PhIP) in the rat. **Mutat. Research**, v. 376, p. 115-122, 1997.

HUBER, W. W.; PRUSTOMERSKY, S.; DELBANCO, E.; UHL, M.; SCHARF, G.; TURESKY, R. J.; THIER, R.; SCHULTE-HERMANN, R. Enhancement of the chemoprotective enzymes glucuronosyl transferase and glutathione transferase in specific organs of the rat by the coffee components kahweol and cafestol. **Archive Toxicology**, v. 76, p. 209-217, 2002a.

HUBER, W. W.; SCHARF, G.; NAGEL, G.; PRUSTOMERSKY, S.; SCHULTEHERMANN, R.; KAINA, B. Coffee and its chemopreventive components kahweol and cafestol increase the activity of *O*6-methylguanine-DNA methyltransferase in rat liver: comparison with phase II xenobiotic metabolism. **Mutat. Research**, v. 522, p. 57-68, 2003.

HUBER, W. W.; SCHARF, G.; ROSSMANITH, W.; PRUSTOMERSKY, S.; GRASLKRAUPP, B.; PETER, B.; TURESKY, R. J.; SCHULTE-HERMANN, R. The coffee components kahweol and cafestol induce c-glutamylcysteine synthetase, the rate limiting enzyme of chemoprotective glutathione synthesis, in several organs of the rat. **Archive Toxicology**, v. 75, p. 685-694, 2002b.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Coffee trade statistics**. Disponível em: <<http://www.ico.org/>>. Acesso em: 15 jul. 2007.

JIMENEZ, W.; CLÀRIA, J.; ARROYO, V.; RODÉS, J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis in chronic liver disease. **Journal Gastroenterol Hepatology**, v. 7, p. 90-97, 1992.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 482 p.

KASAI, H.; FUKADA, S.; YAMAIZUMI, Z.; SUGIE, S.; MORI, H. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation *in vitro* and in a rat carcinogenesis model. **Food Chemical Toxicology**, v. 38, p. 467-471, 2000.

KATZ, S. N. Decaffeination of coffee. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee: technology**. London: Elsevier, 1987. v. 2, chap. 3.

KATZ, S. N. Decaffeination of coffee. In: COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LA CHIMIE DES CAFÉS VERTS, TORRÉFIÉS ET LEURS DÉRIVÉS, 9., 1980, London. **Proceedins...** Paris: Association Scientifique Internationale du Café, 1980. p. 295-302.

KIHLMAN, B. A. Second international caffeine workshop report on mutagenicity. **Nutrition Review**, v. 38, p. 196-200, 1980.

KLATSKY, A. L.; ARMSTRONG, M. A.; FREEDMAN, G. D. Coffee, tea and mortality. **Annual Epidemial.**, v. 3, p. 375, 1993.

KLOVER, P. J.; MOONEY, R. A. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. **International Journal Biochemistry Cell Biology**, v. 36, p. 753-758, 2004.

KOTEISH, A.; DIEHL, A. M. Animal models of steatosis. **Semin. Liver Dis.**, v. 21, p. 89-104, 2001.

KY, C. L.; LOUARN, J.; DUSSERT, S.; GUYOT, B.; HAMON, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acid and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry**, Oxford, v. 75, n. 2, p. 223-230, 2001.

LACK, E.; SEIDLITZ, A. Extractions of natural products using near-critical solvents. In: KING, M. B.; BOTT, T. R. (Ed.). **Extraction optimization in food engineering**. Glasgow: Blackie, 1993. p. 101-139.

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

LEE, K. J.; WOO, E. R.; CHOI, C. Y.; SHIN, D. W.; LEE, D. G.; YOU, H. J.; JEONG, H. G. Protective effect of acteoside on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. **Life Science**, v. 74, p. 1051-1064, 2004.

LICCIARDI, R.; PEREIRA, R. G. F. A.; MENDONÇA, L. M. V. L. Levels of aqueous extract, 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.; BARBOSA, V. C.; SANTOS FILHO, P. R.; GOUVÊA, C. M. C. P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 531-536, 2006.

LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Poliphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complex ferrous ions. **Biochimica Biophysica Acta: General Subjects**, v. 1472, p. 142-147, 1999.

LÓPEZ-GALILEA, I.; ANDUEZA, S.; DI LEONARDO, I.; PEÑA, M. P.; CID, C. Influence of torrefacto roast on antioxidant and pro-oxidant activity of coffee. **Food Chemistry**, v. 94, p. 75, 2006.

MACRAE, R. Nitrogenous components. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee: chemistry**. London: Elsevier Applied Science, 1989. v. 1, p. 115-152.

MATIELLO, J. B. **A cafeicultura no Brasil**: diversidade é principal característica. 2004. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=6&ID=34>>. Acesso em: 20

jul. 2007.

MATTILA, P.; KUMPULAINEN, J. Determination of free and total phenolic acids. **Journal Agricultural Food Chemical**, v. 50, p. 3660, 2002.

MAZZAFERA, P.; CARVALHO, A. A cafeína do café. **Documentos IAC**, v. 25, p. 1-22, 1991.

MCKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. The role of tea in human health: an update. **Journal American Coll. Nutrition**, v. 21, p. 1, 2002.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v. 218, p. 273-275, 1983.

MENDES, L. C. **Otimização do processo de torrefação do café robusta (Coffea canephora conillon) para formulação de blends com café arábica (Coffea arabica)**. 1999. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

MENDILAHARSU, M.; STEFANI, E. de; DENEOPELLEGRINI, H.; CARZOGLIO, J. C.; RONCO, A. Consumption of tea and coffee and the risk of lung cancer in cigarette-smoking men: a case control study in Uruguay. **Lung Cancer**, v. 19, p. 101-107, 1998.

MENDONÇA, L. M. V. L.; PEREIRA, R. G. F. A.; MENDES, A. N. G. Bromatological parameters in raw and toasted grains of cultivars of coffee (Coffea arabica L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 239-243, 2005.-

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phyt Research**, v. 15, p. 27-30, 2001.

MICHELS, K. B.; HOLMBERG, L.; BERGKVIST, L.; WOLK, A. Coffee, tea, and caffeine consumption and breast cancer incidence in a cohort of Swedish women. **Annual Epidemiology**, v. 12, p. 21-26, 2002.

MONTAGNON, C.; GUYOT, B.; CILAS, C.; LEROY, T. Genetic parameters of several biochemical compounds from green coffee, Coffea canephora. **Plant Breeding**, Berlin, v. 117, p. 576-578, 1998.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 637-641, 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, 2001. p. 1511-1517.

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, p. 209, 1999.

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; MARIA, C. A. B. de. Componentes voláteis do café torrado: parte II: compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 195, 2000.

NAIDU, M. M.; SULOCHANAMMA, G.; SAMPATHU, S. R.; SRINIVAS, P. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 377-384, 2007.

NATELLA, F.; NARDINI, M.; GIANNETTI, I.; DATTILO, C.; SCACCINI, C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 50, p. 6211-6216, 2002.

NEHLIG, A. Are we dependent upon coffee and caffeine?: a review on human and animal data. **Neuroscience Biobehaviorism Review**, v. 23, p. 563-576, 1999.

NEPKA, C.; SIVRIDIS, E.; ANTONOGLU, O.; KORTSARIS, A.; GEORGELLIS, A.; TAITZOGLU, I.; HYTIROGLOU, P.; PAPADIMITRIOU, C.; ZINTZARAS, I.; KOURETAS, D. Chemopreventive activity of very low dose dietary tannic acid administration in hepatoma bearing C3H male mice. **Cancer Letters**, v. 141, p. 57-62, 1999.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; MANZOCCO, L.; LERICE, C. R. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. **Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie**, London, v. 30, n. 2, p. 292-297, 1997.

NICOLUZZI, J. E.; BARBU, V.; BAUDRIMONT, M. Viabilité et état de différenciation des hépatocytes humains immunoprotégés par macroencapsulation et transplantés chez le rat. **Gastroenterol Clin Biology**, v. 24, n. 3, p. 342-348, 2000.

NOGUEIRA, M.; TRUGO, L. C. Chlorogenic ACID isomers, caffeine and trigonellin contents in Brazilian instant coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 296-299, 2003.

NURMINEN, M. L.; NIITTYNEN, L.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. **European Journal Clinical Nutrition**, v. 53, p. 831-839, 1999.

OGITA, S.; UEFUJI, H.; YAMAGUCHI, Y.; KOIZUMI, N.; SANO, H. Producing decaffeinated coffee plants. **Nature**, London, v. 423, p. 823, 2003.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Human Nutrition and Metabolism. **Journal Nutrition**, v. 131, p. 66-71, 2001.

OZERCAN, I. H.; DAGLI, A.; USTUNDAG, B.; OZERCAN, M.; BAHCECIOGLU, I.; CELIK, H.; YALNIZ, M.; POYRAZOGLU, O.; ATASEVEN, H. Does instant coffee prevent acute liver injury induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)? **Hepatology Research**, Clare, v. 35, n. 3, p. 163-168, July 2006.

PATEL, J. M.; WOLFSON, A. B. **Processo de descafeinação em contracorrente semi-contínuo**. Patente U.S. 3.671.263, 1972.

PEKER, H.; SRINIVASAN, M. P.; SMITH, J. M.; MCCOY, J. B. Caffeine extraction rates from coffee beans with supercritical carbon dioxide. **AIChE Journal**, v. 38, n. 5, p. 761-770, 1992.

PERES, W.; TUÑION, M. J.; HERMANN, S.; MARRONI, N.; GALLEGO, J. G. The flavanoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. **Journal Hepatology**, v. 33, p. 742-750, 2000.

PERRONE, D.; DONANGELO, C. M.; FARAH, A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, p. 1030-1035, 2008.

RAMALAKSHMI, K.; RAGHAVAN, B. Caffeine in Coffee: Its Removal. Why and How? **Critical Review Food Science Nutrition**, v. 39, p. 441, 1999.

RIBEIRO, N. J.; OLIVEIRA, T. T. de; NAGEM, J. T.; PINTO, A. S. Avaliação dos parâmetros sanguíneos de hepatotoxicidade em coelhos normais

submetidos a tratamentos com antocianina e antocianina + naringenina. **RBAC**, v. 38, n. 1, p. 23-27, 2006.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; SCHOEN, F. J. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Liver Dis.**, v. 34, p. 105-110, 2002.

ROBERTSON, D.; HOLLISTER, A. S.; KINCAID, D.; WORKMAN, R. GOLDBERG, M. R.; TUNG, C. S.; SMITH, B. Caffeine and hypertension. **The American Journal of Medicine**, v. 77, n. 1, p. 54-60, 1984.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: VIGO-PELFREY, C. (Ed.). **Membrane lipid oxidation**. Boca Raton: CRC, 1991. p. 151-170.

SALDAÑA, M. D. A.; MAZZAFERA, P.; MOHAMED, R. S. Extração dos alcalóides: cafeína e trigonelina dos grãos de café com c supercrítico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 251-260, 1997.

SANTOS, M. H. dos; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. da S. Influence of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee (*Coffea arabica*). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

SHAN, X.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology Therapy**, v. 47, p. 61-71, 1990.

SHLONSKY, A. K.; KLATSKY, A. L.; ARMSTRONG, M. A. Traits of persons who drink decaffeinated coffee. **AEP**, v. 13, p. 273, 2003.

SILVA, A. M. da; COELHO, G.; SILVA, R. A. da. Irrigation timing and split application of fertilizer on productivity of the coffee plant in 4 harvests. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v. 9, n. 3, p. 314-319, 2005.

SILVA, D. G. K. C. E.; TEODORO, G. M.; SENA, L. V. de; SOUSA, Z. M. de; REZENDE, A. A. Perfil eletroforético de proteínas plasmáticas: estudo em crianças atendidas no hospital de pediatria Hosped/UFRN da cidade de Natal-RN. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 4, p. 239-242, 2005.

SIVETZ, M.; DEROSIER, N. W. **Coffee technology**. Westport: The AVI, 1979. 716 p.

SMITH, A. P.; KENDRICK, A. M.; MABEN, A. L. Effects of breakfast and caffeine on performance and mood in the late morning and after lunch. **Neuropsychobiology**, v. 26, p. 198, 1992.

SMITH, A. W. Introduction. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee: chemistry**. London: Elsevier, 1985. v. 1, p. 1-41.

STADLER, R. H.; TURESKY, R. J.; MULLER, O.; MARKOVIC, J.; LEONGMORGENTHALER, P. M. The inhibitory effects of coffee on radical-mediated oxidation and mutagenicity. **Mutation Research**, v. 308, n. 2, p. 177-190, 1994.

SUN, A. Y.; SIMONYI, A.; SUN, G. Y. The “French paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. **Free Radical Biology Med.**, v. 32, p. 314, 2002.

SUZUKI, A.; KAGAWA, D.; OCHIAI, R.; TOKIMITSU, I.; SAITO, I. Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. **Hypertens Research**, v. 25, n. 1, p. 99-107, 2002.

TANAKA, T.; KOJIMA, T.; KAWAMORI, T. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. **Carcinogenesis**, v. 14, p. 1321-1325, 1993.

TANAKA, K.; TOKUNAGA, S.; KONO, S.; TOKUDOME, S.; AKAMATSU, T.; MORIYAMA, T.; ZAKOUJI, H. Coffee consumption and decreased serum gamma-glutamyltransferase and aminotransferase activities among male alcohol drinkers. **International Journal Epidemiology**, v. 27, p. 438-443, 1998.

TANG, S. Z.; KERRY, J. P.; SHEEHAN, D.; BUCKLEY, D. J. Antioxidative mechanisms of tea catechins in chicken meat systems, **Food Chemistry**, v. 76, p. 45-51, 2002.

TAVANI, A.; BERTUZZI, M.; TALAMINI, R.; GALLUS, S.; PARPINEL, M.; FRANCESCHI, S.; LEVI, F.; LA VECCHIA, C. Coffee and tea intake and risk of oral, pharyngeal and esophageal cancer. **Oral Oncology**, v. 39, p. 695-700, 2003.

THELLE, D. S. Coffee, tea and coronary heart disease. **Current Opinion Lipidol.**, Washington, v. 6, n. 1, p. 25-27, 1995.

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, 2006.

TRUGO, L. C. Café: composição química e potencial nutracêutico. In: MERCADANTE, A. Z.; BOBBIO, F. O.; BOOBIO, P. A.; PEREIRA, J. L.; PASTORE, G. M. **Ciência de Alimentos**. Campinas: Unicamp, 2001. v. 2, p. 206-208.

TRUGO, L. C. Analysis of coffee products. In: TRUGO, L. C.; FINGLAS, P. M. (Ed.). **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. 2. ed. New York: Academic; Elsevier Science, 2003. v. 3, 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, DF: Embrapa, 2001. v. 1, p. 1511-1517.

TRUGO, L. C.; MOREIRA, R. F. A.; MARIA, C. A. B. de. Componentes voláteis do café torrado: parte I: compostos heterocíclicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 255-263, 1999.

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

UMEMOTO, A.; KOMAKI, K.; MONDEN, Y.; SUWA, M.; KANNO, Y.; KITAGAWA, M.; SUZUKI, M.; LIN, C. X.; UYAMA, Y.; MOMEN, M. A.; RAVINDERNATH, A.; SHIBUTANI, S. Identification and quantification of Tamoxifen-DNA adducts in the liver of rats and mice. **Chemical Research Toxicology**, v. 14, n. 8, p. 1006-1013, 2001.

VILAS-BOAS, B. M.; LICCIARDI, R.; MORAIS, A. R. de; CARVALHO, V. D. de. 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.

VITORINO, M. D.; FRANÇA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; BORGES, M. L. A. Metodologias de obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos

não voláteis. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 17-24, 2001.

VITZTHUM, O. G.; HUBERT, P. Fluid extraction of hops, spices, and tobacco with supercritical gases. **Agnew Chemical International Ed. England**, London, v. 17, p. 710-715, 1978.

WALDHAUSER, S. S. M.; BAUMANN, T. W. Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. **Phytochemistry**, v. 42, p. 985, 1996.

WINTERBOURN, C. C.; GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressures of O<sub>2</sub>. **Free Radical Biology & Medicine**, Oxford, v. 2, n. 11, p. 1119-1122, 1981.

WOISK, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apiculture Research**, v. 37, p. 99-105, 1998.

YAMADA, K. I.; YAMAMIYA, I.; UTSUMI, H. *In vivo* detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 2040-2046, 2006.

YANAGIMOTO, K.; OCHI, H.; LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activities of fractions obtained from brewed coffee. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 52, p. 592-596, 2004.

YEN, W. J.; CHANG, L. W.; DUH, P. D. Antioxidant activity of peanut seed test and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 193-200, 2005.

YIIN, S. J.; LIN, T. H.; SHIH, T. S. Lipid peroxidation in workers exposed to manganese. **Scandinavian Journal Work Environment Health**, v. 22, n. 5, p. 381-386, 1996.

YILDIRIM, A.; OKTAY, M.; BÜLALOĞLU, V. The antioxidant activity of the leaves of *Cydonia vulgaris*. **Turk. Journal Medical Science**, v. 31, p. 23-27, 2001.

## ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A	Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável sólidos solúveis totais.....86
TABELA 2A	Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável fenólicos totais.....86
TABELA 3A	Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável trigonelina.....86
TABELA 4A	Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável ácido clorogênico.....87
TABELA 5A	Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável cafeína.....87
TABELA 6A	Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável DPPH.....87
TABELA 7A	Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável poder redutor.....88
TABELA 8A	Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável atividade quelante de Fe <sup>2+</sup> .....88

TABELA 9A	Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável albumina.....88
TABELA 10A	Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável ALT.....89
TABELA 11A	Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável AST.....89
TABELA 12A	Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável lipídeos totais.....89
TABELA 13A	Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável MDA.....90
TABELA 14A	Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável proteínas totais.....90

TABELA 1A Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável sólidos solúveis totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Cafés	3	0.071875	0.023958	0.0850
Erro	12	0.102500	0.008542	
CV (%) = 4,07				

TABELA 2A Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável fenólicos totais.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Cafés	3	4.607613	1.535871	0.0000
Erro	20	0.102583	0.005129	
CV (%) = 1,49				

TABELA 3A Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável trigonelina

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Cafés	3	1.360300	0.453433	0.0000
Erro	8	0.009267	0.001158	
CV (%) = 3,77				

TABELA 4A Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável ácido clorogênico.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Cafés	3	40.181425	13.393808	0.0000
Erro	8	0.030867	0.003858	
CV (%) = 3,27				

TABELA 5A Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável cafeína.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Cafés	3	2.366727	0.788909	0.0000
Erro	8	0.003438	0.000430	
CV (%) = 4,34				

TABELA 6A Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável DPPH.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tipo de café	4	5906.429467	1476.607367	0.0000
Concentração	3	2108.685218	702.895073	0.0000
Tipo de café*conc.	12	1242.324973	103.527081	0.0000
Erro	40	26.158600	0.653965	0.0000
CV (%) = 1,3				

TABELA 7A Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável poder reductor.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Cafés	3	2783.201246	927.733749	0.0000
Erro	20	71.044350	3.552218	
CV (%) = 3,18				

TABELA 8A Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável atividade quelante de Fe<sup>2+</sup>.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Pr > Fc
Tipo de café	3	8845.849167	2948.616389	0.0000
Concentração	2	6344.550772	3172.275386	0.0000
Tipo de café*conc.	6	216.734783	36.122464	0.0000
Erro	24	87.874667	3.661444	0.0000
CV (%) = 5,69				

TABELA 9A Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável albumina

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Café (C)	1	0,02031	0,02031	1,85	0,1907
Tipo proc (T)	1	0,61231	0,61231	55,76	0,0000
C * T	1	0,01156	0,01156	1,05	0,3186
Adicional	2	4,29745	2,14873	195,66	0,0000
erro	18	0,19768	0,01098		
CV (%)	2,09				

TABELA 10A Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável ALT

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Café (C)	1	46,4442	46,4442	0,28	0,6020
Tipo proc (T)	1	2,20523	2,20523	0,01	0,9092
C * T	1	0,0225	0,0225	0,00	0,9908
Adicional	2	75002,1	37501,1	227,58	0,0000
erro	18	2966,13	164,785		
CV (%)	9,11				

TABELA 11A Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável AST

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Café (C)	1	357,777	357,777	1,90	0,1850
Tipo proc (T)	1	158,256	158,256	0,84	0,3715
C * T	1	95,16	95,16	0,51	0,4863
Adicional	2	101328	50664,1	268,98	0,0000
erro	18	3390,42	188,357		
CV (%)	5,75				

TABELA 12A Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável lipídeos totais

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Café (C)	1	0,2809	0,2809	0,88	0,3601
Tipo proc (T)	1	0,7056	0,7056	2,22	0,1540
C * T	1	0,7744	0,7744	2,43	0,1364
Adicional	2	49,1338	24,5669	77,12	0,0000
erro	18	5,73385	0,31855		
CV (%)	12,69				

TABELA 13A Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável MDA

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Café (C)	1	0,000025	0,000025	0,02	0,8783
Tipo proc (T)	1	0,013225	0,013225	12,76	0,0022
C * T	1	0,000225	0,000225	0,22	0,6468
Adicional	2	0,105808	0,052904	51,06	0,0000
erro	18	0,01865	0,0010361		
CV (%)	12,22				

TABELA 14A Resumo da análise de variância com os quadrados médios, significância e coeficientes de variação para a variável proteínas totais

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Café (C)	1	0,283556	0,283556	0,74	0,4014
Tipo proc (T)	1	4,295256	4,295256	11,19	0,0036
C * T	1	0,104006	0,104006	0,27	0,6091
Adicional	2	23,620553	11,810277	30,76	0,0000
erro	18	6,911225	0,3839569		
CV (%)	10,95				