

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**

**Instituto Biomédico**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular**

**COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
INFLUÊNCIA SOBRE LINHAGENS CELULARES HUMANAS DE  
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA**

**L'AURENT DOS SANTOS DE SOUZA**

**Orientador: Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro**

**Coorientador: Otniel Freitas Silva**

**RIO DE JANEIRO – RJ**

**2019**

L'AURENT DOS SANTOS DE SOUZA

**COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
INFLUÊNCIA SOBRE LINHAGENS CELULARES HUMANAS DE  
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Anderson Junger Teodoro

Coorientador: Otniel Freitas Silva

RIO DE JANEIRO – RJ

MARÇO/2019

## FICHA CATALOGRÁFICA

S237	Souza, L'aurent dos Santos de COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INFLUÊNCIA SOBRE LINHAGENS CELULARES HUMANAS DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA / L'aurent dos Santos de Souza. -- Rio de Janeiro, 2019. 80  Orientador: Anderson Junger Teodoro. Coorientador: Otniel Freitas Silva. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2019.  1. Café. 2. Bioativos. 3. próstata. 4. câncer. I. Teodoro, Anderson Junger, orient. II. Silva, Otniel Freitas, coorient. III. Título.
------	---



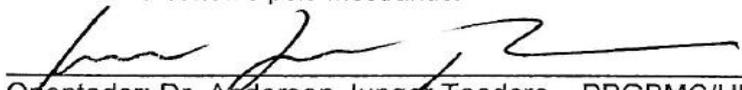
**PPGBMC**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR

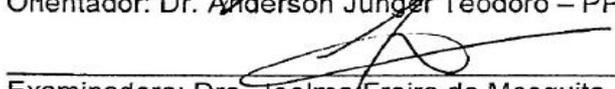


Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS  
Instituto Biomédico - IB

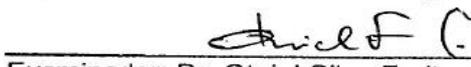
**Ata da 35ª Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular (PPGBMC) para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.**

Ao vigésimo primeiro dia do mês de março de dois mil e dezenove, às quinze horas, no Instituto de Biociências, foi aberta a Sessão de Defesa da Dissertação intitulada “COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E INFLUÊNCIA SOBRE AS LINHAGENS CELULARES HUMANAS DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA”, elaborada pelo Mestrando L’aurent dos Santos de Souza. A Dissertação foi orientada pelo Professor Doutor Anderson Junger Teodoro – PPGBMC/UNIRIO. A Banca Examinadora foi constituída pelos Titulares Professores Doutores: Joelma Freire de Mesquita – UNIRIO e Otniel Silva Freitas – EMBRAPA, sendo indicados como Suplentes os Professores Doutores Rafael Braga Gonçalves – UNIRIO e Leandro Miranda Alves – UFRJ. O discente teve quarenta minutos para a apresentação oral do trabalho. Após, a banca examinadora procedeu à arguição e conferiu a Aprovado com conceito A. Sem mais nada a tratar, eu, Anderson Junger Teodoro, Presidente da Banca, lavrei e assinei esta ata que vai assinada também pelos membros da banca e pelo Mestrando.

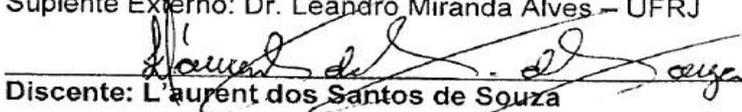
  
Orientador: Dr. Anderson Junger Teodoro – PPGBMC/UNIRIO

  
Examinadora: Dra. Joelma Freire de Mesquita – UNIRIO/PPGBMC

Suplente Interno: Dr. Rafael Braga Gonçalves – UNIRIO/PPGBMC

  
Examinador: Dr. Otniel Silva Freitas – UFRJ EMBRAPA

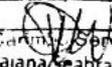
Suplente Externo: Dr. Leandro Miranda Alves – UFRJ

  
Discente: L’aurent dos Santos de Souza

UNIRIO  
IB

CONFERE COM O ORIGINAL

25/03/2019

  
Daiana Seabra Venancio  
Assistente em Administração  
UNIRIO - SIAPE 2412100

## DEDICATÓRIAS

Primeiramente a Deus por ter me dado o alicerce para minha pós-graduação.

As três grandes mulheres da minha vida, minha avó Alcicléia da Conceição (*In memorian*), minha mãe Cláudia Cristina e namorada Caroline Pereira.

Aos meus irmãos Thaynan dos Santos e Johann dos Santos.

A Professora Joelma Mesquita por toda a força do começo ao fim do Mestrado.

Ao meu grande Orientador, Anderson Junger Teodoro.

Ao meu incrível Coorientador, Otniel Freitas Silva.

Aos professores do fundamental até a pós-graduação, pela a sapiência e paciência.

Aos que de forma direta e indiretamente ajudaram na minha formação.

## AGRADECIMENTOS

Temos a audácia de pensar que somos detentores do conhecimento, porém Deus é o provedor do fator intelectual;

A minha avó (*In memoriam*), que formou o meu caráter e direcionou a minha visão acadêmica, a minha mãe, que batalha todos os dias para que seus filhos sejam homens de bem, e que o seu exemplo de conduta espelha sobre mim. A minha namorada, pela sua paciência e seu grande companheirismo, que nos fazem com alegria construir o nosso futuro;

A minha sogra Sirlene e meu sogro José, por me tratar como um filho;

A Professora Suely (*In memoriam*), que sempre acreditou no meu potencial;

Aos amigos de todas as horas, Maicol Santana, José Carlos, Alan dos Santos, Daniel Marcos, Isabela dos Santos, Ruan Lucas, Renan Freitas, Michel de Assis, Bem\_hur Long wu, Willian de Carvalho, Erli dos Santos, Roberto;

Aos amigos acadêmicos, Ritielle Bastos, Fernanda Rolemberg, Amanda Cambraia, Silvio, Ricceli Faneco, Vicenti Pires, Gabriel Rodrigues, Gabriela França, Marcos Vinícius, Laila Araújo;

Aos professores que tive o privilégio de conhecer durante toda a vida acadêmica;

Ao meu Orientador Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Anderson Teodoro, pelo o tema de pesquisa, incentivo e respeito;

Aos Professores Doutores da banca examinadora por terem aceitados a fazerem parte deste momento marcante e importante na minha vida;

Ao meu coorientador Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Otniel Freitas, que mostrou ser solícito e cooperou para a elaboração desse projeto;

Aos grandes amigos de laboratório pela paciência extrema e a grande ajuda, sou muito grato a todos, mas principalmente ao grande Mestre Joel, Nutricionista Nathália Jordão, Doutoranda Lana Rosa, Mestre Larissa, Doutoranda Débora Bauer e Graduanda Isabella Carrero;

Aos que me auxiliaram na empreitada, EMBRAPA: Todos da planta V e a grande equipe de futebol das terças e quintas;

À FAPERJ e UNIRIO que financiaram e possibilitaram a produção dessa dissertação;

A sociedade brasileira que é a maior investidora das pesquisas produzidas no país;

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Rafael Braga, pois no final da pesquisa salvou-me ao emprestar o laboratório;

## **EPÍGRAFE**

“O conhecimento é tudo aquilo externo ao indivíduo que pelo ato intelectual, torna-se interno”.

Autor desconhecido

## RESUMO

O câncer é uma doença crônica multifatorial entre as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) que se caracteriza pela divisão celular exacerbada. Diversos estudos relacionam os hábitos alimentares adequados ricos em compostos bioativos com a diminuição das DCNT. A bebida de café em seu termo genérico é uma infusão estimuladora que possuem em sua composição bioprotetores com potenciais terapêuticos para o controle e o tratamento de doenças crônicas não transmissíveis, principalmente o câncer. Contudo, o processo padrão de torrefação causa na matriz dos grãos profundas modificações em sua composição química que pode afetar diretamente em suas atividades antioxidantes e biomodulador que reflete no benéfico ao organismo humano. O Brasil é líder em produção e exportação dessa *commoditie*. Sendo assim, o presente estudo buscou alimentar a literatura científica a partir da produção padronizada de extratos de grãos verde e três gradientes de torras de café *Coffea arábica* (clara, média e escura) submetido á secagem por atomização em Spray-drier e analisar os efeitos desses extratos na incubação celular de adenocarcinoma de próstata com metástase em osso (PC-3) e cérebro (DU-145). Os extratos foram comparados aos seus efeitos na atividade antioxidante por quatro metodologias (DPPH, FRAP, ABTS e ORAC), quantificação dos principais compostos bioativos (ácidos clorogênicos, cafeína e ácidos cafeicos) por HPLC, ação antiproliferativa usando o ensaio de MTT, o seu efeito no ciclo celular e apoptose analisado por citometria de fluxo. Após a etapa de torrefação houve modulações significativas dos principais compostos bioativos, fenólicos totais e da atividade antioxidantes. Os resultados mostraram efeitos antiproliferativos, com modulação do ciclo celular e aumento da população celular na apoptose na linhagem de PC-3 após 24 horas de incubação tratadas com os extratos, sendo mais significativo os tratados com extratos solúveis de café arábica verde e torra branda (clara). Por outro lado, não foram verificados efeitos significativos na linhagem de DU-145 pela ação dos extratos. Sendo assim, os extratos solúveis de torras mais escuras promovem um efeito negativo nas atividades bioprotetoras dos grãos no café, refletindo em uma bebida com pouco ou nenhum efeito protetor, sendo esses dados essenciais na busca de novas estratégias para o combate e a prevenção seletiva do câncer.

Palavras-chave: café arábica; próstata; ácido clorogênico; ácido cafeico; cafeína.

## **ABSTRACT**

### **BIOACTIVE COMPOUNDS OF COFFEE: ANTIOXIDANT ACTIVITY AND INFLUENCE ON HUMAN CELLULAR LINES OF PROSTATE ADENOCARCINOMA**

Cancer is a chronic multifactorial disease among chronic noncommunicable diseases (CNCD) characterized by exacerbated cell division. Several studies have related adequate dietary habits rich in bioactive compounds with a decrease in NCD. Coffee in its generic term is a stimulatory infusion that has in its composition bioprotectors with therapeutic potentials for the control and treatment of chronic non-communicable diseases, mainly cancer. However, the standard process of roasting causes in the matrix of the deep grains modifications in its chemical composition that can directly affect in its activities antioxidant and biomodulator that reflects in the beneficial to the human organism. Brazil is the leading producer and exporter of this commodity. Thus, the present study sought to feed the scientific literature from the standardized production of green bean extracts and three types of *Coffea arabica* linnaeus coffee roasted, spray-dried in the Spray-drier apparatus and analyze the effects of these extracts on the cell adenocarcinoma of the prostate with metastasis in bone (PC-3) and brain (DU-145). The extracts were compared to their effects on antioxidant activity by four methodologies (DPPH, FRAP, ABTS and ORAC), quantification of the main bioactive compounds (chlorogenic acids, caffeine and caffeic acids) by HPLC, antiproliferative action using the MTT assay. effect on the cell cycle and apoptosis analyzed by cytometry. After the roasting phase there were significant modulations of the main bioactive compounds, total phenolic and antioxidant activity. The results showed antiproliferative effects, with cell cycle modulation and increase of the cell population in apoptosis in the PC-3 line after 24 hours of incubation treated with the extracts, being more significant those treated with soluble extracts of green Arabica coffee and soft roasted coffee ( clear). On the other hand, there were no significant effects on the DU-145 lineage due to the action of the extracts. Thus, the soluble extracts of darker grains promote a negative effect on the bioprotective activities of the beans in coffee, reflecting on a beverage with little or no protective effect, being these data essential in the search for new strategies for the combat and the selective prevention of cancer.

Key words: Arabica coffee; PC-3; DU-145; chlorogenic acid; caffeic acid; caffeine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Secção transversal da cereja de café. ....	18
Figura 2: Estrutura química da cafeína. ....	24
Figura 3: Estrutura química da Trigonelina. ....	25
Figura 4: Formulas estrutural de diterpenos ....	26
Figura 5: Compostos naturais do café visando as características de células tumorais e resumo dos efeitos anticancerígenos de algumas moléculas presentes no café. ....	35
Figura 6: Grão e extratos em pó de café arábica verde, torrados, e temperatura segundo cada tipo de torra.. ....	37
Figura 7: Equipamentos utilizados para a obtenção dos pós de café verde e torras. ....	38
Figura 8: Equipamentos utilizados para obtenção de extratos de qualidade.. ....	39
Figura 9: Fluxograma de produção da torra, processo de obtenção do pó de café bruto, extração aquosa e secagem por atomização. ....	40
Figura 10: Representação espacial de cores na escola de cores CIELAB. ....	41
Figura 11: Teores de cafeína, ácido cafeico e ácido clorogenicos. ....	51
Figura 12: Teor de compostos fenólicos totais nos extratos solúvis de café arábica. ....	52
Figura 13: Potencial de atividade antioxidante dos extratos de café solúvel arábica verde e torra clara, média e escura de acordo com quatro metodologias (DPPH, ABTS, FRAP e ORAC). ....	54
Figura 14: Resultados do percentual de inibição relativo ao controle de células tumorais de próstata (PC-3). ....	55
Figura 15: Efeito das concentrações de 5.000 e 10.000µg/mL de extratos de café arábica verde e torras na morte celular programada (Apoptose) na linhagem celular de adenocarcinoma de prostata com metástase em osso (PC-3).. ....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produtos secundários do fruto de café de interesse das indústrias. ....	19
Tabela 2: Minerais, aminoácidos, lipídeos, açúcares e vitaminas presentes no café.. ....	20
Tabela 3: Composição química de grãos de café verde e torrado das principais variedades comercializadas (g/100g de base seca).....	21
Tabela 4: Teor de ácidos clorogênicos e grãos de café verde, expresso em g% da matéria seca. ....	23
Tabela 5: Parâmetros farmacocinéticos de CGA's e metabólitos em circulação no plasma de voluntários saudáveis, 0-24 horas após a ingestão de 412 µmol de CGA's e derivados contidos em uma porção de 200 ml café instantâneo.....	28
Tabela 6: Rendimento dos solutos dos sobrenadantes pelo Refratômetro digital PAL-Alpha. ....	49
Tabela 7: Coordenadas de cor (L*a*b*) dos extratos secos de café robusta .....	50
Tabela 8: Efeitos dos extratos solúveis de café arábico verde e torras nas concentrações 5.000 e 10.000µg/mL no ciclo celular de células tumorais de próstata com metástase em osso (PC-3). ....	57

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AAPH</b>	Iniciador radical azo (2,2'-azinobis(2-amidinopropano) dihidroclorato).
<b>ABTS</b>	Radical ácido (2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico)
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AUC</b>	Área em baixo da curva
<b>CGA</b>	Ácidos clorogênicos
<b>CV</b>	Extrato solúvel de café arábica verde, seco por atomização
<b>CIELAB</b>	Coordenadas de cores do Hunter Lab
<b>DCNT</b>	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPPH</b>	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<b>DU-145</b>	Linhagem tumoral maligna de próstata humana com metástase no cérebro
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ET</b>	Equivalente de trolox
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, fluorescein isothiocyanate)
<b>FRAP</b>	Capacidade ferri-redutora
<b>MTT</b>	(brometo de 3-[4,5dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio)
<b>NCI</b>	Nacional Cancer Institute
<b>ORAC</b>	Capacidade de absorção de radical de oxigênio
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada (do inglês, phosphate buffered saline)
<b>PC-3</b>	Linhagem tumoral maligna de próstata humana com metástase no osso
<b>PH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>PI</b>	Iodeto de Propídio (do inglês, Propidium iodide)
<b>PS</b>	Penicilina e estreptomicina
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>RPMI</b>	meio de cultura de células (do inglês, Roswell Park Memorial Institute medium)
<b>TC</b>	Extratos solúvel de café arábica torra clara, seco por atomização
<b>TM</b>	Extratos solúvel de café arábica torra médio, seco por atomização
<b>TE</b>	Extratos solúvel de café arábica torra escuro, seco por atomização
<b>TEAC</b>	Capacidade antioxidante equivalente de trolox
<b>TPTZ</b>	Reagente 2,3,5-cloreto trifêniltetrazolium

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	16
2	Revisão de literatura.....	18
2.1	Café.....	18
2.2	Compostos bioativos do café.....	21
2.2.1	Cafeína.....	24
2.2.2	Trigonelina.....	24
2.2.3	Diterpenos.....	25
2.2.4	Ácidos clorogênicos.....	26
2.3	Processamento dos grãos de café.....	28
2.3.1	Produção de extratos de café solúvel.....	30
2.4	Consumo do café.....	31
2.5	Café e câncer.....	32
3	Objetivos.....	36
3.1	Objetivo geral.....	36
3.2	Objetivo específico.....	36
4	Materiais e métodos.....	37
4.1	Matéria bruta e produção dos extratos.....	37
4.2	Caracterização físico-química dos Extratos.....	41
4.2.1	Quantificação de sólidos totais e sólidos solúveis dos extratos aquosos de café.....	41
4.2.2	Coordenadas colorimétricas dos extratos secos de café arábica.....	41
4.2.3	Caracterização dos extratos secos por HPLC.....	41
4.2.3.1	Determinação de cafeína.....	41
4.2.3.2	Determinação de ácidos clorogênicos.....	42
4.2.3.3	Determinação de afeico.....	43
4.2.4	Determinação de compostos fenólicos totais.....	43
4.3	Determinação da atividade antioxidante.....	44
4.3.1	Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH.....	44
4.3.2	Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical ANTS <sup>+</sup> .....	44
4.3.3	Análise da determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP).....	45

4.3.4	Ensaio de atividade antioxidante pelo método de ORAC.....	45
4.4	Atividade <i>In Vitro</i> dos extratos de café arábica .....	44
4.4.1	Cultura de células e protocolo de tratamento .....	46
4.4.2	Avaliação da proliferação celular pelo método de MTT.....	47
4.4.3	Avaliação da influência dos extratos no ciclo celular .....	47
4.4.4	Avaliação da influência dos extratos na morte celular .....	47
4.5	Análises estatísticas .....	48
5	Resultados.....	49
5.1	Etapas de produção e extração dos extratos solúveis de café .....	49
5.2	Análises físico-químicas.....	49
5.2.1	Colorimetria dos extratos solúveis atomizados .....	49
5.2.2	Identificação e quantificação dos principais compostos bioativos nos extratos solúveis de café arábica verde e torras.....	50
5.2.2.1	Quantificação da cafeína por HPLC.....	50
5.2.2.2	Quantificação de ácido cafeio por HPLC.....	50
5.2.2.3	Quantificação de ácidos clorogênicos por HPLC.....	51
5.2.3	Teor de compostos fenólicos totais nos extratos secos de café. ....	51
5.3	Atividade antioxidante dos extratos de café arábico verde e torras.....	52
5.4	Efeitos dos extratos solúveis de café arábica verde e torras em linhagens de câncer de próstata .....	54
5.4.1	Efeito dos extratos secos de café na viabilidade de PC-3 e DU145.....	54
5.4.2	Efeito dos extratos de café verde e torras no ciclo celular de PC-3 .....	56
5.4.3	Efeito dos extratos de café verde e torras na apoptose de PC-3 .....	57
6	Discussão .....	60
7	Conclusão .....	70
8	Referências bibliográficas .....	72

## 1. Introdução.

O café além de ser uma das bebidas estimuladoras mais consumidas no mundo possuem ações bioativas importantes no qual vem sendo exploradas cada vez mais. O Brasil é líder na produção e exportação de café a nível mundial, contendo dez estados produtores, concentrando em Minas Gerais a maior produção do país seguido de Espírito Santo, já o Rio de Janeiro encontrasse em sétimo lugar. Os países que mais consomem o nosso café são liderados pelos Estados Unidos, seguidos de países como Alemanha, Itália, Japão e Bélgica (FERREIRA; SANTOS; AIACHE, 2017; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2018).

O café pertence à família Rubiaceae, gênero *Coffea*, apresentando mais de 100 tipos de espécies e subespécies, entre as 25 espécies comercializadas o Brasil é um dos poucos que produzem as principais espécies, *C. arabica* (ARÀBICA) e *C. canephora* (ROBUSTA), as razões fundamentais pelo seu alto consumo estão presentes na sua palatabilidade e acessibilidade econômica. O café arábica apresenta 70% das exportações mundiais e suas características sensoriais possui um sabor apetecível maior em comparação a do robusto (MARCELO; BEZERRA; HARTMANN, 2019), todavia, o robusto oferece um café com maiores teores de compostos bioativos como a título de exemplo os ácidos clorogênicos, ácido cafeico, cafeína entre outros (HECMOVIC 2011; DIAS; BENASSI, 2015; EMBRAPA, 2004; FARAH; DONANGELO, 2006).

Uma alimentação rica em produtos vegetais sempre esteve associada a uma vida mais saudável, com isso, diversos estudos sobre as funcionalidades dos vegetais no organismo estão abrangendo o conhecimento sobre os compostos bioativos que também recebem diversos nomes como fitoquímicos, nutracêutico e compostos bioprotetores (TORTORA; DERRICKSON, 2012), Segundo OLIVEIRA & BASTOS (2011) a ingestão insuficiente de compostos bioativos vem apresentando uma associação direta com as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), das quais estão fortemente presentes em países industrializados cujas dietas baseiam-se em alimentos industrializados (PASA et al., 2016; WHO, 2013, 2017).

No Brasil as DCNT são as principais causas de mortes nos adultos e idosos e estão correlacionados a fatores preponderantes como a pré-disposição genética e de fatores externos como o estilo de vida. Os hábitos alimentares podem orquestrar o silenciamento ou a superexpressão de genes ligados com algumas DCNT, entre elas, as doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, distúrbios cerebrais,

diabetes tipo II, além dos danos teciduais e moleculares como o próprio DNA que efetivamente podem causar o câncer (PASA et al., 2016). No padrão de consumo alimentar dos brasileiros há uma preferência por alimentos com altas densidades calóricas e baixo conteúdo nutricional, assim, uma boa estratégia de saúde pública seria investir mais em alimentos de qualidade e fortalecer o consumo de alimentos ricos em compostos bioativos já inseridos em nossa cultura, como exemplo o café (ARRUDA et al., 2009; IBGE, 2011; VEGRO; PINO; ASSUMPCÃO, 2006).

O café arábica é uma importante *commodity* e conquistou espaços no campo, na mesa e grandes espaços na literatura científica. Logo, o presente trabalho buscou estudar o efeito do processamento do café por spray dryer na extração e liberação de compostos bioativos em diferentes gradientes de torra do café arábica, também foi analisada as atividades sequestrante de radical (antioxidante) e efeitos bioprotetores dos extratos solúveis de café em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata com metástase em osso (PC-3) e cérebro (DU-145). E assim identificar o melhor tipo de extração.

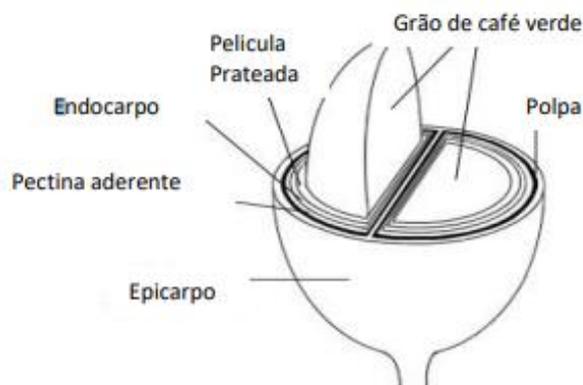
## **2. Revisão de literatura.**

## 2.1. Café.

Os frutos do café são formados pelo exocarpo ou epicarpo (pele/casca), mesocarpo (polpa/mucilagem), endocarpo (pergaminho), película prateada (epiderme do grão) e o endosperma (grão) a qual é a matéria bruta principal para o preparo da infusão de café (Figura 1).

A infusão do café nasceu no continente africano e a sua história é banhada por diversas lendas, entre elas, a mais contada relata sobre o pastor Kaldi que ao observar que entre as suas cabras as que comiam um fruto do cafeeiro ficavam mais alegres, percebendo que não era tóxica o fruto, o comeu e assim sentiu-se mais vívido, fez do fruto uma infusão e as tomava em suas orações para não ser dominado pelo sono. Os árabes dominaram de forma rápida as técnicas de plantio e preparação do café, a infusão recebia o nome de “Kahwah ou Cahue” que significa força. O processo de torrefação foi desenvolvido no século XIV e as primeiras sementes vieram para o Brasil no início do século XVIII, trazidas pelo português Sargento-Mor Francisco de Mello Palheta. Ao término do século XIX o Brasil comandava o mercado cafeeiro mundial (MARTINS, 2008).

Atualmente o Brasil é o maior produtor, exportador e o segundo maior consumidor a nível mundial de café (SILVA et al., 2010). Na agropecuária nacional o café encontra-se no 5º lugar do pódio com uma renda per capita de 3,7 Bilhões de dólares (70% somente o arábica), ficando atrás de outros produtos como o complexo de soja em 1º com 23,5 Bilhões, Carnes em 2º com 10,7 Bilhões, Cana de açúcar em 3º com 8,7 Bilhões e produtos florestais em 4º com 7,6 Bilhões (EMBRAPA, 2016).



**Figura 1:** Secção transversal da cereja de café

Entre as espécies do gênero *Coffea* o *arabica* é o mais importante, pois é considerada pela gastronomia uma bebida de qualidade superior, de sabor adocicado, aroma marcante e corresponde por cerca de 70% do café comercializado mundialmente, é oriundo das colinas da Etiópia (antiga Abissínia) e atualmente é cultivada em diversos lugares dos continentes americano, África e Ásia (EMBRAPA, 2004). Segundo CAIXETA et al (2015) o café arábica é a única espécie tetraploide (44 cromossomos). E seus subprodutos como a casca, polpa, película prateada (pergaminho) e borra, podem ser utilizados para diversas funções pelas industriais (Tabela 1) (ROMERO, 2017).

**Tabela 1:** Produtos secundários do fruto de café de interesse das indústrias

Subprodutos	Uso	Referências
	Fertilizante de solo;	(CRUZ et al., 2015)
<b>Borra de café</b>	Extração dos óleos para produção de combustível líquido;	(PHIMSEN et al., 2016)
	Bebidas alcoólicas	(SAMPAIO et al., 2013)
	Adsorventes catiônicos em tratamentos de águas residuais	(FRANCA; OLIVEIRA; FERREIRA, 2009)
<b>Polpa</b>	Formação de ácido láctico fermentado;	(PLEISSNER et al., 2016)
	Produção de Bioetanol.	(YADIRA et al., 2014)
<b>Película prateada</b>	Extratos para melhora de secreção de insulina;	(FERNANDEZ-GOMEZ et al., 2016)
	Produção de pão	(POURFARZAD; MAHDAVIAN-MEHR; SEDAGHAT, 2013)
<b>Casca</b>	Biopesticida para mosquito	(POOPATHI; MANI; AEGYPTI, 2015)

Adaptado de ROMERO (2017)

A qualidade da infusão da bebida de café é dependente dos compostos químicos na matriz dos seus grãos, os quais sofrem modulações de concentrações por diversas interferências, entre elas: regiões de plantações, estações de colheitas, fatores genéticos e ambientais, despulpamento, manejo da lavoura, colheita, preparo, estocagem dos grãos, transporte, armazenamento, moagem, principalmente os graus de torrefação, percentuais na formação dos *blends* e tipos de extratores nas infusões (COUTO, 2017;

PIMENTA, 2001; RAMALAKSHMI; RAGHAVAN, 1999; ROTHFOS, 1980; SCHOLZ et al., 2011). Segundo DURÁN et al., (2017) o grão de café cru (café verde) possui em sua composição além de seus compostos bioativos, diversos minerais, aminoácidos lipídeos, açúcares, e vitaminas (Tabela 2).

**Tabela 2:** Minerais, aminoácidos, lipídeos, açúcares e vitaminas presentes no café.

<b>Minerais</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>Lipídeos</b>	<b>Açúcares</b>	<b>Vitaminas</b>
Potássio	Alanina	triglicerídeos	Sacrose	Niacina
Magnésio	Arginina	ácidos graxos livres	Glicose	
Cálcio	Asparagina		Frutose	
Ferro	Cisteína		Arabinose	
Manganês	Ácido glutâmico		Galactose	
Rubídio	Glicina		Manose	
Cobre	Histidina		Polissacarídeos	
Estrôncio	Isoleucina			
Cromo	Lisina			
Vanádio	Metionina			
Níquel	Fenilalanina			
Cobalto	Prolina			
Sódio	Serina			
Bário	Teronina			
Chumbo	Tirosina			
Molibdênio	Valina			
Titânio				
Cádmio				
Zinco				

Fonte: Adaptado de DURÁN et al., (2017)

Entre os bioativos presentes no café, os ácido clorogênicos (CGA) são os mais importantes antioxidantes e estão em maior quantidade na proporção de até 14% de seu peso seco, na matriz do café outros nutracêuticos importantes como a cafeína e a trigonelina, ácido cafeico estão envolvidos nas atividades benéficas ao organismo com

ações preponderantes de atividade antioxidante (FARAH; DONANGELO, 2006). Segundo NOGUEIRA; TRUGO (2003) os principais compostos bioativos são facilmente solubilizados em água quente (90-95°C), entretanto, as etapas de pré e pós-colheita até o momento da infusão deve seguir etapas padronizadas e com alta controle de qualidade, pois são nessas etapas que ocorrem degradações de nutrientes como os carboidratos, e compostos bioprotetores (Tabela 3).

**Tabela 3:** Composição química de grãos de café verde e torrado das principais variedades comercializadas (g/100g de base seca).

	<b>Café Arábica</b>	
	Verde	Torrado
<b>Minerais</b>	3,0-4,2	3,0-4,5
<b>Carboidratos</b>	56,0-63,0	24,0-42,5
<b>Proteínas</b>	1,0-13,0	13,0-15,0
<b>Lipídeos</b>	12,0-18,0	14,5-20,0
<b>CQAs</b>	5,5-14	1,2-2,3
<b>Cafeína</b>	0,9-1,2	1,0
<b>Trigonelina</b>	1,0-1,2	0,5-1,0
<b>Aminoácidos</b>	2,0	0
<b>Proteínas</b>	11,0-13,0	13,0-15,0

Fonte: Adaptado de CLARKE & MACRAE(1987) e SMITH (1985).

## 2.2. Compostos bioativos do café.

Os benefícios contidos na bebida de café estão restritamente em simbiose com os conteúdos e as proporções dos compostos químicos dos grãos de café. Como já mencionado, os grãos de café verde são ricos em compostos bioativos, destacando-se os ácidos clorogênicos, a cafeína, trigonelinas, diterpenos e os tocoferóis. Segundo JOËT et al., (2010), o perfil desses compostos é principalmente influenciado por aspectos internos de origem genética, e externos como o grau de maturação e seus processamentos (DE OLIVEIRA et al., 2014; DURÁN et al., 2017). Grãos de café arábica utilizados de regiões distintas apresentam modulações significativas no conteúdo de compostos bioprotetores (FARAH; DONANGELO, 2006). A tabela 4 revela como o teor de um dos principais compostos bioativos (o ácido clorogênicos) difere em variedades regionais do fruto do cafeeiro.

Outros pontos importantes para a modulação do conteúdo de compostos bioativos é a proporção percentual da formação dos *blends* (COUTO, 2017) e o processo de torrefação dos quais provém a degradação e a formação de novos compostos bioativos através de reações exotérmicas (MCCRANIE et al., 2011), outras estratégias são utilizadas para a extração dos nutraceuticos, como uma torrefação mais branda, utilização de ultrassons, moagem mais fina e extratores mais eficientes (BAUER et al., 2018; GLEI et al., 2009; IAC- et al., 2012; KY et al., 2001; MICCADEI et al., 2008; PORTO, 2015; POUNIS et al., 2017; SAMPAIO, 2017; ZHOU; ZHOU, 2012).

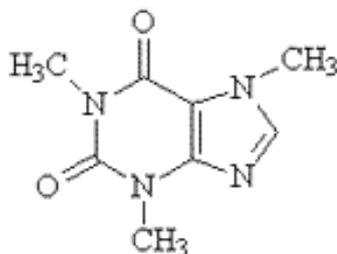
**Tabela 4:** Teor de ácidos clorogênicos e grãos de café verde, expresso em g% da matéria seca.

Variedade de café	Ác. Cafeoilquinico	Ác. eruloilquínico	Ác. dicafeoilquínico	Ács. Clorogênicos Totais	Referenciais
<i>C.arabica</i>	5.76	0.25	0.87	6.88	TRUGO; MACRAE, 1984)
<i>C. arabica</i> var Caturra	4.63	0.33	0.66	5.62	(CLIFFORD; RAMIREZ- MARTINEZ, 1991)
<i>C. arabica</i> var. Bourbon	4.77	0.34	0.56	5.67	(CLIFFORD; RAMIREZ- MARTINEZ, 1991)
<i>C. arabica</i> (Angola)	5.67	0.79	1,39	7.85	(CORREIA; LEITTIO; CLIFFORD, 1995)
<i>C. arabica</i> var. Boubon (Brasil)	4.2	0.28	0,77	5.25	FARAH et al., 2005)
<i>C. arabica</i> cv. Longberry (Ethiopia)	4.6	0.29	0.84	0.84	FARAH et al., 2005)

Fonte: Adaptado de FARAH; DONANGELO (2006).

### 2.2.1. Cafeína.

A cafeína além de um principal bioativo é classificada como um alcaloide termorresistente do grupo das xantinas sendo quimicamente conhecida como 1,3,7-trimetilxantina (Figura 2). Suas maiores fontes alimentares são café, guaraná e mate. A cafeína é composto de aspecto branco inodoro, extremamente solúvel em água quente e dar nas bebidas uma nota de amargor importante, em uma xícara de café há em média 100mg de cafeína (HALAL, 2008). Em algumas plantas a cafeína atua como um pesticida natural, já no organismo humano a cafeína permanece por longo período de tempo na corrente sanguínea e é um antagonista de todos os subtipos de receptores de adenosina (A1, A2A, A2B e A3), modificando atividades do sistema nervoso central reduzindo o sono e estimulando o estado de alerta (simpático) (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009). Nos testes *In vitro* a incubação com a cafeína em células tumorais vem demonstrando efeitos antiproliferativo e antimetastático (POUNIS et al., 2017).



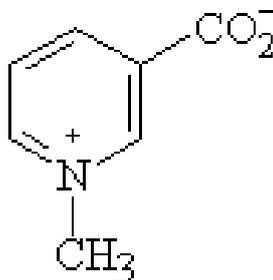
**Figura 2:** Estrutura química da Cafeína.

### 2.2.2. Trigonelina.

A trigonelina é um alcaloide pouco conhecido comparado com a cafeína, atua também no sistema nervoso central modulando atividades da secreção da bili e no intestino inibindo a formação de metabólito pró-aterosclerótico (ANWAR et al., 2018; SALDAÑA; MAZZAFERA; MOHAMED, 1997) (Figura 3).

No processo de torrefação dos grãos verdes de café a trigonelina em sua matriz sofre degradação dependente de torra, formando diversos compostos voláteis, entre eles as piridinas e pirróis (N-metilpirrol), que vão contribuir para o aroma característico do café e no sabor, principalmente em torras mais suaves em seu amargor (MONTEIRO; TRUGO, 2005). Além disso, durante a demetilação da trigonelina ocorre a formação de

ácido nicotínico, substância ausente no café verde e formada durante a torrefação. (HALAL, 2008).



**FIGURA 3:** Estrutura química da Trigonelina.

### 2.2.3. Diterpenos.

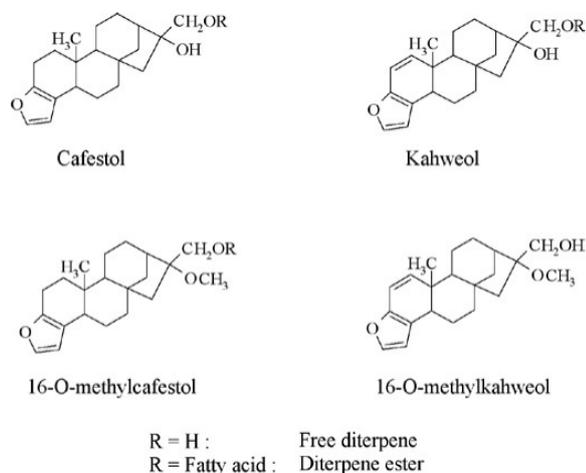
Os óleos extraídos dos grãos de café possuem alto nível de material lipídico fixo, sendo expressivo no café verde, entre elas carga de triglicerídeos, esteróis, fosfolipídeos, tocoferóis e ácidos graxos. Na fração lipídica insaponificável temos majoritariamente os diterpenos de esqueleto caurano **caveol** e **cafestol** (em torno de 12%) (Figura 4) (TSUKUI; OIGMAN; REZENDE, 2014). Trabalhos recentes vêm mostrando seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios com potencial anticarcinogênico (SPEER; KÖLLING-SPEER, 2006; TSUKUI; OIGMAN; REZENDE, 2014).

O café Arábica possui maiores teores de cafestol e caveol comparada com café robusta (KURZROCK; SPEER, 2001; ROOS et al., 1997), o caveol é descrito como sendo sensível ao aquecimento, oxidação e os ácidos minerais (BENGIS; ANDERSON, 1932; IVAMOTO et al., 2017).

Entre os mecanismos de ação da atividade anti-inflamatória do caveol e do cafestol está a inibição da produção de óxido nítrico pela inativação do óxido nítrico sintase de células inflamatórias (KIM; JUNG; JEONG, 2004). Em conjunto há relatos que palmitatos de caveol e cafestol estão associados com o aumento da atividade da glutathione S-transferase (GST) que envolve a proteção celular contra o estresse oxidativo (LAM; SPARNINS; WATTENBERG, 1982).

Contudo vale ressaltar que os diterpenos fazem parte da fração lipídica e seu excesso apresentam efeitos negativos, pois aumenta a taxa de colesterol no organismo

através de alterações enzimáticas no fígado (RUSTAN et al., 1997; SHATERI; DJAFARIAN, 2016).



**Figura 4:** Formulas estrutural dos diterpenos,

#### 2.2.4. Ácidos clorogênicos.

Outro bioativo importante na matriz sólida nos grãos de café arábica, são os ácidos clorogênicos (CGA), um hidroxibenzoico da família dos ácidos fenólicos não flavonoides termosensíveis (MENG et al., 2013; VENDITTI et al., 2015; VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2011). Os CGA que absorvem luz no espectro de 320-325nm e são apresentados como uma família de ésteres associadas em cinco grupos principais de isômeros de compostos fenólicos (SANTOS et al., 2007).

Seu engendramento é marcado pela esterificação do ácido quínico com derivados do ácido cinâmico: ácido cafeico (CA), ferúlico (FA) ou o p-cumárico (p-CoA) (CLIFFORD, 2000). Entre esses grupos temos: ácido cafeoilquínico (CQA), dicafeoilquínicos (diCQA), feruloilquínicos (FQA), p-cumaroilquínicos (CoQA), com pelo menos três isômeros principais em cada classe, e cafeoilferuloilquínicos (CFQA). Entre os polifenóis presentes no café os mais abundantes são os CGAs e o principal variante é ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) (MONTEIRO; TRUGO, 2005). Os CGAs são facilmente dissolvidos em água quente e potencializados pelo processo de torrefação branda, logo se nota que em média de 5 xícaras de café pode proporcionar cerca de 1 g de CGA (STALMACH *et al.*, 2009).

Isômeros do grupo de ácidos diCQA apresentam, *in vitro*, atividade inibitória de enzimas integrases do vírus da imunodeficiência humana (HIV), que liga o DNA viral ao DNA genômico do hospedeiro (KONOPKA et al., 1996; ZHU et al., 1999).

No artigo de PRIFTIS et al (2018) o café verde (cru) é rico em ácidos clorogênicos na forma de dímeros que nos primeiros estágios da torrefação são convertidos em monômeros e outros derivados são também transformados em monômeros de ácidos clorogênicos como exemplo um dos principais ACG o 5-CQA (JÁCOME, 2006). Porém com contínuo de graus de torrefação haverá a degradação e a conversão desses bioativos e outros macronutrientes (MORAIS et al., 2009; TRUGO; MACRAE, 1984).

O CGA é um polifenol dietético importante e biologicamente ativo, desempenhando vários papéis importantes e terapêuticos, tais como atividade antioxidante, anti-bacteriana, hepatoprotetora, cardioprotetora, anti inflamatória, antipirética, neuroprotetora, anti-obesidade, antiviral, antimicrobiana, anti-hipertensiva, scavenger de radicais livres e um estimulador do sistema nervoso central (SNC). Além disso, verificou-se que a CGA pode modular o metabolismo lipídico e a glucose em ambos os distúrbios relacionados com o metabolismo, genéticos e saudáveis (NAVEED et al., 2018).

Outros estudos vem relacionando as atividades dos CGAs com propriedades antioxidantes, efeitos anti-carcinogênicos, inibição a oxidação do LDL colesterol e prevenir a formação de lesões ateroscleróticas nos vasos sanguíneos, bem como mostrando atividade anti-inflamatório e propriedades antibacterianas (BAGCHI; MORIYAMA; SWAROOP, 2017; TSUKUI; OIGMAN; REZENDE, 2014).

LUDWIG et al., (2014), baseado em estudos prévios e no estudo de STALMACH et al., (2009) revisaram a biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos em humanos saudáveis e propôs a meia vida aparente de cada CGA e seus metabólitos (Tabela 5).

**Tabela 5:** Parâmetros farmacocinéticos de CGA's e metabólitos em circulação no plasma de voluntários saudáveis, 0-24 horas após a ingestão de 412  $\mu$ mol de CGA's e derivados contidos em uma porção de 200 ml café instantâneo.

CQAs e metabólitos	C <sub>máx</sub> (nM)	T <sub>máx</sub> (h)	T <sub>1/2</sub> aparente (h)
Ácido 5-O-Cafeoilquinico	2.2 $\pm$ 1.0	1.0 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.3
Ácido 3-O-Cafeoilquinico lactona-O-sulfato	27 $\pm$ 3	0.6 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1
Ácido 4-O-Cafeoilquinico lactona-O-sulfato	21 $\pm$ 4	0.7 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1
Ácido 3-O-Feruloilquinico	16 $\pm$ 2	0.7 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1
Ácido 4-O-Feruloilquinico	14 $\pm$ 2	0.8 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1
Ácido 5-O-Feruloilquinico	6.0 $\pm$ 1.5	0.9 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1
Ácido Cafeico-3'-O-sulfato	92 $\pm$ 11	0.2 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.4
Ácido Ferúlico-4'-O-sulfato	76 $\pm$ 9	0.6 $\pm$ 0.1	4.9 $\pm$ 1.0
Ácido dihidroferúlico	385 $\pm$ 86	4.7 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.4
Ácido dihidroferúlico-4'-O-sulfato	145 $\pm$ 53	4.8 $\pm$ 0.5	4.7 $\pm$ 0.8
Ácido dihidrocafeico	41 $\pm$ 10	5.2 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.4
Ácido dihidrocafeico-3'-O-sulfato	325 $\pm$ 99	4.8 $\pm$ 0.6	3.1 $\pm$ 0.3

Fonte: Adaptado de LUDWIG et al (2014).

### 2.3. Processamento dos grãos de café.

Nas etapas de processamento para obtenção dos extratos de café solúvel de boa qualidade, os grãos de café sofrem modificações notáveis em suas características físico-químicas. O principal objetivo dessas etapas seriam a preservação dos compostos químicos que apresenta além de bons resultados sensoriais, efeitos benéficos ao bem-estar ao organismo humano.

A primeira etapa dependendo da região escolhida para a plantação e cultivo, podem causar nos frutos e nos grãos de café deterioração, pois, alguns efeitos ambientais como o percentual de umidade e biodiversidade ecologia da região podem influenciar positivamente ou negativamente com as proporções dos bioativos desse fruto (CAMARGO; SANTIAGO; CORTEZ, 1992). A posterior no período de colheita, há uma influencia diretamente com os períodos do ano com o conteúdo de bioativos (PIMENTA, 2001). Entre as etapas de pós-colheita para a secagem dos frutos e assim a obtenção dos endospermas, são direcionados os frutos basicamente por dois sistemas válidos, o de via seca ou de via úmida (CAFÉPOINT, 2018).

Na escolha dos produtores a via seca é a mais utilizada, pois possuem vantagens como baixo capital investido, redução da oferta de água que causa menor poder de degradação pelos microrganismos e fácil processo (GODINHO; VILERA; OLIVEIRA, 1998), entretanto, SARAIVA et al (2009) verificaram que as infusões obtidas de via

úmida apresentaram maiores conservação das características sensoriais dos grãos refletidas nas infusões.

Com a obtenção dos grãos de café é necessário etapas padrões de separação, torrefação, moagem, peneiração, infusão, extração dos compostos solúveis, preservação dos compostos voláteis, pulverização e concentração do pó. É importante ressaltar que essas etapas padrões são modificadas dependendo da região e cultura. Nessa cadeia de custódia do processo do café, o mesmo passa por diversas transformações físicas (visíveis) e principalmente químicas (não visíveis) em todas as etapas, mas o maior fator modificador é processo de torrefação (ALVES; CASAL; OLIVEIRA, 2009; DAGLIA et al., 2002; NASCIMENTO, 2006).

A torrefação dos grãos de café está altamente associados com as modulações das características sensoriais das infusões como o sabor, aroma, cor e atividade antioxidante. Na fase incipiente da torrefação o açúcar sacarose começa a caramelizar, quando a temperatura chega em torno de 160°C as modificações da cor do grão passa para o marrom claro e em conjunto o aroma do café, com a temperatura em 190°C forma as reações de Maillard e Strecker modificando ainda mais o aroma, cor (marrom escuro) e sabor do café, assim dependendo do gosto do consumidor e dos padrões estabelecidos pelos fabricantes o café pode apresentar níveis de torras, sendo majoritariamente denominadas de torra clara, média e escura (FARAH, 2009).

Porém entre os produtos preponderantes e importantes da reação de Maillard ocorrem também resultados indesejáveis como exemplo a formação da acrilamida, sendo seu principal precursor o aminoácido asparagina. A acrilamida é formada proporcionalmente com o aumento do grau de temperatura da torrefação e é uma substância potencialmente maléfica a saúde, e tem sido fortemente associada com efeito neurotóxico e carcinogênico (PORTO, 2015). Baseado a estudos em animais de laboratório (EFSA, 2015; FAO, 2004) a OMS alertou que o consumo de acrilamida não pode exceder 1µg/kg ao dia, assim estudos vem buscando estratégias para diminuir o percentual de acrilamida nos alimentos, como a utilização de enzimas asparaginases (PORTO, 2015; SOARES, 2006).

Na florida foi determinada que as cafeterias revelasse em seus rótulos o risco de câncer por causa da acrilamida, substância que ocupa o grupo 2A, classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (do inglês IARC). A acrilamida faz parte de um conjunto de 900 substâncias potencialmente perigosas. Já no Brasil a

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não há regulação das quantidades de acrilamida nos alimentos, pois o IARC se baseia nos estudos em animais que estão altamente associados ao câncer, a ANVISA questiona a questão de não haver estudos com seres humanos que indica o mal na nossa saúde (BBC NEWS, 2018).

### **2.3.1. Produção de extratos de café solúvel.**

O café solúvel tradicional de boa qualidade no que abrange seu aroma e gosto (Flavours) passa por diversas etapas fundamentais que estão associadas diretamente com a qualidade do produto, processos edafoclimáticas que se inicia do plantio até serem servidos na nossa mesa. Em meados de 1920 o Brasil já era o maior produtor de café mundial, porém não exportava tanto assim, logo se viu obrigado a baixar os preços do café ou buscar uma solução de armazená-los para a estabilidade dos preços fossem mantidas. Logo, em 1937 o químico Max Morgenthaler desenvolveu um café solúvel em água que conservava o aroma através de hidratos de carbono, no qual foi muito bem aceito na Europa, mas as leis nacionais do Brasil não permitiam conservantes na bebida do café, esse problema foi resolvido em 1953 quando os suíços produziram um instantâneo do café solúvel sem a adição de aditivos e sem perda dos seus flavours (MARTINS, 2008).

A produção do café instantâneo passa por etapas, e nesse percurso é importante respeitar alguns pontos críticos que estão relacionados com a uniformidade do grau de maturação dos frutos no processo de colheita, despulpamento para obter as sementes, segregação dos grãos bons dos deformados, armazenamento dos grãos crus, torrefação em diversos níveis, armazenamento do café torrado, moagem que reduz os grãos milimetricamente aumentando a superfície de contato e assim facilitando a dissolução, transporte, armazenamento, preparação (como exemplo a infusão) e consumo. Logo, esses e outros cuidados especiais devem ser tomados para garantir a qualidade final do café solúvel (ABRAHÃO et al., 2010; MENDONÇA et al., 2007).

O Brasil é o maior produtor de café solúvel no mundo, segundo a portaria do nº: 130 da ANVISA o café solúvel é definido como: “O produto resultante da desidratação do extrato aquoso obtido exclusivamente do café torrado, através de métodos físicos, utilizando água como único agente extrator.” A forma de desidratação pode ser realizado através de métodos como o de Spray Dried para café solúvel em pó por evaporação (atomização) da água; método de Aglomeração do produto do Spray Dried

para café solúvel granulado e método de liofilização ou Freeze-Dried para café solúvel em pó por resfriamento e sublimação da água (ANVISA, 1999). O baixo teor de água por desidratação aumenta a vida útil do café solúvel contra pragas e deterioração natural e a extração por Spray Dried vem se mostrando mais eficiente comparado com o liofilizador, porém perde-se o aroma (GONÇALVES, 2015).

#### **2.4. Consumo do café.**

Sobre a óptica do perfil alimentar houve uma transição epidemiológica de um estado de desnutrição para um estado de obesidade da população, e esse perfil está relacionado com o aumento do consumo de alimentos com um alto teor calórico e baixo teor nutricional no que tem levado ao crescimento exponencial de DCNT, sendo um problema de saúde pública (IBGE, 2011). Assim a implementação de alimentos com melhores valores nutricionais acoplados a uma carga harmônica de compostos bioativos tem sido a melhor estratégia dos nutricionistas em adicionar em seus receituários novos alimentos e complementar antigos alimentos com propriedades bioativas, entre os alimentos tradicionalmente consumidos está o café.

Nesse contexto, se fez necessário desvendar a biodisponibilidade dos compostos bioativos no organismo, o café como já dito é o principal fonte de compostos fenólicos como ácidos clorogênicos na dieta ocidental que possuem alegações de saúde, assim há um crescimento de estudos dos mecanismos de efeitos de compostos fenólicos em animais e recentemente estudos em humanos (MONTEIRO; TRUGO, 2005; PERRONE; DONANGELO; FARAH, 2008; STALMACH et al., 2009).

Segundo a Organização internacional do café (OIC) o consumo mundial de café vai além dos 150 milhões de sacas de 60 quilos ao ano e com ascensão. O Brasil é o segundo país que mais consome café ficando atrás somente dos Estados Unidos e sendo a segunda bebida mais consumida em todo território brasileiro ficando atrás apenas da água. O uso do café em vista econômico é de extrema importância, dados obtidos pela Associação Brasileira de indústria do café, mostra claramente que 80% dos lares brasileiros tem café, e 89% dos consumidores acima de 60 anos bebem café diariamente, sendo a produção mundial na faixa dos 20 a 38% (CECAFÉ, 2018).

Entre o perfil dos consumidores de café os homens vencem comparados com as mulheres, no requisito idade ambos os sexos entre 50-59 anos são os que mais consomem café, entre o estado civil os de União estável são os que mais consomem café

sendo os divorciados os que menos consomem, e a nível de escolaridade o que possuem o 2º grau completo são os que mais consomem sendo os de 1º grau incompleto os que menos consomem café. Entre a ocupação os funcionários de empresa privado são os maiores consumidores comparados com os empresários. Entre os 17-20% dos que não consomem café 40,5% realmente não gosta do sabor, porém 16,7% por restrições médicas, 4,8% por crenças que faz mal a saúde e 26,2 por somente falta de hábito (ARRUDA; FERREIRA; MINIM, 2007).

## **2.5. Café e câncer.**

O câncer sendo um problema de saúde a nível mundial é um conjunto de doenças que estão diretamente associadas com a proliferação descontrolada das células, suas origens são multifatoriais e raramente é descoberta nos estágios iniciais da doença e sim na fase terminal por não apresentar sintomas e sinais facilmente detectáveis (TORTORA; DERRICKSON, 2012). Em todos os campos da ciência a busca da cura é incansável e entre esses estudos vem se observando a grande influência dos alimentos e principalmente suas propriedades funcionais no controle e tratamento desta patologia que se engloba entre outras das DCNT (KY et al., 2001; RIBOLI; NORAT, 2003; SURH, 2003; VITAGLIONE; FOGLIANO; PELLEGRINI, 2012).

Em 2016 as DCNT estavam entre os 71% das causas de mortes mundiais e dentro das estimativas das origens dessas mortes as doenças cardiovasculares lideraram com 17,9 milhões (44%) de mortes, seguidos dos cânceres com 9 milhões (22%), doenças crônicas respiratórias com 3,8 milhões (9%) e diabetes com 1,6 milhões (4%) de mortes (WHO, 2018). As DCNTS estão altamente relacionadas com o avanço cronológico do indivíduo e com o avanço de novas tecnologias em prol da vida humana a estimativa de sobrevida do indivíduo tende a crescer e em congruência as DCNT (DUCAN et al., 2012).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) no Brasil estima-se 600 mil casos de incidência de câncer para 2019, atualmente os homens sendo os maiores afetados com câncer de próstata com prevalência de 31% e as mulheres com câncer de mama com prevalência de 29% (INCA, 2018).

Entender as vias da tumorigênese e os mecanismos que estimulam e inibam essas vias ainda estão sendo o foco para diversas áreas da ciência. Na década de 80 os alimentos passaram a ser associados à saúde como sinônimo de vida melhor e mais

saudável, redução de doenças principalmente as que então envolvidas nas DCNT como diabetes, doenças cardíacas e o câncer. E foi nesse contexto que entram os chamados “Alimentos Funcionais” e o uso desses alimentos no tratamento *in vitro* de células tumorais para o esclarecimento dos marcadores tumorais (hallmarks of cancer) (VIEIRA; CORNÉLIO; SALGADO, 2006).

Entre a gama de alimentos que apresentam alegações de saúde, no qual quer dizer que revela forte associação com a redução ou cura de uma determinada patologia, alguns alimentos contêm compostos naturais com efeitos mais que positivos na regulação da proliferação desordenadas das células como acontecem no câncer. Moléculas presentes na infusão da bebida de café exercem propriedades de modulação dos estágios chaves dos marcadores da tumorigênese, que envolva a imortalidade, instabilidade genômica, indução a angiogênese, freio da proliferação celular entre outros (Figura 5) (GAASCHT; DICATO; DIEDERICH, 2015).

A relação entre o café e o câncer através dos dados obtidos na literatura revelam efeitos seletivos aos tipos de câncer, grau de malignidade e progressão tumoral.

No câncer de endométrio houve reduções em doses regulares de café (GUNTER et al., 2011; HASHIBE et al., 2015; MERRITT et al., 2014; UCCELLA et al., 2013). O café também pode agir como um coadjuvante no tratamento, impedindo a regressão de neoplasia de cólon (GUERCIO et al., 2015). Dados de LEE; ZHU (2006) mostraram que os principais compostos bioativos como ácidos clorogênicos e o ácido cafeico ativaram genes de reparo e apoptose por inibição de metilação em células de câncer de mama.

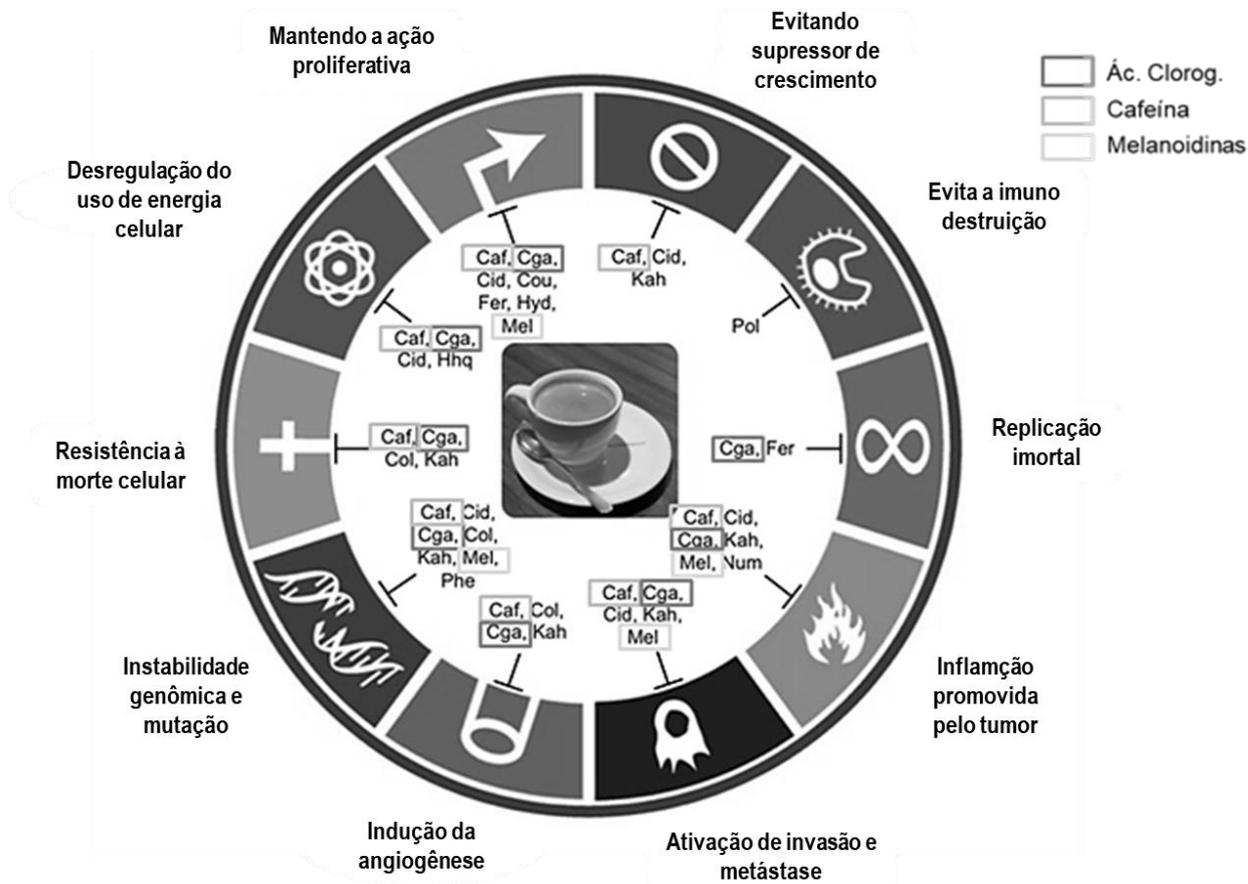
Houve grandes efeitos positivos nos tumores de próstata, uma forte associação protetora entre o consumo de café e o baixo risco de câncer de próstata foi verificado através de um estudo de coorte de LI et al., (2013), esses dados ganham mais forças com a meta-análise de DISCACCIATI et al (2013) & ZHONG et al (2014) que revelaram uma associação reversa do consumo de café com o câncer de próstata. Trabalhos *in vitro* de SHAFIQUE, (2012), no qual mostraram efeito protetor para o tumor de próstata avançado. Contudo, resultados de BOSIRE et al (2013) não houaram evidências epidemiológicas com forte correlação entre o consumo de café e estágios avançados de tumor de próstata, porém não desconsiderou a modesta redução que ocorreu em seu estudo. Porém, os mecanismos dessa proteção ainda não são bem

esclarecidos (TVERDAL, 2015). Segundo KOLBERG et al (2015) a modulação da transcrição de genes indicaria efeitos no câncer de próstata e inflamação.

Entre as relações do café com algumas patologias, estudo realizado com culturas de células nervosas animais sugere que o antagonismo dos receptores A2A da adenosina protege as células nervosas contra a neurotoxicidade induzida pela proteína  $\beta$ -amilóide que está altamente associada a doença de Alzheimer (DALL'LGNA et al., 2003).

As  $\beta$ -carbolinas, harmana e nor-harmana inibe competitivamente e reversivelmente as enzimas monoaminoxidase A e B, na qual estão envolvida na degradação de dopamina e outros neurotransmissores nas doenças de Parkinson (HERRAIZ; CHAPARRO, 2006).

O consumo de café foi inversamente associado com o risco de diabetes tipo 2 em uma maneira dose-resposta (VAN DAM; HU, 2015). O café é associado com uma redução de doença hepática (CANO-MARQUINA; TARÍN; CANO, 2013). Resultados epidemiológicos que ligam o consumo de café para benefícios de saúde potenciais, incluindo a prevenção de diversas doenças crônicas e degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e doença de Parkinson (LUDWIG et al., 2014). Nessa etapa do desenvolvimento tumoral, as células transformadas possuem um sistema intrínseco de defesa contra medicamentos e mecanismos de escape da vigilância imunológica, impossibilitando o sucesso do tratamento em alguns casos o uso de café que já é tradicionalmente utilizado vem apresentado uma boa estratégia (Figura 5) (GAASCHT; DICATO; DIEDERICH, 2015).



**Figura 5:** Compostos naturais do café visando as características de células tumorais e resumo dos efeitos anticancerígenos de algumas moléculas presentes no café. Ac. Clorog- ácidos clorogênicos  
 Fonte: Adaptado de GAASCHT; DICATO; DIEDERICH (2015).

### **3. Objetivos.**

#### **3.1. Objetivo geral.**

Investigar a influência de extratos de café (*Coffea arabica*) solúvel verde e submetido a diferentes tipos de torra em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humana com metástases em osso (PC-3) e cérebro (DU-145).

#### **3.2. Objetivos específicos.**

- Desenvolver extratos solúveis de café arábicas pelo processo de extração a seco;
- Avaliar a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais dos extratos produzidos;
- Quantificar cafeína, ácido cafeico e os ácidos clorogênicos nos extratos solúveis de café verde e torrado em diferentes graus de torra;
- Avaliar o efeito da incubação dos extratos em função da concentração, sobre a proliferação e viabilidade celular de linhagens de células de próstata;
- Avaliar os efeitos dos extratos de café sobre o ciclo celular e apoptose em culturas de células da linhagem de próstata
- Determinar a melhor extração do café arábica

## 4. Materiais e Métodos.

### 4.1. Matéria bruta e produção dos extratos.

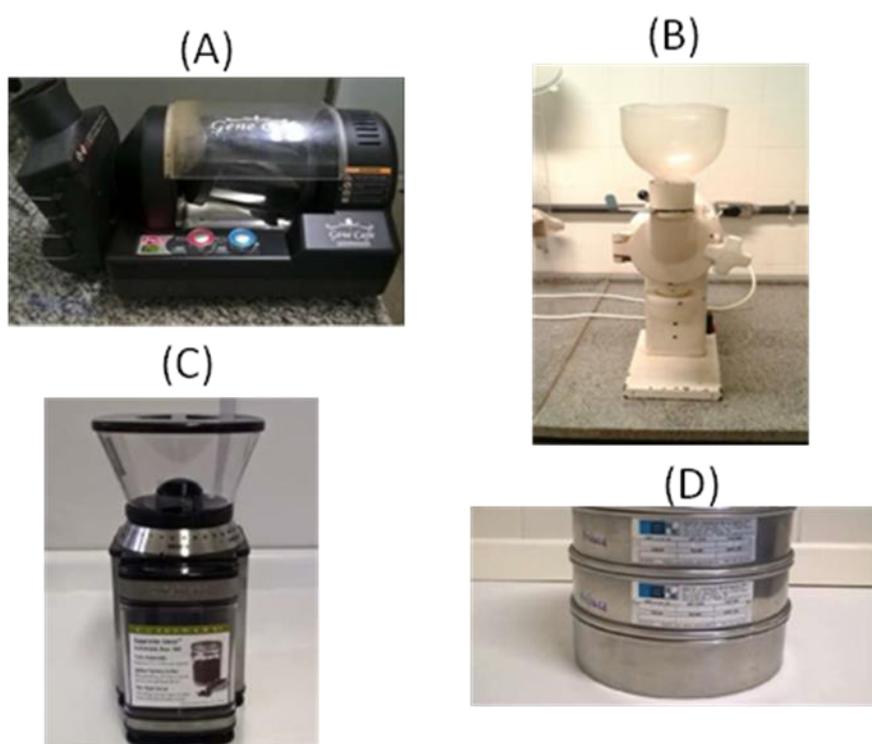
Os grãos de café da espécie *Coffea arabica linnaeus* (arábica), foram adquiridos da Fazenda Boa Vista – Bom Jardim (RJ), sendo o local de armazenamento das amostras o laboratório de Diagnóstico Molecular e Micologia da EMBRAPA AGROINDÚSTRIA DE ALIMENTOS (Planta V) no Rio de Janeiro.

Para obtenção dos extratos se fez necessário algumas etapas, a primeira etapa foi à segregação manual para o descarte de grãos imperfeitos e algumas sujidades na busca de selecionar os grãos de café de boa qualidade e manter mais homogênea possível (BEZZAN; DULGHEROFF, 2016). Os grãos foram separados em quatro partes: uma para o extratos de café verde (cru) e os demais foram divididos em torra clara (12 minutos à 230°C); média (14 minutos à 240°C) e escura (15 minutos à 245°C) (Figura 6) obtidos através do torrador de bancada Gene Café® (CBF-101, Kyungki-Do, Korea) (Figura 7A) os grãos torrados foram classificadas de acordo com a Escala Agtron e o manual do fabricante (PORTO, 2015).



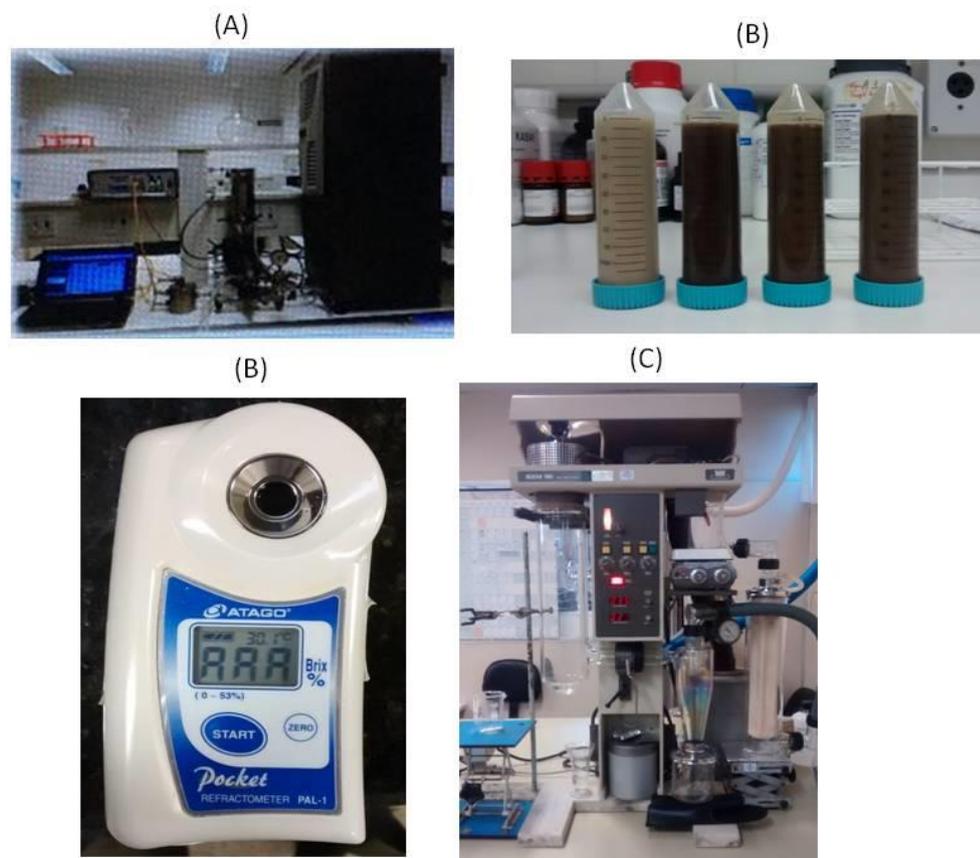
**Figura 6:** Grãos e extratos em pó de café arábica verde, torrados, tempo e temperatura segundo cada tipo de torra.

Os grãos verdes foram moídos no moinho de disco (Laboratory Mill 3600) (Figura 7B) por critério de rigidez dos grãos. Já as torras de café após o resfriamento natural foram moídas por moedor em aço escovado (Cuisinart) (Figura 7C), sendo todos em moagem fina para o aumento da superfície de contato na etapa de extração e assim uma melhor extração. Em seguida foram adquiridas uma padronização da granulometria das amostras, utilizando dois conjuntos de peneiras, de granulometria 0,850 e 0,600 mm e fundo para nivelar a superfície de contato das amostras (Bertel, São Paulo, Brasil) (Figura 7D)



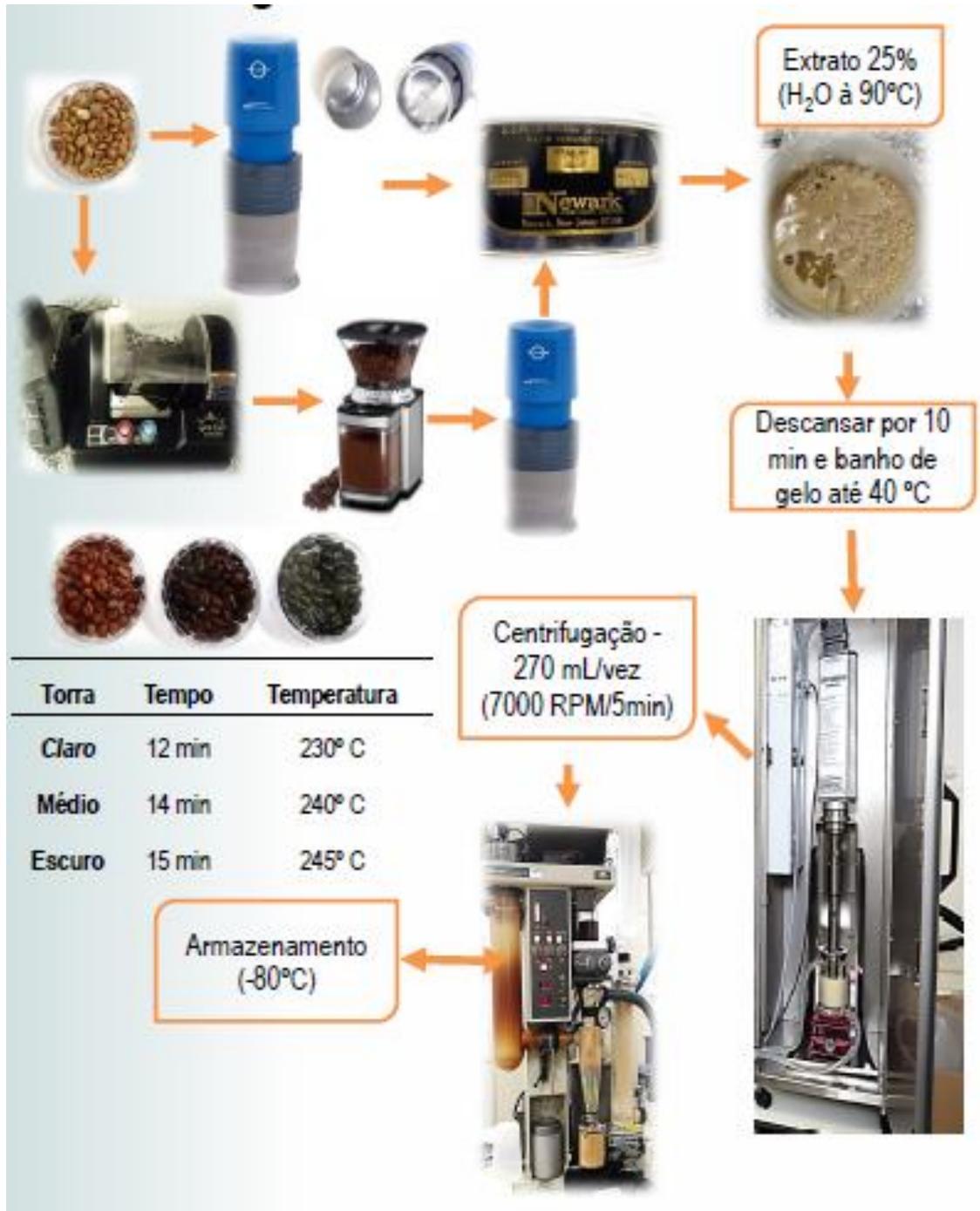
**Figura 7:** Equipamentos utilizados para a obtenção dos pós de café verde e torras. Torrador de bancada Gene Café (CBF-101, Kyungki-Do, Korea), utilizado para torrar grãos de café verde em diferentes temperaturas e tempos (A). Moinho de disco Laboratory Mill 3600, utilizado para moer grãos de café verde (B). Moedor automático em aço escovado Cuisinart (DBM8, EUA), utilizado para moer grãos de café torrado (C). Peneiras em aço inox (Bertel, São Paulo, Brasil) de abertura 850 e 600 $\mu$ m e fundo, utilizadas em análise granulométrica (D).

Após a obtenção do pó do café verde e torras, foi realizada uma infusão do café (Solubilização) para obter as extrações, assim através da infusão de 25% no Becker de 250 mL, 25 gramas de pó dissolvido em 100 mL de água destilada a 90-95°C. A posterior o mesmo foi refrigerado em um banho de gelo (estabilizador) e direcionado para o Processador Ultrassônico (Ultrasonic Processor UIP1500hd 1500 watts) (Figura 8A) para potencializar a extração. As amostras foram transferidas para tubos do tipo Falcon de 50 mL e centrifugado a 7000 rpm por 14 minutos (Figura 8B). A Parte líquida (sobrenadante) foi transferido para um Becker de 2000 mL e a parte sólida ou Borra (precipitado) foi desprezada. Com a porção líquida foi realizado a análise de °Brix de sólidos totais (g/100g) através do Refratômetro digital PAL-Alpha (Figura 8C) para delinear a viabilidade de secagem por Spray Dryer (Buchi B190 mini Spray Dryer) (Figura 8D). Após a secagem, os extratos obtidos de café solúvel foram armazenados de maneira individual em sacos laminados tipo zip protegida da luz (evitar degradação de alguns compostos da amostra) em câmara de refrigeração a -80°C até as análises de interesse.



**Figura 8:** Equipamentos utilizados para obtenção dos extratos quaidade: Ultrasonic Processor UIP1500hd 1500 watts (A); Rendimento da extração das amostras de café

verde, torra clara, média e escura (B); Refratômetro digital PAL-Alpha para averiçãõ de % de solutos soveis em uma soluçãõ (C); Aparelho de Spray Dryer (Buchi B190 mini Spray Dryer), utilizado para pulverizar amostras liquidas (C).



**Figura 9:** Fluxograma de produção da torra, processo de obtenção pó de café bruto, extração aquosa e secagem por liofilização e atomização

## 4.2. Caracterização físico-química dos extratos.

### 4.2.1. Quantificação de sólidos solúveis dos extratos aquosos de café.

A quantificação dos sólidos nos extratos brutos de café foi realizada por identificação de sólidos totais em estufa a 70°C e pressão de 70 mm/Hg. Os sólidos solúveis dos extratos foram analisados por refratômetro digital de bolso (PAL-1, Atago) (Figura 8B).

### 4.2.2. Coordenadas colorimétricas dos extratos secos de café arábica.

A análise da colorimetria dos extratos secos de café arábica verde e torras foram realizadas através do espectrofotômetro de bancada CM-5, Konica Minolta (Sensing Américas, INC) com calibração prévia. Após a devida higienização da placa de petri de vidro, foram realizadas as medições por refletância. Os padrões das expressões foram utilizados como base a escala de cores CIELAB, sendo as coordenadas L\*, a\*, b\* com os resultados apresentando média e desvio padrão (Figura 9).

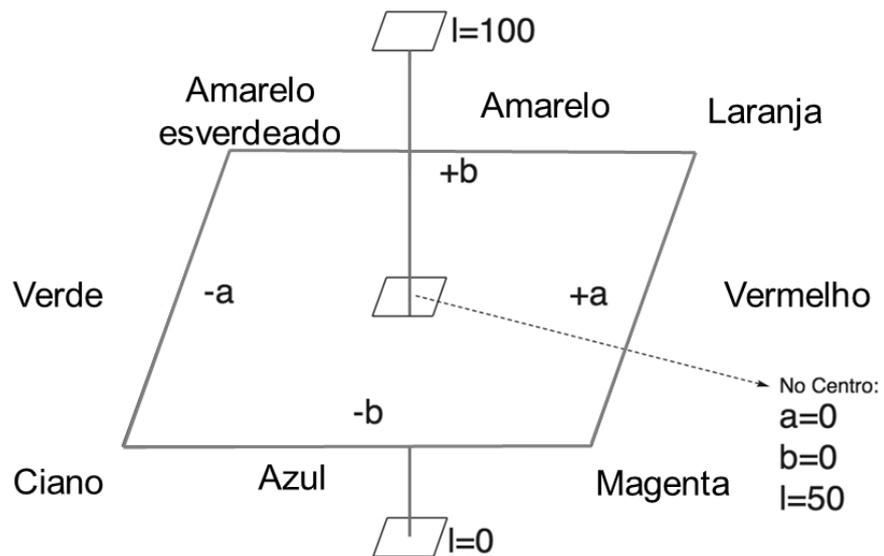


Figura 10: Representação espacial de cores na escala de cores CIELAB.

Fonte: Adaptado de Google imagens.

### 4.2.3. Caracterização dos extratos secos por HPLC.

#### 4.2.3.1. Determinação de cafeína.

O teor de cafeína foi dosado por metodologia de PERRONE; DONANGELO; FARAH, (2008) em um cromatógrafo Watters-Alliance 2695, detetor de arranjo de

fotodiodos (PDA) 2996 e software Empower® (Waters, Massachusetts, EUA), utilizou-se uma coluna BDS Hypersil C18 (5cm x 4,6mm e 2,6µm – Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). A fase móvel foi composta de 10% de acetonitrila em solução de ácido acético 0,5% (v/v) e também foi utilizada como solução para extração das amostras 1 grama em balão volumétrico de 25mL por 10 minutos em banho de ultrassom. As amostras foram filtradas em papel de filtro tipo filtração rápida e microfiltradas em unidades filtrantes descartáveis de Teflon hidrofílico com porosidade de 0,22µm. O padrão externo de cafeína foi preparado pesando-se aproximadamente 30mg de cafeína para um balão volumétrico de 30mL, solubilizando-se e avolumando também com a fase móvel. O comprimento de onda foi de 280nm com vazão da fase móvel de 0,5mL/min. O volume de injeção foi de 20µL.

#### **4.2.3.2. Determinação de ácidos clorogênicos**

A dosagem de ácido clorogênico foi realizada em cromatôgrafo Waters-Alliance 2695, detetor de arranjo de fotodiodos (PDA) 2996 e software Empower® (Waters, Massachusetts, EUA), utilizou-se uma coluna BDS Hypersil C18 (5cm x 4,6mm e 2,6µm – Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). O gradiente de fase móvel consistiu da composição inicial de 5% de metanol (fase A) e 95% de ácido fórmico a 0,5% (fase B) mantida durante 6 minutos. Em 8 minutos a composição da fase móvel atingiu 80% da fase A e assim permaneceu até 10 minutos. Em 11 minutos a composição atingiu o patamar de 100% da fase A e de 12 até 15 minutos a composição retornou às condições iniciais. O comprimento de onda foi de 325nm, a vazão da fase móvel foi de 1mL/min e o volume de injeção, 3µL. A extração das amostras se deu em banho de ultrassom por 20 minutos com 20% de acetonitrila em água ultrapura (v/v). As amostras foram, então, centrifugadas, microfiltradas em unidades filtrantes descartáveis de Teflon hidrofílico com porosidade de 0,22µm. O padrão externo de ácido clorogênico Sigma-Aldrich (98% m/m como ácido 5-cafeoilquínico) foi preparado pesando-se cerca de 30 mg do padrão para um balão volumétrico de 25 mL solubilizado e avolumado com ácido fórmico 0,5%.

#### **4.2.3.3. Determinação de ácido caféico**

A análise dos ácidos caféicos nas amostras foi feita segundo descrito por CASTRO; MELLO, (2002) e RIVELLI et al., (2007). As amostras foram extraídas, com a fase móvel por 10 minutos em ultrassom, avolumadas e filtradas (FHUP 0,45  $\mu\text{m}$ ), e injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). O sistema usado é composto por bomba isocrática, coluna de fase reversa (Waters Nova Pack C<sub>18</sub> - 5  $\mu\text{m}$  (150 mm x 4,6 mm)), detetor de UV no comprimento de onda de 330 nm e um sistema de integração, aquisição e processamento dos dados. Fase móvel foi composta de 10% acetonitrila (MeCN) e 0,5% de ácido acético (HOAc).

#### **4.2.4. Determinação de compostos fenólicos totais.**

Os fenólicos totais das amostras foram quantificados através da mensuração da atividade antioxidante pelo ensaio de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI; JR, 1965). O reagente de Folin Ciocalteu é uma solução básica de cor amarelada que contém íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Compostos fenólicos em reações básicas são oxidados, e os ácidos do reagente são reduzidos e invertendo a cor verde que é possível quantificar na leitura do espectrofotômetro a 750 nm. As alíquotas dos extratos solúveis de café arábica (10, 50 e 100  $\mu\text{L}$ ) em triplicata foram elaboradas a partir de uma solução inicial (50mg/10mL), foram pipetadas e ficaram ao abrigo da luz por duas horas, e após esse período, foi realizada leitura em espectrofotômetro na leitura realizada a 750 nm. Os resultados foram comparados com a reação do padrão ácido gálico e expresso em mg de ácido gálico (GAE)/100g de amostra.

### **4.3. Determinação da atividade antioxidante.**

As análises da atividade antioxidante dos extratos atomizados de café arábica verde e suas respectivas torras, foram avaliadas através de quatro métodos distintos, três em análise indireta DPPH, ABTS e FRAP. De análise direta a capacidade de absorção de radical de oxigênio (ORAC), partindo da mesma solução inicial usada para a análise de compostos fenólicos totais. Todas as diluições foram realizadas em triplicatas (TOMEI; SALVADOR, 2007).

#### **4.3.1. Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH,**

Segundo a metodologia de BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET (1995), o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é uma espécie radicalar livre estável, que recebe um elétron ou um radical de hidrogênio (redução) e inibindo a sua atividade radicalar, logo na presença de antioxidantes na amostra o radical é inibido.

O ensaio DPPH é um método colorimétrico que quando estável possui uma coloração púrpura tornando-se amarela quando reduzido, pois o DPPH converte-se em difenil-picril-hidrazina, em consequência o desaparecimento da absorção e podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. Os extratos solúveis de café arábica foram adicionados para reação com o radical estável DPPH em uma solução de metanol. A redução do radical do DPPH foi medida através da leitura da absorbância a 515 nm em 30 min de reação. Os volumes de extrato utilizados foram de 10µL, 50µL, 100µL partindo da solução inicial de 50mg/10mL. A atividade antioxidante foi expressa de acordo com a equação descrita abaixo:

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

#### **4.3.2. Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS<sup>\*+</sup>**

O método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) é um método criado em 1993 por MILLER et al., (1993) e melhorada por RUFINO et al., (2007). Uma solução com uma sonda Oxidante (Cátion-radical ABTS<sup>\*+</sup>) apresenta uma coloração característica. Uma vez que essa sonda sofre um processo de redução pelos compostos antioxidantes (Ex: Fenóis) encontrado na amostra de interesse, o cátion-radical ABTS<sup>\*+</sup> passa a ser convertido em uma forma não colorimétrica do ABTS. A

ideia central desse método é o monitoramento do decaimento da perda de sua coloração pelo espectrofotômetro.

Alíquotas com três diferentes volumes (10µL, 50µL, 100µL), partindo da solução inicial de 50mg/10mL dos extratos de café, foram utilizadas de modo a restar um volume final de 3mL em cada leitura. Uma curva padrão com solução de Trolox. Os resultados foram expressos em TEAC, atividade antioxidante equivalente ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) em µmol de trolox por grama de amostra.

#### **4.3.3. Análise determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP)**

O ensaio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) foi descrita por BENZIE; STRAIN (1996) é uma solução azul clara composto do complexo Fe<sup>3+</sup> e 2,4,6-tripiridils-triazina (TPTZ), e quando reduzido em Fe<sup>2+</sup> na presença do TPTZ forma um complexo de cor azul escuro, logo a atividade antioxidante é diretamente proporcional ao aumento da cor da solução, reação esta que é desencadeada pelo antioxidante presente na amostra. O ensaio analisou alíquotas de 10µL, 50µL, 100µL de um volume inicial de 50mg/10mL dos extratos de café, foram avolumados para 500 µL com água destilada, desse volume final, foram retirados 90 µL e quantificadas com 2,7 mL de reagente FRAP somados a 270 µL de água destilada. Após 30 min em banho-maria é efetuada a leitura de absorvância a 595nm. A curva padrão foi produzida com uma solução de sulfato ferroso e os resultados foram expressos em µM de sulfato ferroso por grama de amostra.

#### **4.3.4. Ensaio de atividade antioxidante pelo método de ORAC**

O método de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) foi desenvolvida por CAO; ALESSIO; CUTLER, (1993). Este sistema caracteriza-se pela presença de uma competição entre uma sonda oxidável sintética fluoresceína (FL) e os antioxidantes contidos nas amostras de café verde e torras com os radicais livres peroxil gerados por uma fonte de espécie radicalar AAPH (2,2'-azobis (2amidinopropano) dihidroclorado) (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Por teoria o método de ORAC funciona pelo parâmetro de decaimento da FL, induzida pelo radical peroxil por transferência de átomos de hidrogênio, logo os antioxidante das amostra de interesse inibe a oxidação da sonda e seu decaimento (PRIOR et al., 2003). Para a análise foram pesados 0,05g de cada extrato solúvel de café verde e suas respectivas torras e avolumados com 5ml de tampão fosfato PBS.

Foram realizadas diluições de (0,005; 0,0010; 0,0025; 0,0050; 0,01; 0,02; 0,03 e 0,04 µg/mL). Na análise foram adicionadas nos poços da microplaca 20 µL das diluições das amostras e completadas com 120µL de FL (previamente incubadas por 10 min à 37°C) e mais 60µL do radical AAPH. Em todos os poços, em seguida, foi adicionado 120 µL da solução de fluoresceína e 60 µL de AAPH. As microplacas foram incubadas por 3 horas a 37 °C no fluorímetro (SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices), onde também foi realizada a leitura.

A leitura foi realizada sob excitação a 485 nm e emissão a 535 nm, com um espaço de 30s entre uma leitura e outra. A partir dos dados de absorbância em relação aos tempos obtidos, foi calculada a área abaixo da curva (AUC). A atividade antioxidante do composto foi determinada com base na diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco, medida pelo decaimento da fluorescência com a adição da substância antioxidante no decorrer do tempo. Foi utilizado uma curva padrão de Trolox, com concentrações conhecidas e a atividade antioxidante do composto foi calculada. Todas as análises foram feitas em triplicata e os valores foram expressos em µmol Equivalentes de Trolox/g.

#### **4.4. Atividade *IN VITRO* dos extratos de café**

##### **4.4.1. Cultura de células e protocolo de tratamento**

As linhagens celulares de carcinoma de próstata humano de DU-145 (Metástase em cérebro) e PC-3 (Metástase em osso) foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Brasil). A cultura de células foi realizada em frascos próprios para cultura, em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1 % de penicilina e estreptomicina (PS), pH 7,4, sob atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. As células quando em confluência de 70-80%, sofriam processo de tripsinização, cerca de duas vezes por semana. Para cada experimento, as células foram semeadas em concentrações que variavam de 2.0 x 10<sup>5</sup> a

$4.0 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, em placas de 6 e 96 poços, durante as análises de ciclo celular, apoptose e viabilidade celular, respectivamente. Foi incluído um grupo controle para todas as amostras analisadas, sendo tratadas somente com próprio meio de manutenção da cultura, isento das amostras. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **4.4.2. Avaliação da proliferação celular pelo método de MTT**

A viabilidade das células foram analisadas através da atividade enzimáticas de suas mitocôndrias pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), conforme descrito por MOSMANN (1983) plaqueou-se  $2,0 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços. 24 horas depois, foram incubadas com os extratos de café solúvel em diferentes concentrações que variavam de 0,009 a 10 mg/mL. Após 24 horas de incubação, o meio foi trocado de todos os poços, sendo 200µL para o controle e 150µL das concentrações para os tratados e 150µL das concentrações para os tratados. Também foram adicionados 10 µL de MTT (5g/L) em cada poço. Depois de 4 h de incubação com o sal de MTT, em estufa, foram recolhidos 80µL dos poços, adicionado e 50 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO), a fim de dissolver o produto gerado. Após 15 minutos em estufa, a placa foi lida em leitor de microplacas (POLARIS, CELER®) a 570nm. A taxa de inibição da proliferação celular (CPIR) foi calculada com base na fórmula:

$$\text{CPIR} = (1 - \text{valor médio do grupo experimental} / \text{valor médio do grupo controle}) \times 100\%.$$

#### **4.4.3. Avaliação da influência dos extratos no ciclo celular**

O iodeto de propídio (PI) foi utilizado para avaliar o ciclo celular, pois o PI se intercalar com a molécula de DNA parando o ciclo. Após o plaqueamento e incubação das amostras com as duas concentrações de 5 e 10 mg/mL por 24h, os 6 poços foram tripsinizadas com 300 µL, transferida para um tubo falco de 15 mL com 5 mL de meio DMEM, centrifugada por 2000 rpm/8' descartou-se o sobrenadante e resuspendeu com 400 µL de solução fria de Vindelov (VINDELOV, 1977), contendo 0,1% de Triton X-100, 0,1% de RNase e 50 µg/mL iodeto de propídio (Sigma). Após incubação por 15 minutos foi transferida para um tubo de citometria, a suspensão celular foi analisada

para conteúdo de DNA em citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences), após a aquisição de 20000 eventos. As proporções relativas de células com conteúdo de DNA indicativo de apoptose ( $< 2n$ ), fase  $G_0$ - $G_1$  ( $2n$ ), fase S (fase  $> 2n$ , porém  $< 4n$ ), e fase  $G_2/M$  ( $4n$ ) foram adquiridos e analisados utilizando FlowJo. A percentagem de população de células em uma fase específica foi estimada com FlowJo software de análise versão 1.2.

#### **4.4.4. Avaliação da influência dos extratos na morte celular**

Para avaliação apoptose, as células em estudo foram submetidas a marcação com anexina V conjugada a FITC (BD Pharmigen, San Diego, EUA). As células foram ressuspendidas em 400  $\mu$ L de solução tampão do kit II de detecção de apoptose (BD Pharmigen), 5  $\mu$ L de anexina V FITC e 5  $\mu$ L de iodeto de propídio por 15 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences), a pós a aquisição de 20000 eventos. Os dados foram analisados em software FlowJo versão 1.2.

#### **4.5. Análises estatísticas**

Os resultados foram apresentados em médias  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes feitos em triplicata. Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

## 5. Resultados

### 5.1. Etapas de produção e extração dos extratos solúveis de café

Os grãos crus de café arábica obtidos foram selecionados em 4 grupos distintos, sendo grãos de café verde não torrado, grãos de café torra clara, média e escura. No processo de torra houve perda de massa e degradação de diversos compostos, entre eles, sólidos solúveis que estão diretamente associados com atividades biológicas. Assim foi realizado análise de sólidos solúveis com refratômetro digital de bolso (PAL-1, ATAGO) que verificou uma depleção do percentual dos sólidos solúveis dependente de torra, variando de 7,23 e 10,66 g/100g (Tabela 6).

**Tabela 6:** Rendimento dos solutos dos sobrenadantes pelo Refratômetro digital PAL-Alpha.

<b>Café arábica</b>	<b>Graus Brix</b>
Verde	10,66±0,11
Clara	9,56±0,37
Média	8,45±0,21
Escura	7,23±0,11

O consumo dietético do café ingerido pela população permeia em torno de 6-10% de concentração (DOMENE, 2005), porém a partir de estudos prévios como o de BAUER et al (2018) onde foi demonstrado que a concentração para atividade quimiopreventivo e antiproliferativo de extrator de café foi bem acima dessa média, logo, foi possível chegar a uma concentração de 25% (p/v).

### 5.2. Análises Físico-químicas

#### 5.2.1. Colorimetria dos extratos solúveis atomizados

A análise colorimétrica revelou distinção significativa de cor dos extratos de café verde e das diferentes torras. O extrato de café verde, como esperado (SCHMIDT;

MIGLIORANZA; PRUDENCIO, 2008), apresentou maior valor de luminosidade que foi inversamente proporcional com o grau de torrefação, porém vale ressaltar que não houve diferenças significativas entre os extratos solúveis de café arábica torra clara e médio. O extrato solúvel de café verde apresentou uma coloração amarelo-esverdeado, já as torras apresentaram uma coloração inicial de vermelho-amarelo sendo direcionado rapidamente para o vermelho-azulado (Tabela 7).

**Tabela 7:** Coordenadas de cor (L\*a\* b\*) dos extratos secos de café robusta.

<b>Coodernada</b>	<b>CV</b>	<b>TC</b>	<b>TM</b>	<b>TE</b>
L*	78,71±0,07 <sup>a</sup>	56,85±0,05 <sup>b</sup>	55,47±2,38 <sup>b</sup>	50,42±0,02 <sup>c</sup>
a*	-0,44±0 <sup>a</sup>	11,26±0,01 <sup>b</sup>	10,13±0,01 <sup>c</sup>	10,52±0,01 <sup>d</sup>
b*	20,45±0,01 <sup>a</sup>	33,13±0,03 <sup>b</sup>	29,13±0,04 <sup>c</sup>	28,96±0,02 <sup>d</sup>

\*\* Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (p <0,05). Legendas: CV: *café verde*, TC: torra clara, TM: torra média, TE: torra escura

## 5.2.2. Identificação e quantificação dos principais compostos bioativos nos extratos solúveis de café arábica verde e torras

### 5.2.2.1. Quantificação de cafeína por HPLC

O valor do teor de cafeína analisados nos extratos é demonstrada na Figura 11A. Quando observado o conteúdo de cafeína nos extratos de café solúvel, o café de torra claro foi o de maior concentração (1,8±0,3g/100g). Já as amostras de café verde e torra média não apresentaram diferenças significativas (p<0,05), o menor teor de cafeína foi visualizado nos extratos de café torra escura com valores médios de (1±0,14g/100g).

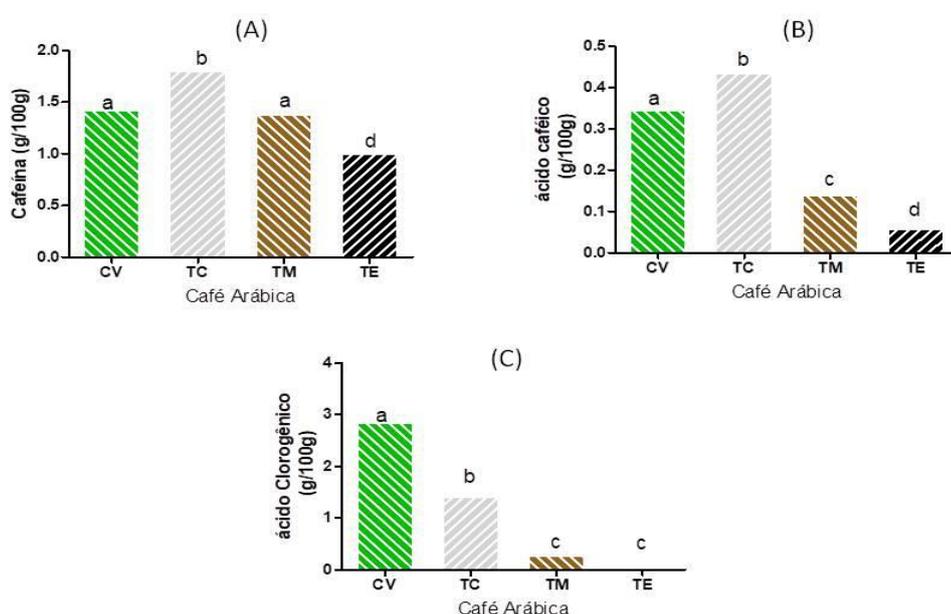
### 5.2.2.2. Quantificação do ácido caféico por HPLC

Entre a quantificação de um hidroxicinâmico dos ácidos fenólicos, foi determinada a concentração de ácido cafeico dos extratos de café, todas apresentaram diferenças significativas (p>0,05) a maior concentração foi do café torra clara (0,43±0,007g/100g), seguidos do café verde (0,34±0,007g/100g), torra média (0,14±0g/100g) e a torra escura de menor teor (0,06±0g/100g) sendo sua diminuição

dependente de torra, porém os extratos de café torra média e torra escura não apresentaram diferenças significativas ( $p>0,05$ ) (Figura 11B).

### 5.2.2.3. Quantificação de ácidos clorogênicos por HPLC

Entre a quantificação de um hidroxibenzoico dos ácidos fenólicos, foi determinada a concentração de ácidos clorogênicos dos extratos de café, a maior concentração foi do café verde ( $2,84\pm 0,03\text{g}/100\text{g}$ ), sendo sua diminuição dependente de torra, porém os extratos de café torra média e torra escura não apresentaram diferenças significativas ( $p>0,05$ ) (Figura 11C).

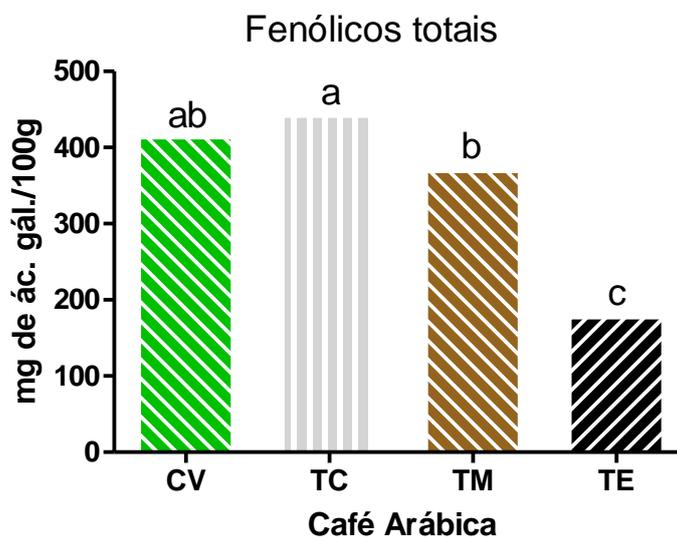


**Figura 11:** Teores de cafeína (A), ácido cafeico (B) e ácidos clorogênicos (C) nos extratos solúveis de café arábica secos por atomização. as letras diferentes significa com diferenças significativas entre si ( $p>0,05$ ), já as letras iguais representa sem diferenças significativas. Abreviações: CV- Café Verde; TC- Torra Clara; TM- Torra Média e TE- Torra Escura.

### 5.2.3. Teor de compostos fenólicos totais nos extratos secos de café.

Na análise do teor de compostos fenólicos totais, observou-se que os valores maiores foram referentes ao extrato de café torra clara no valor de  $442,58\pm 15,25\text{mg}$  de ácido gálico/100g de amostra, porém sem apresentar diferenças significativa com o extrato de café verde ( $p>0,05$ ). O extrato de café verde com valor de  $414,35\pm 24,53\text{mg}$

de ácido gálico/100g de amostra que também não apresentou diferenças significativas com a torra média, sendo a menor concentração de compostos fenólicos em extratos de café torra escura com valor de  $178,19 \pm 15,52$ mg de ácido gálico/100g de amostra (Figura 12).



**Figura 12:** Teor de compostos fenólicos totais nos extratos solúveis de café arábica, as letras diferentes significam com diferenças significativas entre si ( $p > 0.05$ ), já as letras iguais significam sem diferenças significativas entre si ( $p > 0.05$ ). Abreviações: CV-Café verde, TC-Torra Clara, TM-Torra média, TE- Torra Escura.

### 5.3. Atividade antioxidante dos extratos de café arábica verde e torras.

A análise da atividade antioxidante dos extratos solúveis de café verde e respectivas torra foram realizadas através de quatro diferentes métodos, sendo um direto (ORAC) e três indiretos (ABTS, FRAP e DPPH). As análises foram realizadas na concentração de 5mg/ml em alíquotas de 10, 50 e 100 ml. As análises que apresentaram maiores sensibilidade foram a DPPH e ABTS seguidos do ORAC e FRAP (Todos os extratos apresentaram atividade dependente de concentração). O Trolox (um análogo da vitamina E) foi usado como padrão para medir a força antioxidante das amostras de interesse (RE et al., 1999).

Os métodos de ABTS e FRAP apresentaram reações semelhantes em todos os extratos e refletem com os dados da análise de fenólicos totais, a qual ganha peso com o

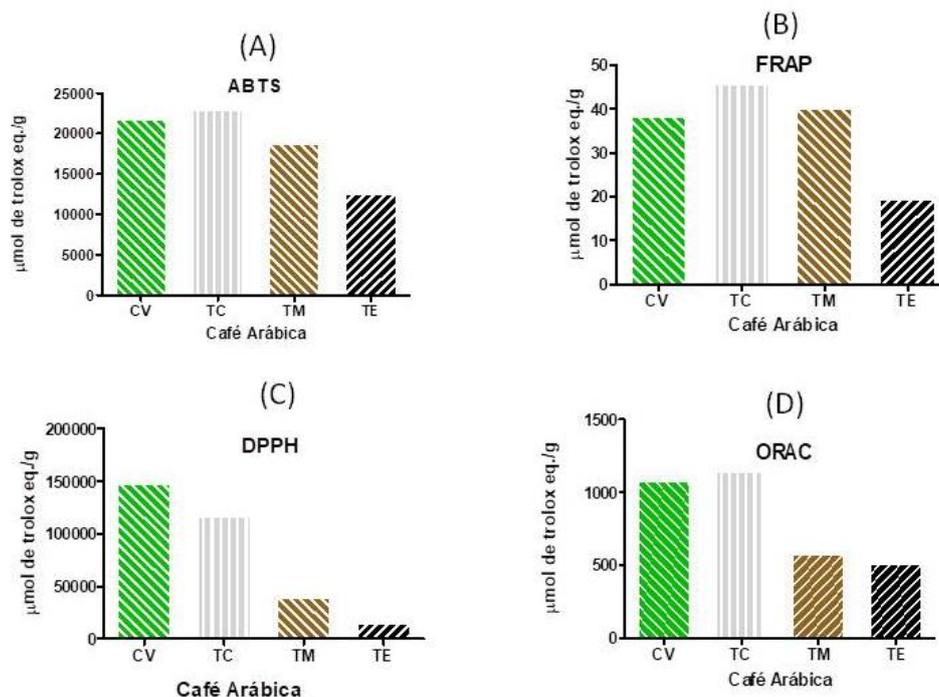
trabalho realizado por MOREIRA et al (2005), que correlacionou monômeros de ácidos clorogênicos com maior atividade de FRAP e os compostos solúveis de cafeína e ácido cafeico com efeitos superiores nas análises de ABTS. Os dados obtidos do ABTS dos extratos analisados se alinham com o trabalho de ROCHA et al (2012).

O extrato de café torra clara apresentou maior atividade antioxidante ( $22933,62 \pm 21,92$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra), seguidos do café verde ( $21808,91 \pm 167,66$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra), torra média ( $18784,72 \pm 23,18$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra) e torra escura ( $12600,13 \pm 24,22$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra) (Figura 13A). Nos resultados da metodologia do FRAP seguem quase o mesmo padrão, extrato de café arábica torra clara apresentou maior atividade ( $45,85 \pm 0,01$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra) seguido do café torra média ( $40,01 \pm 0,03$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra), café verde ( $38,24 \pm 0,06$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra) e torra escura ( $19,56 \pm 0,01$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra) (Figura 13B).

O DPPH não reage com flavonoides e eles são em altas concentrações em extratos de café verde segundo VIEIRA; CORNÉLIO; SALGADO (2006), NASCIMENTO, (2006) e ALESSANDRA et al (2014). Os flavonoides são compostos termossensíveis, sendo facilmente degradado mesmo em torras mais brandas como visto por SANTOS et al (2007). Os ácidos clorogênicos são termossensíveis e também abundantes nos extratos de café verde, os CGA estão diretamente associados com a redução do radical de DPPH no qual está em consonância com os resultados obtidos no presente trabalho (BUDRYN; NEBESNY, 2003).

Os resultados dos extratos no DPPH tiveram diminuição dependente de torra, coincidindo com os teores de ácidos clorogênicos encontrados nessas amostras. Sendo o café verde com  $147826,36 \pm 2281,37$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra; torra clara com  $116898,66 \pm 1236,24$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra; torra média com  $39422,76 \pm 281,83$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra e torra escura com  $14724,55 \pm 128,38$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra (Figura 13C).

No método de ORAC não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os extratos de café verde e torra clara ( $1081,5 \pm 27,5$  e  $1150,5 \pm 5,16$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra) e entre os extratos de café torra média e torra escura ( $584,33 \pm 14,33$  e  $511,66 \pm 33$   $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de amostra) (Figura 13D).



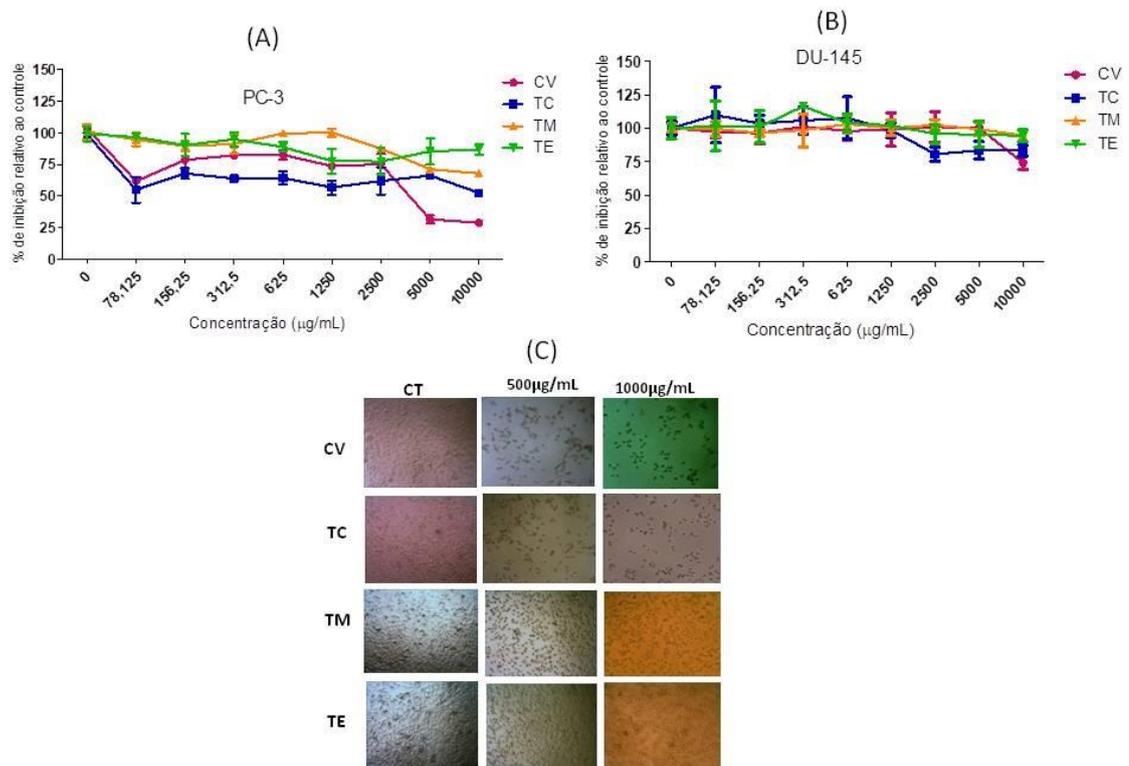
**Figura 13:** Potencial de atividade antioxidante dos extratos de café solúvel arábica verde e torra clara, média e escura de acordo com quatro metodologias, uma direta pela capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) e três indiretas pelo ensaio DPPH, capacidade antioxidante equivalente a Trolox (ABTS / TEAC), capacidade de redução férrica (FRAP). As letras diferentes significam sem diferenças significativas entre si ( $p > 0.05$ ), já as letras iguais significam sem diferenças significativas entre si ( $p > 0.05$ ). Abreviações: CV-Café verde, TC-Torra Clara, TM-Torra média, TE- Torra Escura.

#### 5.4. Efeitos dos extratos solúveis de café arábica verde e torras em linhagens de câncer de próstata.

##### 5.4.1. Efeito dos extratos secos de café na viabilidade de PC-3 e DU-145.

Através da metabolização do sal de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em formazan pelas enzimas mitocondriais das células malignas de PC-3 e DU-145, foi possível analisar o efeito citotóxico dos extratos do café arábico verde e suas torras clara, média e escura.

Na PC-3 observamos uma redução significativa ( $p>0.05$ ) em doses baixas de extrato de café verde e torra clara, ambas com 78,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$  reduziram a viabilidade de forma preponderante de quase 50% e mantiveram-se estáveis, porém o extrato solúvel de café arábica verde nas concentrações de 5.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  aumentou o poder de redução da viabilidade celular da PC-3 em torno de 70% e na concentração de 10.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  causou uma redução de 72%. O extrato de café torra média apresentou redução significativa ( $p>0.05$ ) de apenas 33% na concentração a partir de 10.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , já o extrato de café arábica torra escura apresentou reduções em média de 13% (Figura 14A).



**Figura 14:** Resultados do percentual de inibição relativo ao controle de células tumorais de próstata (PC-3) tratadas por 24h com extratos solúveis de café arábica em diferentes concentrações pela metodologia de MTT (A). As fotos das células tratadas com 5.000 e 10.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , pois apresentaram resultados mais significativos. As letras diferentes significam sem diferenças significativas entre si ( $p>0.05$ ), já as letras iguais significam sem diferenças significativas entre si ( $p>0.05$ ). Abreviações: CV-Café verde, TC-Torra Clara, TM-Torra média, TE- Torra Escura.

No ensaio de MTT na linhagem da DU-145, a maioria dos resultados das incubações dos extratos solúveis de café verde e torras clara, média e escura não apresentaram resultados de porcentagem de redução comparada ao controle significativo ( $p > 0.05$ ). Nos extratos de café solúvel arábica verde houve redução apenas na maior concentração que foi de  $10.000 \mu\text{g/mL}$  ocasionando uma redução ínfima de 26% (mesmo sendo a maior comparadas com os outros extratos), nos extratos solúvel do café arábica torra clara houve uma redução constante de apenas 20% nas concentrações de  $2.500$ – $10.000 \mu\text{g/mL}$  e nos extratos solúveis de café arábica médio e escura houve uma redução muito pequena em ambas de apenas 5% nas suas maiores concentrações que foi de  $10.000 \mu\text{g/mL}$  (Figura 14B).

#### **5.4.2. Efeitos dos extratos de café verde e torras no ciclo celular de PC-3.**

Os achados na literatura refletem bem os dados adquiridos do ciclo das células de PC-3 tratada com extratos solúveis de café arábica verde e torras. Foram verificadas modificações significativas comparada com o controle ( $p > 0.05$ ). Foram usadas as maiores concentrações no tratamento das células de PC-3 ( $5.000$  e  $10.000 \mu\text{g/mL}$ ). Em suma, nas fases  $G_0/G_1$ , os tratados com café arábica verde e torra clara apresentaram diminuições, sendo mais significativo no extrato solúvel de café verde ( $p > 0.05$ ), ambos foram dependente de concentração, sendo no verde mais marcante comparada com os extratos de café arábica torra clara, já a torra médio não apresentou diferenças significativas e a torra escura teve pouca variação comparada com o controle (Tabela 8).

**Tabela 8:** Efeitos dos extratos solúveis de café arábico verde e torras nas concentrações de 5.000 e 10.000µg/mL no ciclo celular de células tumorais de próstata com metástase em osso (PC-3).

Amostra	Fase do ciclo		CT	5000 µg/mL	10000 µg/mL
	celular				
CV	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>		66,82±4,57 <sup>a</sup>	52,32±1,14 <sup>b</sup>	40,13±4,04 <sup>C</sup>
	S		3,30±1,80 <sup>a</sup>	30,96±0,57 <sup>b</sup>	41,62±1,32 <sup>C</sup>
	G <sub>2</sub> /M		21,02±1,19 <sup>a</sup>	16,72±1,02 <sup>ab</sup>	15,42±41,62 <sup>b</sup>
TC	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>		61,81±2,52 <sup>a</sup>	55,53±1,50 <sup>b</sup>	54,85±0,96 <sup>b</sup>
	S		3,88±0,98 <sup>a</sup>	8,67±3,21 <sup>a</sup>	15,74±40 <sup>b</sup>
	G <sub>2</sub> /M		20,12±2,48 <sup>a</sup>	9,42±1,74 <sup>b</sup>	17,83±2,4 <sup>a</sup>
TM	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>		62,23±4,31 <sup>a</sup>	62,73±1,19 <sup>a</sup>	61,9±0,10 <sup>a</sup>
	S		5,81±0,52 <sup>a</sup>	8,15±0,39 <sup>b</sup>	8,40±0,56 <sup>b</sup>
	G <sub>2</sub> /M		27,1±3,67 <sup>a</sup>	21,95±1,6 <sup>b</sup>	23,43±1,32 <sup>ab</sup>
TE	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>		64,07±1,1 <sup>a</sup>	60,2±1,85 <sup>b</sup>	61,08±1,10 <sup>ab</sup>
	S		9,82±0,63 <sup>a</sup>	7,93±0,44 <sup>b</sup>	8,30±0,32 <sup>b</sup>
	G <sub>2</sub> /M		22,63±0,51 <sup>a</sup>	21,88±1,18 <sup>a</sup>	22,78±0,78 <sup>a</sup>

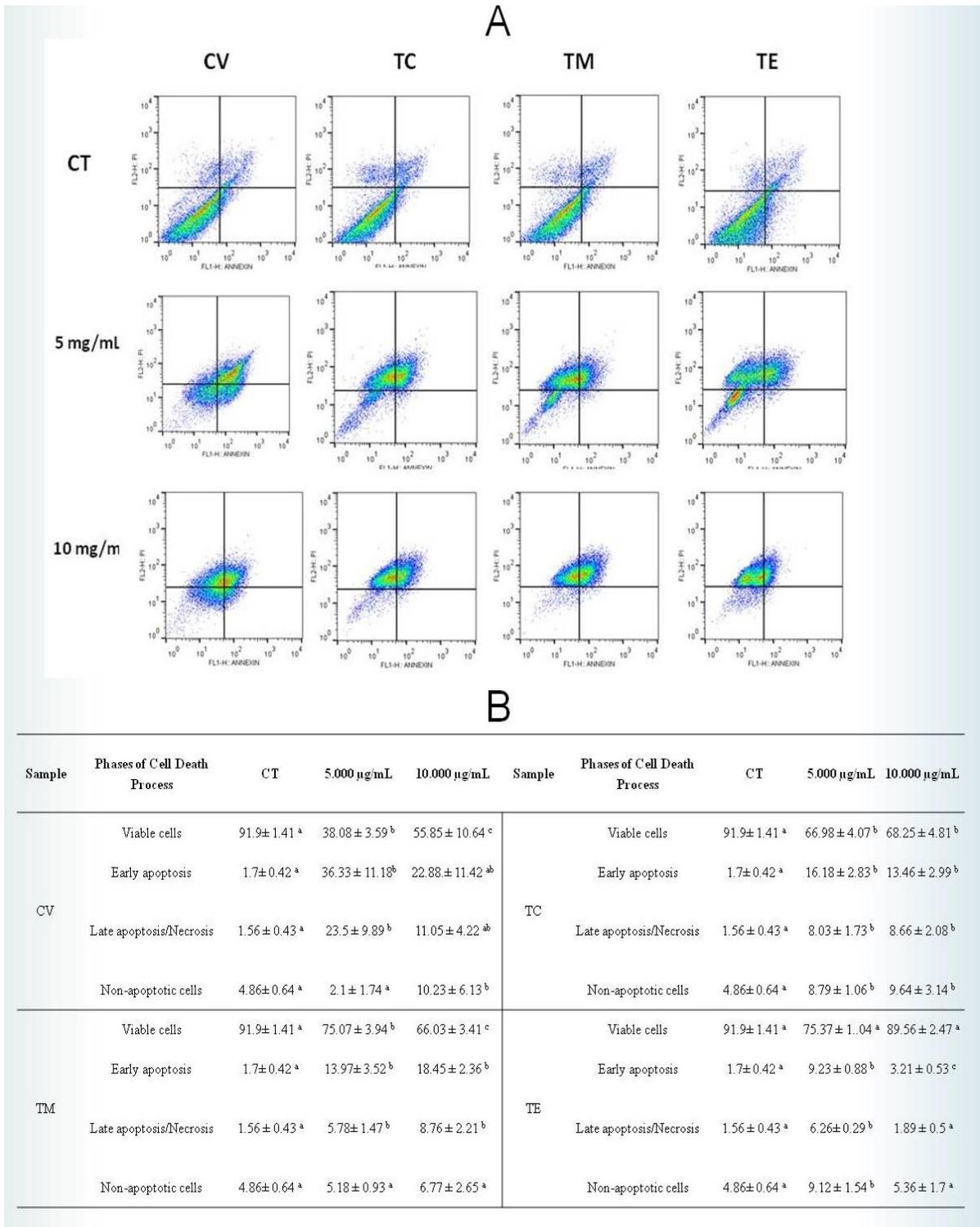
As letras diferentes significam sem diferenças significativas entre si ( $p > 0.05$ ), já as letras iguais significam sem diferenças significativas entre si ( $p > 0.05$ ). Abreviações: CV- Café verde, TC-Torra Clara, TM-Torra média, TE-Torra Escura.

Na fase “S” os extratos de café arábica verde apresentaram um aumento significativo dependente de concentração, entretanto, houve um decréscimo em congruência com o nível de torra dos extratos. Por fim nas fases G<sub>2</sub>/M houve uma diminuição significativa que foram se perdendo dependente de torra, até chegar a torra escura, na qual não houve diferenças significativas comparadas com o controle mesmo em concentrações mais altas (Tabela 8).

#### 5.4.3. Efeitos dos extratos de café verde e torras na apoptose de PC-3.

No ensaio de apoptose as células de adenocarcinoma com metástase em osso (PC-3) foram incubadas com os extratos solúveis de café verde e torras nas concentrações de 5.000 e 10.000µg/ml, seus efeitos mostraram uma modificação da

população de células, os extratos de café verde e torras diminuíram as células do quadrante inferior esquerdo que são as células viáveis e aumentaram as células no quadrante superior á direita que são células em apoptose, porém esses efeitos foram diminuindo dependendo do aumento da torra do extrato, sendo a torra escura sem diferenças significante comparada ao controle (Figura 15AB). Esses resultados podem está diretamente relacionado com a produção de compostos monoméricos de ácidos clorogênicos e ácido caféico que modulam as atividades epigenética da célula aumentando a metilação do DNA e silenciando alguns genes envolvidos na proliferação (ESTELLER; HERMAN, 2002; JONES; BAYLIN; KIMMEL, 2002; JONES; TAKAI, 2001; ZHOU; ZHOU, 2012).



**Figura 15:** Efeito das concentrações de 5.000 e 10.000mcg/mL de extratos de café arábica verde e torras na morte celular programada (Apoptose) na linhagem celular de adenocarcinoma de próstata com metástase em osso (PC-3).

## 6. Discussão

O presente trabalho teve como objetivo principal a produção de extratos solúveis de café arábica verde e torras como uma melhor estratégia para a prevenção e o combate ao câncer. A escolha do café da espécie *C. arabica* (ARÀBICA) é refletida pela sua qualidade superior comparadas com as outras espécies, entre elas características sensoriais, maior consumo, sabor mais apetecível (SOUSA et al., 2007), custo mais elevado, sua óptica econômica sendo o Brasil líder em produção e exportação (35% a nível mundial de café, sendo 62% á produção de café arábica) e o segundo no mercado consumidor (CECAFÉ, 2018; EMBRAPA, 2019). Existem uma variedade de publicações na literatura científica sobre os efeitos dos extratos do café arábica verde incubadas em células normais e cancerígenas (BUDRY; ZACZYNSKA; ORACZ, 2016; SUNG; GO; SHIN, 2012), porém poucos trabalhos apresentam os efeitos dos extratos quando submetidos a graus variados de torras.

Entre os exemplos a incubação de células adenocarcinoma de próstata com metástase em cérebro (DU-145) com extratos solúveis de café robusta verde e torras com dois tipos de secagem, um pelo calor (Spray-Drier) e outro pelo frio (Liofilização) de BAUER et al (2018). E trabalhos de JUNG et al (2017) que trataram com extratos de café arábica em quatro diferentes torras células não humanas, as quais não apresentaram efeitos citotóxico, as linhagens normais de macrófagos (RAW 2647) e hepatócitos (AML-12), sendo ambos de camundongos.

PRIFTIS et al., (2018) verificaram modulações significativas de expressão da glutathiona (GSH) de células endoteliais da linhagem EA.hy926 e células de mioblasto de linhagem C2C12 incubadas com extratos verde e torra de café arábica e robusta, indicando ação tecido específico.

A matriz dos grãos do café arábica verde contém uma profusão de clorofila, hormônios, enzimas, lipídeos, proteínas, carboidratos e uma gama incrível de compostos bioativos (MOREIRA et al., 2005), mesmo complexo os compostos bioativos são bem caracterizados, porém suas concentrações sofrem variações conforme alguns aspectos como: forma de plantio, mês de colheita, tipos de despulpamento, secagem, principalmente a torrefação e a forma de pulverização dos grãos (ROTHFOS, 1980).

Após a obtenção dos grãos, foi padronizado o processo de segregação para a retirada de sujidades e grãos defeituosos para não interferir diretamente ou indiretamente com as atividades originais dos grãos de café. Entre os grãos selecionados uma parte foi direcionado a moagem para seguir as etapas necessárias para obtenção do extratos verde e os demais foram torrados em três diferentes níveis de torras (torra clara: 12 minutos à 230°C; média: 14 minutos à 240°C e escura: 15 minutos à 245°C). Naturalmente no processo de torrefação dos grãos de café há uma extrema modificação da composição química e a formação de novos compostos a partir dos compostos pré-existentes (ARAÚJO, 2007) e como já esperado, a perda de massa que foi proporcionalmente com o tempo e temperatura utilizada. O grão de café arábica torra clara perdeu entre 17-18% da massa total, o grão de café arábica torra média perdeu entre 20-21% da massa total e a torra escura perdeu entre 24-28% da massa total, esse resultado ficou acima das amostras de DIAS; BENASSI (2015) que obtiveram perdas em torno de 13% torra clara, 17% torra média e 20% torra escura. As torras seguiram a escala de Agtron como controle de qualidade de torra (PORTO, 2015).

Os compostos bioativos do café em grande maioria são compostos solúveis (FAN & Cols., 2000) e com a grande perda de massa causou a preferência pela moagem fina e a peneiração, assim obter um pó homogêneo e potencializar a extração dos compostos bioativos pelo aumento da superfície de contato dos grânulos de café. A solução extratora utilizada foi água quente à 90-95°C, a infusão foi realizada com 100 ml do extrator e 25 gramas de pó de café arábica (Verde e torras). O tipo de extrator e a temperatura utilizada foi extraída de alguns trabalhos que mostraram ser a melhor opção para não causar variações nos compostos do café e auxiliar na extração dos solutos solúveis (ALMEIDA; BENASSI, 2011; SANTOS et al., 2007).

O banho de gelo e o descanso por 10 minutos se fez necessário para estabilizar a temperatura, pois foi utilizado o aparelho de ultrassom para potencializar o grau de extração dos compostos solúveis das amostras, e isso gera calor que poderia causar modificações negativas para os extratos solúveis. Após a extração as amostras foram centrifugadas para retirada em sua composição dos solutos não solúveis (borra), foi utilizado o refratômetro para estabelecer o valor em graus °brix (O valor grama de compostos solúveis por 100 gramas da amostra). O valor °brix dos extratos aquosos de café arábica das amostras desse estudo foram distintos entre si e em congruência com literatura. Os valores de 10,66 °brix, 9,56 °brix, 8,56 °brix e 7,23 °brix para os extratos

aquosos de café arábica verde, torra clara, média e escura respectivamente, nas indústrias esses valores ficam em torno de 8-12°brix, revelando uma boa extração (REVISTA CAFEICULTURA, 2006).

A posterior a solução foi seca pelo processo de atomização (pulverização) através do equipamento Spray Dryer e assim obtivemos os extratos solúveis de café arábica verde e torras (Figura do café grão e pulverizados). É sabido que a percepção de cor fica dependente da subjetividade do olho humano, por essa razão, foi utilizada a escala CIELAB para melhor padronização da cor dos extratos. Os resultados colorimétricos das amostras dos extratos solúveis de café verde e torras foram distintos entre si e similar com os dados obtidos na literatura (BAUER et al., 2018; COUTO, 2017; POURFARZAD; MAHDAVIAN-MEHR; SEDAGHAT, 2013). Na escala de cores de CIELAB há três parâmetros. O parâmetro ( $L^*$ ): de luminosidade que varia de zero (preto) para cem (branco); a coordenada ( $a^*$ ): que segue do positivo (+) para o componente vermelho e negativo (-) para o componente verde; e enfim a coordenada ( $b^*$ ): segue do positivo (+) para o componente amarelo e negativo (-) para o componente azul.

Conforme a literatura os grãos perderam luminosidade ficando mais escuras, processo que ocorre naturalmente através da carbonização e outros eventos bioquímicos como reações de Maillard, degradação de compostos por Strecker e caramelização do açúcar como mencionado na literatura essas reações exotérmicas dão aos grãos de café torrado as suas características sensoriais como sabor, aroma e cor muito perceptível nas infusões (CORTEZ, 2001; DE OLIVEIRA et al., 2014; ILLY, A. & VIANI, 2005).

Entre as escalas das cores primárias (a) e (b) houve diferenças significativas entre os extratos de café arábica verde e torras como já esperado (SCHMIDT; MIGLIORANZA; PRUDENCIO, 2008).

Através da metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência foi possível identificar e quantificar alguns compostos bioativos importantes nos extratos, como o ácido clorogênico, ácido caféico e cafeína (DIAS; BENASSI, 2015)(DIAS & Cols., 2004).

Os ácidos clorogênicos (CGA) são componentes termosensível do grupo dos ácidos hidroxibenzólicos da família dos ácidos fenólicos, este importante nutracêutico entre os alimentos ocidentais estão em maior concentração nos grãos de café verde, o percentual de ácidos clorogênicos circula em torno de 3,5-7,3% de seu peso seco (DURÁN et al.,

2017). Nos extratos de café arábica analisados, os valores apresentaram decaída dos ácidos clorogênicos dependente de torra. Extrato verde com  $2,845 \pm 0,035$ g/100g; torra clara com  $1,805 \pm 0,035$ g/100g; torra média com  $1,805 \pm 0,05$ g/100g e torra escura com  $1 \pm 0,014$ g/100g (gramas do composto sobre 100 gramas de amostra).

Sobre a biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos do café alguns trabalhos como o de MOREIRA et al (2005) observaram uma absorção precoce dos CQA no estômago e o resto no intestino delgado com maior absorção no jejuno. Sendo um mecanismo de absorção e metabolização distintos para os grupos dos ácidos clorogênicos que são os ácidos 5-cafeoilquínico, feruolquímico e dicafeoilquínico.

Entretanto, estudos de STALMACH et al (2009) verificaram que um terço dos CGA são absorvidos no intestino delgado e seus isômeros 5-CQA, 4-CQA e 3-CQA podem ser analisados no plasma através da cromatografia líquida de alta performance e os outros dois terços são metabolizados pelas transferases de microbiotas intestinais formando basicamente o ácido quinico, ácido cafeico e o ácido dihidroferúlico.

Outro bioativo importante é o ácido cafêico um componente termosensível do grupo dos ácidos hidroxicinâmicos e também da família dos ácido fenólico com efeitos antioxidantes (SOARES, 2002). O café verde apresentou um quantitativo de  $0,345 \pm 0,007$ g/100g, houve um aumento significativo no extrato de café arábica torra clara de  $0,435 \pm 0,007$ g/100g, essa elevação é explicada por MANACH et al (2018) que relatou o desprendimento dos ácidos clorogênicos da matriz do café e através das reações térmicas resultando na sua quebra e a formação de mais ácidos cafeico. Porém o contínuo da torra causa o decréscimo dos ácidos cafeicos nos extratos de café arábica torra média e escura de  $0,14 \pm 0$  e  $0,06 \pm 0$  respectivamente, essa análise é refletida nos estudos de OLIVEIRA et al (2008).

A biodisponibilidade dos ácidos cafeicos são abundantes, segundo MANACH et al., (2018) os ácidos clorogênicos são menos abundantes nos alimentos, e ainda os ácidos clorogênicos provavelmente sofrem quebras por enzimas esterases no intestinos aumentando o conteúdo de ácidos cafeicos (OLIVEIRA & BASTOS, 2011). E os compostos hidroxicinâmicos então mais presentes nas variedades alimentares de origem vegetal entre eles o café (CLIFFORD, 2000).

A cafeína é um dos principais bioativos e popularmente o mais conhecido, apresenta-se contido na matriz dos grãos verdes de café arábica em torno de 0,7-1,4% do seu peso seco (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009; DIAS et al., 2005;

SMITH, 1985) esse fitoquímico está altamente associado com o aumento da performance, atividade neuromotor e atividade bioativa de efeitos antioxidante e quimiopreventivo (AGUIAR et al., 2012), entre eles o estudo de POUNIS et al (2017) verificou o efeito antiproliferativo e antimetastático da cafeína em linhagens de cancro de próstata com metástase em osso e cérebro de PC-3 e DU-145 respectivamente. A variação do percentual de cafeína entre os extratos foram ínfimas, pois esse alcaloide é termorresistente (KY et al., 2001; SAMPAIO, 2017), porém observou-se um efeito similar ao ácido cafeico, no qual houve um aumento nos extratos de café arábica torra clara ( $1,805 \pm 0,35 \text{g}/100\text{g}$ ) comparada com o extrato de café arábica verde ( $1,425 \pm 0,035 \text{g}/100\text{g}$ ) e uma diminuição dependente de torra ( $1,385 \pm 0,007 \text{g}/100\text{g}$  na torra média e  $1 \pm 0,014 \text{g}/100\text{g}$  na torra escura), a explicação seria a quebra dos compostos na torrefação branda e melhor sensibilidade na análise por HPLC, já nos extratos de café arábica torra média e escura não há uma degradação da cafeína, mas perda da matriz da massa do grão de café no processo de torrefação.

Outra metodologia importante que foi utilizada foi a quantificação de compostos fenólicos totais pelo ensaio de Folin Ciocalteu. Nessa análise demonstra uma sensibilidade de maior concentração de fenólicos totais no extrato de café arábico verde perante os outros extratos de café arábico, a explicação seria a quebra de dímeros de ácidos clorogênicos pela torrefação branda da torra clara e melhor atividade, já o contínuo da torrefação causa nesses compostos uma degradação térmica dos bioativos (ARAÚJO, 2007; PRIFTIS et al., 2018).

A presença e quantidade dos compostos bioativos foram realizados, porém foi preciso verificar se as suas atividades estavam ativas, assim para determinar as atividades antioxidantes dos compostos bioativos dos extratos de café verde e torras, foram utilizados quatro tipos de análises, sendo uma direta e três indiretas, as análises mais sensíveis foram duas indiretas a DPPH e ABTS, seguidos do ORAC e FRAP. Todas os extratos apresentaram atividade dependente de concentração. As análises de ABTS e FRAP foram semelhantes entre si e reflete melhor os dados da análise de fenólicos totais, que ganha peso no trabalho de MOREIRA et al., (2005), que correlaciona os ácidos clorogênicos com maior atividade de FRAP.

O DPPH não reage com flavonoides e eles são abundantes em extratos de café verde segundo VIEIRA; CORNÉLIO; SALGADO (2006), já trabalhos de NASCIMENTO, (2006) e VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI (2011) os flavonoides são

compostos termossensíveis, sendo facilmente degradado mesmo em torras mais brandas como visto por SANTOS et al., (2007). O processo de torra degrada os compostos fenólicos e diminui a atividade antioxidante (ABRAHÃO et al., 2010, 2012).

Um número significativo na literatura indica que o café reduz o risco de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Entre eles a redução do câncer de mama (NKONDJOCK, 2009), endometrial (SHIMAZU et al., 2008), de cólon (GUERCIO et al., 2015), câncer de fígado, rim e bexiga. Trabalho de AMIGO-BENAVENT et al (2017) relataram que os extratos de café arábica verde incubados em linhagens de células cancerígenas apresentaram diminuições significativas na proliferação de cólon (Caco-2), diminuição da viabilidade de câncer no esôfago (OE-33), diminuição da viabilidade da bexiga urinária (T24) e não apresentou efeito na viabilidade e proliferação de linhagem de célula não cancerígenas de fibroblasto de cólon (CCD-18Co).

Os dados anteriores foram de extrema importância para determinar as sequências das próximas análises de incubação dos extratos de café. O café é uma bebida de maior consumo entre os homens (59,5%) (ARRUDA et al., 2009) e entre os cânceres acometidos apenas em homens com o maior incidência e prevalência de mortes segundo o INCA (2018) é o câncer de próstata. Logo, no presente trabalho foi usado como modelo experimental duas linhagens de adenocarcinoma de próstata, uma menos agressiva com metástase em osso (PC-3) e outra mais agressiva com metástase em cérebro (DU-145).

Estudos prévios apontam o efeito inibitório da cafeína na adesão, motilidade (metástase), proliferação e a modulação do ciclo de células cancerígenas de próstata DU-145 e PC-3 (POUNIS et al., 2017).

Baseados nesses dados o presente trabalho iniciou as incubações nas concentrações entre 0-10.000 µg/mL refletido nas análises de BAUER et al (2018) para o ensaio de MTT. O percentual de inibição relativo ao controle do ensaio de MTT das células de PC-3 apresentaram resultados significativas em baixas concentrações (78,125 µg/mL) nos extratos solúveis de café verde e torra clara, sendo mais significativas nas doses de 5.000 e 10.000 µg/mL. Os extratos solúveis de café arábica torra média e escura nas concentrações finais revelaram melhores efeitos, porém de menor valor comparados com os extratos de café verde e torra clara.

Na linhagem de DU-145 não foram verificados resultados significativos, mesmos em altas concentrações. BAUER et al., (2018) relataram que a linhagem de DU-145 incubadas com café robusta em concentrações de 0-5.000 µg/mL apresentaram atividades de EC<sub>50</sub> de inibição de viabilidade, sendo o maior efeito em 500 µg/mL e mantendo estável o efeito mesmo aumentando as concentrações.

Os dados literários refletem com os achados, no qual o café possui em sua estrutura compostos quimio-preventivos (HAN & Cols, 2016), mas pesquisas orquestradas pela EMBRAPA (2004) verificou que o café arábica apresenta menos compostos quimio-preventivos comparado com o café robusta, corroborando a ação do robusta e a não ação do arábica perante a linhagem da DU-145.

AMIGO-BENAVENT et al., (2017) incubaram extratos de café arábica verdes e chá verde em quatro linhagens células tumorais, os principais bioativos desses extratos foram os ácidos clorogênicos em que em seus efeitos não aumentam a proliferação de células cancerígenas, afetando negativamente a viabilidade celular e a proliferação de forma dose-dependente.

A partir dos dados obtidos nos resultados de sobrevivência pelo MTT, foram padronizados para os testes de ciclo e apoptose da linhagem da PC-3 as concentrações de 5.000 e 10.000 µg/mL dos extratos de café arábica verde e torras, porém não houve o contínuo com a linhagem da DU-145 por causa da insignificância em seus resultados.

Entre as características marcantes que diferencia as células normais das células tumorais estar a proliferação exacerbada, as enzimas envolvidas nas principais etapas do controle e desaceleração do crescimento do número de células tem suas funções prejudicadas ou silenciadas. As reações antioxidante estaria relacionadas com o aumento da atividade e expressão de enzimas antioxidantes como glutathione sintase em células tumorais pulmonares e cutâneas, suprimindo sinais celulares NF-κB, AP-1 e MAPK que estão envolvidos na sobrevivência e proliferação (FENG et al., 2005).

Os extratos solúveis de café arábica verde e torra clara apresentaram em sua composição substâncias que modularam o ciclo celular das células da PC-3 comparadas com o controle, e tudo indica que essas substâncias foram degradadas ou inativadas nos extratos solúveis de café arábica torra média e escura. Estudos conduzidos por MURAD et al (2015) a isomerização e/ou hidrólise do 5-CQA formam compostos intermediários que já teria uma capacidade de modular o ciclo celular.

Os dados do presente trabalho indicariam que as substâncias contidas na matriz dos extratos de café arábica verde e torra clara induz ações antiproliferativa da linhagem PC-3 e essas substâncias seriam degradadas em torras mais intensas. MICCADEI et al (2008) observaram redução da viabilidade celular e a indução de apoptose em células tumorais após tratamento com ácidos hidroxicinâmicos como o ácido cafeico.

Em fim criou-se uma pergunta, poderia essa efeito antiproliferativo uma indução para a morte celular programada ou apenas morte celular (necrose)?. Como resposta foram feitas análises de apoptose por Anexina V FITC e Iodeto de propídio (PI), em teoria as células quando estão ativando sinais de apoptose inicial a mesma externaliza um lipídeo de membrana a fosfatidilserina como marcador e anexina V se liga a esse marcador, quando a apoptose entra em um estágio tardio há uma ruptura do núcleo e o iodeto de propídeo consegue intercalar com o material genético (LASSUS et al., 1998).

Esses marcadores são detectados pelo aparelho de citometria de fluxo e expresso em quatro quadrantes (HINGORANI et al., 2011).

No quadrante inferior esquerdo reflete as células viáveis, no quadrante superior esquerdo representa as células em estado de necrose, o quadrante inferior direito refletem as células em necrose inicial porque estão apresentando a externalização do marcador fosfatidilserina e por fim o quadrante superior direito no qual demonstra de maneira quantitativa e qualitativa as células em estado de apoptose, esses dados estimula a busca de equipamentos de biologia molecular para entender quais pequenas moléculas regulam essas atividades

No ensaio de apoptose as células de adenocarcinoma com metástase em osso (PC-3) foram incubadas com os extratos solúveis de café verde e torras, seus efeitos mostraram uma modificação da população de células, os extratos de café verde e torras diminuíram as células do quadrante inferior esquerdo e aumentaram no quadrante superior á direita, porém esses efeitos foram diminuindo dependendo do aumento da torra do extrato, sendo a torra escura sem diferenças significante comparada ao controle. Esses resultados podem está diretamente relacionado com a produção de compostos monoméricos de ácidos clorogênicos e ácido caféico que modulam as atividades epigenética da célula aumentando a metilação do DNA e silenciando alguns genes envolvidos na proliferação (ESTELLER; HERMAN, 2002; JONES; BAYLIN; KIMMEL, 2002; JONES; TAKAI, 2001; ZHOU; ZHOU, 2012).

Entre os dados dos efeitos dos extratos de café analisados na literatura e nos resultados obtidos desse estudo, fica evidente que o café torra clara apresenta-se como uma excelente estratégia no combate seletivo do câncer comparadas com as outras torras, porém, é importante ressaltar que seu gosto adstringente engendra um efeito negativo em suas características sensoriais como aroma, gosto e cor. Um estudo conduzido pela ABIC verificou que o consumo do café estava mais associado a hábitos sociais e o seu gosto era uma mera consequência desse hábito (ABIC, 2006), em outro estudo foram verificado que o perfil dos quem não tomam café estão associados em torno de 43% por restrições médicas e a falta de hábito. O Brasil é o maior produtor e exportador de grãos verdes de café, e está entre os maiores consumidores de café torra escura. Alguns autores tem mencionado que esse hábito tem sido impostos pelos empresas, no qual está fortemente relacionado com a preferência da produção de extratos de café com torrefação mais excessiva, assim servindo de uma estratégia de camuflar a percepção de defeitos e detritos como pedaços de galhos e alguns artrópodes (COUTO, 2017; SCHMIDT; MIGLIORANZA; PRUDENCIO, 2008).

Como mencionado no início da discussão os grãos de café sofrem modulações de concentrações de seus compostos em sua matriz por várias interferências, entre elas: regiões de plantações, estações de colheitas, fatores genéticos, ambientais, nutricionais, manejo da lavoura, colheita, preparo (PIMENTA, 2001; ROTHFOS, 1980). Logo, se faz necessário um aperfeiçoamento e estudos mais aprofundados dessas variações para a busca de estratégias que amenize prejuízos de qualidade da bebida.

Mesmo com a presença de acrilamida na sua composição, o consumo do café solúvel de grãos torrados possui fortes efeitos na prevenção e tratamento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) entre eles o câncer, doenças cardiovasculares, parkinson, Alzheimer entre outros (PASA et al., 2016). Vários estudos não mostraram efeitos nocivos a saúde humana pelo consumo de café e alguns trabalhos epidemiológicos demonstraram efeitos significativos entre 3-4 copos diários de café no combate as DCNT (GUERCIO et al., 2015). Estudos de biodisponibilidade revela uma alta absorção e uma alta permanência da cafeína na corrente sanguínea, uma suposta absorbância por transporte passivo de monômeros de ácidos clorogênicos e uma absorbância por transporte ativo de ácido cafeico no colon (OLIVEIRA & BASTOS, 2011).

No presente trabalho em congruência aos estudos publicados na literatura científica, deixa claro que os extratos solúveis de café protege o organismo vivo pelos seus diversos efeitos, entre eles, atividade antioxidante e o aumento da atividade enzimática da glutathione sintase (EFFERTH et al., 1995; PRIFTIS et al., 2018), efeito antiproliferativo de células cancerígenas, regulação da atividade biológica em seu mecanismo de expressão gênica associada a promoção da morte celular programada (apoptose), modulação do ciclo celular e aumento atividade pró-apoptótica como a via das caspases, bax e p53 (HE et al., 2003). Os compostos bioativos desse grão são altamente classificados, porém há milhares de outros compostos que ainda não foram identificados (EMBRAPA, 2004). É importante ressaltar que além desse mais estudos são necessários.

## 7. Conclusão

- O processo padrão de torrefação causou modificações profundas da matriz química dos grãos de café, contudo, a torra mais branda levou a uma quebra dos compostos bioativos sem causar grandes degradações e o contínuo de torra levou a uma degradação desses compostos. Assim os principais compostos bioativos do café como os ácidos clorogênicos, ácido cafeico e a cafeína apresentaram em maior quantidade no café verde e torra clara e isso refletiu nos testes antioxidantes;
- As etapas de moagem, uso de água quente (90-95°C) e ultrassom foram essenciais para uma maior extração dos compostos bioativos dos grãos verde e torrados do café do presente estudo;
- Todos os extratos reduziram a viabilidade na linhagem menos agressiva de adenocarcinoma com metástase em osso (PC-3) comparada ao seu controle. Entretanto, resultados mais significantes foram em extratos de café arábica verde e torra clara;
- Todos os extratos não apresentaram resultados significativos na redução da viabilidade na linhagem de aspecto mais agressivo de adenocarcinoma de próstata com metástase em cérebro (DU-145) comparada ao seu controle;
- Os extratos de café arábica verde e torra clara modularam o ciclo celular da linhagem de PC-3, porém a torra média e torra escura com resultados insignificantes;
- Os extratos de café arábica verde e torra clara induziram a morte celular programada da linhagem de PC-3, porém a torra média e torra escura apresentaram resultados insignificantes;

Em suma, os dados obtidos no presente trabalho foram evidentes que na matriz dos grãos verdes no café arábica apresentaram compostos com maiores efeitos antiproliferativo e moduladores de vias celulares que os grãos torrados. O processo padrão de torrefação dependente de tempo e temperatura causa degradação de muitos compostos bioativos que modulam os efeitos celulares.

Estes e outros trabalhos de base são fundamentais para auxiliar em estratégias futuras em modelos celulares, animais e clínicos, para a compreensão mais detalhada das propriedades funcionais em alegações em saúde do café. O uso de metodologias em biologia molecular é uma ótima opção para elucidar os mecanismos bioquímicos de ação dos extratos de café e assim compreender melhor a influência nas escolhas de dieta para a prevenção e uma possível ação no tratamento de doenças crônicas não transmissíveis. O presente trabalho buscou ampliar a variedade de estratégia ao combate

do câncer de próstata e ainda oferecer uma melhor suplementação nutricional ao paciente, porém é de extrema importância mais estudo sobre o tema abordado.

## 8. Referências

- ABIC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ. Disponível em: <[www.abic.com.br/arquivos/pesquisas/pesq\\_tendencias\\_consumo\\_nov06.pdf](http://www.abic.com.br/arquivos/pesquisas/pesq_tendencias_consumo_nov06.pdf)>.
- ABRAHÃO, S. A. et al. (2010) COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE DO CAFÉ (*Coffea arabica* L.). *Agriculture*, p. 414–420.
- ABRAHÃO, S. A. et al. (2012) Atividade antioxidante in vitro e in vivo de café bebida mole. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 47, n. 1, p. 127–133.
- AGUIAR, R. A. et al. (2012) EFEITO DA INGESTÃO DE CAFEÍNA EM DIFERENTES TAREFAS DE TEMPO DE REAÇÃO. *Rev. Bras. Ciênc. Esporte*, Florianópolis, p. 465–476.
- ALESSANDRA, J. et al. (2014) Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. *FRIN*, v. 61, p. 279–285.
- ALMEIDA, M. B.; BENASSI, M. D. T. (2011) Atividade antioxidante e estimativa do teor de melanoidinas em cafés torrados comerciais Antioxidant activity and estimation of melanoidin content in commercial roasted coffee. p. 1893–1900.
- ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. (2009) Benefícios do café na saúde: Mito ou realidade? *Quimica Nova*, v. 32, n. 8, p. 2169–2180.
- AMIGO-BENAVENT, M. et al. (2017) Antiproliferative and cytotoxic effects of green coffee and yerba mate extracts, their main hydroxycinnamic acids, methylxanthine and metabolites in different human cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, v. 106, p. 125–138.
- ANWAR, S. et al. (2018) Trigonelline inhibits intestinal microbial metabolism of choline and its associated cardiovascular risk. v. 159, p. 100–112.
- ARAÚJO, F. A. (2007) Café (*Coffea arabica*, L.) submetido a diferentes condições de torrefação: caracterização química e avaliação da atividade antioxidante e sensorial. p. 138.
- ARRUDA, A. C. et al. (2009) Justificativas e motivações do consumo e não consumo de café. v. 29, n. 4, p. 754–763.
- ARRUDA, A. C.; FERREIRA, M. A. M.; MINIM, C. P. R. (2007) Perfil dos consumidores de café da cidade de viçosa/mg: um estudo exploratório. SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL.
- BAGCHI, D.; MORIYAMA, H.; SWAROOP, A. (2017) Green Coffee Bean Extract in Human Health.
- BAUER, D. et al. (2018) Effect of Roasting Levels and Drying Process of *Coffea canephora* on the Quality of Bioactive Compounds and Cytotoxicity.
- BBC NEWS. Café vendido na Califórnia deve conter um alerta sobre o risco potencial de causar câncer - BBC News World. Disponível em: <<https://www.bbc.com/mundo/noticias-43598078>>. Acesso em: 21 fev. 2019.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. *Food Chemistry*. 4th. ed. 2009.
- BELŠC, A.; HORZ, D. (2011) Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *imovic*. v. 129, p. 991–1000.
- BENGIS, R. O.; ANDERSON, R. J. *Chemistry*. 1932.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. v. 76, p. 70–76.
- BEZZAN, L.; DULGHEROFF, P. (2016) Manual métodos de preparo de café. In: *sebrae. vitória espírito santo (BR)*: v. 134p. 635–646.
- BOSIRE, C. et al. (2013) Coffee consumption and the risk of overall and fatal prostate

cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer Causes and Control*, v. 24, n. 8, p. 1527–1534.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, v. 30, p. 25–30.

BUDRY, G.; ZACZYNSKA, D.; ORACZ, J. (2016) Effect of addition of green coffee extract and nanoencapsulated chlorogenic acids on aroma of different food products. v. 73, p. 8, 19 jun.

BUDRYN, E.; NEBESNY, G. (2003) Antioxidative activity of green and roasted coffee beans as influenced by convection and microwave roasting methods and content of certain compounds. p. 157–163, 25 abr.

CAFÉ POINT. Diferenças entre via úmida e seca | Técnicas de Produção | CaféPoint. Disponível em: <<https://www.cafepoint.com.br/noticias/tecnicas-de-producao/diferencas-entre-via-umida-e-seca-209342/>>. Acesso em: 2 mar. 2019.

CAIXETA, E. T.; PESTANA, K. N.; PESTANA, N. (2015) MELHORAMENTO DO CAFEIRO: ÊNFASE NA APLICAÇÃO DOS MARCADORES MOLECULARES. In: *Tópicos Especiais em Produção Vegetal V*. p. 154–179.

CAMARGO, A. P.; SANTIAGO, R.; CORTEZ, J. G. (1992) Aptidão climática para qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de arábica no Brasil. *CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIRAS. MAA/PROCAFÉ*, p. 70–74, 1992.

CANO-MARQUINA, A.; TARÍN, J. J. (2013) CANO, A. The impact of coffee on health. v. 75, n. 1, p. 7–21, maio.

CAO, G.; ALESSIO, M.; CUTLER, R. G. (1993) OXYGEN-RADICAL ABSORBANCE CAPACITY ASSAY FOR ANTIOXIDANTS. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 14, p. 303–311.

CASTRO, I. M. DE; MELLO, J. S. R. DE. (2002) Determinação de Metil Xantinas em Alimentos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. v. 55, p. 9–12.

CECAFÉ. Produção – Cecafé. Disponível em: <<https://www.cecafe.com.br/sobre-o-cafe/producao/>>. Acesso em: 21 fev. 2019.

CLIFFORD, M. N. (2000) Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. v. 1043, p. 1033–1043.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. (1991) Phenols and Caffeine in Wet-Processed Coffee Beans and Coffee Pulp. *Food Chemistry*, v. 40, p. 35–42.

CORREIA, A. M. N. G.; LEITTIO, M. C. A.; CLIFFORD, M. N. (1995) Caffeoyl-tyrosine and Angol II as characteristic markers for Angolan robusta coffees elsewhere. v. 53, p. 309–313.

CORTEZ, J. G. (2001) EFEITO DE ESPÉCIES CULTIVARES E DO PROCESSAMENTO AGRÍCOLA E INDUSTRIAL NAS CARACTERÍSTICAS DA BEBIDA DO CAFÉ.

COUTO, C. DE C. (2017) OBTENÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DE CAFÉS ARABICA E ROBUSTA EM BLENDS DE CAFÉ. v. 106, n. 11, p. 1323–1330.

CRUZ, R. et al. (2015) Revalorization of spent coffee residues by a direct agronomic approach. *FRIN*, v. 73, p. 190–196.

DAGLIA, M. et al. (2002) In Vitro Antioxidant and ex Vivo Protective Activities of Green and Roasted Coffee. v. 48, n. 5, p. 1449–1454.

DALL'LGNA, O. P. et al. (2003) Neuroprotection by caffeine and adenosine A<sub>2A</sub> receptor blockade of b-amyloid neurotoxicity. *British Journal of Pharmacology*, n. 138, p. 1207–1209.

DE OLIVEIRA, G. H. H. et al. (2014) Caracterização física de café após torrefação e

moagem. v. 35, n. 4, p. 1813–1827.

DIAS, F. P. et al. (2005) Caracterização de progênies de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) selecionadas em Minas Gerais: I - caracteres relacionados ao crescimento vegetativo. p. 73–83.

DIAS, R.; BENASSI, M. (2015) Discrimination between Arabica and Robusta Coffees Using Hydrosoluble Compounds: Is the Efficiency of the Parameters Dependent on the Roast Degree? v. 1, n. 3, p. 127–139.

DISCACCIATI, A. et al. (2013) Coffee consumption and risk of localized, advanced and fatal prostate cancer: A population-based prospective study. v. 24, n. 7, p. 1912–1918.

DOMENE, S. M. Á. Técnica Dietética teoria e aplicações. In: Guanabara Koogan.. p. 187–190 2009.

DUCAN, B. B. et al. (2012) Transmissíveis no Brasil : prioridade para enfrentamento e investigação. v. 46, p. 126–134, 27 nov.

DURÁN, C. A. A. et al. (2017) Café: Aspectos Gerais e seu Aproveitamento para além da Bebida. v. 9, n. 1, p. 107–134.

EFFERTH, T. et al. (1995) Expression of apoptosis-related oncoproteins and modulation of apoptosis by caffeine in human leukemic cells. p. 648–656.

EFSA. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). Scientific Opinion on acrylamide in food. EFSA Journal, v. 13, n. 6, p. 4104, 2015.

EMBRAPA. (2004) Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia. p. 21.

EMBRAPA. Cafés do Brasil batem recorde de produtividade em 2016 - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/17220176/cafes-do-brasil-batem-recorde-de-productividade-em-2016>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

EMBRAPA. Consumo mundial de café atinge 165 milhões de sacas no ano cafeeiro 2018-2019 - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/40814481/consumo-mundial-de-cafe-atinge-165-milhoes-de-sacas-no-ano-cafeeiro-2018-2019>>. Acesso em: 21 fev. 2019.

ESTELLER, M.; HERMAN, J. G. (2002) Cancer as an epigenetic disease : DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. p. 1–7.

FAO. Health Implications of Acrylamide in Food. International Journal of Food Microbiology, v. 90, n. 1, p. 116–117, 2004.

FARAH, A. et al. (2005) Effect of Roasting on the Formation of Chlorogenic Acid Lactones in Coffee. p. 1505–1513.

FARAH, A. (2009) Coffee as a speciality and functional beverage.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. (2006) Phenolic compounds in coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology, v. 18, n. 1, p. 23–36.

FENG, R. et al. (2005) Inhibition of Activator Protein-1 , NF-  $\kappa$  B , and MAPKs and Induction of Phase 2 Detoxifying Enzyme Activity by Chlorogenic Acid\*. v. 280, n. 30, p. 27888–27895.

FERNANDEZ-GOMEZ, B. et al. (2016) Coffee silverskin extract improves glucose-stimulated insulin secretion and protects against streptozotocin-induced damage in pancreatic INS-1E beta cells.

FERREIRA, L. TADEU; SANTOS, J.; AIACHE, E. Exportação dos Cafés do Brasil gera US\$ 3,3 bilhões na balança comercial no período de janeiro a agosto deste ano. Disponível em: <<http://www.consorcioquesacas.com.br/index.php/imprensa/noticias/822-2017-09-21-11-17-18>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

- FOR, R.; DRINKING, N. O. T. (2006) PERFIL DE NÃO CONSUMIDORES DE CAFÉ. n. Tabela 1, p. 1–4.
- FRANCA, A. S.; OLIVEIRA, L. S.; FERREIRA, M. E. (2009) Kinetics and equilibrium studies of methylene blue adsorption by spent coffee grounds. *DES*, v. 249, n. 1, p. 267–272.
- GAASCHT, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. (2015) Coffee provides a natural multitarget pharmacopeia against the hallmarks of cancer.
- GLEI, M. et al. (2009) Bread Enriched With Green Coffee Extract Has Chemoprotective and Antigenotoxic Activities in Human Cells Bread Enriched With Green Coffee Extract Has Chemoprotective and Antigenotoxic Activities in Human Cells. p. 37–41.
- GODINHO, R. P.; VILERA, E. R.; OLIVEIRA, G. A. (1998) Deterioração pós-colheita do café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS. MAA/PROCAFÉ, p. 128–129.
- GONÇALVES, É. C. B. DE A. *Análise de Alimentos - Uma Visão Química da Nutrição*. 4. ed. Rio de Janeiro: 2015.
- GUERCIO, B. J. et al. Coffee Intake , Recurrence , and Mortality in Stage III Colon Cancer : Results From CALGB 89803 ( Alliance ). 2015.
- GUNTER, M. J. et al. (2011) A prospective investigation of coffee drinking and endometrial cancer incidence. p. 1–7.
- HALAL, S. L. EL. (2008) *Composição , Processamento E Qualidade Do Café*. [s.l.] Universidade Federal de Pelotas.
- HASHIBE, M. et al. (2015) Coffee, tea, caffeine intake, and the risk of cancer in the PLCO cohort. v. 113, n. 5, p. 809–816, 2015.
- HE, Z. et al. (2003) Induction of Apoptosis by Caffeine Is Mediated by the p53, Bax, and. n. 24, p. 4396–4401.
- HERRAIZ, T.; CHAPARRO, C. (2006) Human monoamine oxidase enzyme inhibition by coffee and h -carbolines norharman and harman isolated from coffee. v. 78, p. 795–802.
- HINGORANI, R. et al. Detection of Apoptosis Using the BD Annexin V FITC Assay on the BD FACSVerser™ System. n. August, 2011.
- IBGE. *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009*.
- ILLY, A. & VIANI, R. *Espresso Coffee: the Science of Quality*. Elsevier A ed. London: 2005.
- INCA. Câncer de próstata | INCA - Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>. Acesso em: 21 fev. 2019.
- IVAMOTO, S. T. et al. (2017) Diterpenes biochemical profile and transcriptional analysis of cytochrome P450s genes in leaves, roots, flowers, and during Coffea arabica L. fruit development. v. 111, p. 340–347, fev.
- JÁCOME, M. A. A. (2006) ESTUDO DO EFEITO DO CONSUMO AGUDO DE CAFÉ VERDE, REGULAR E DESCAFEINADO NO PERFIL BIOQUÍMICO EM INDIVÍDUOS JOVENS.
- JOËT, T. et al. (2010) Influence of environmental factors , wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. v. 118, n. 3, p. 693–701.
- JONES, P. A.; BAYLIN, S. B.; KIMMEL, S. (2002) THE FUNDAMENTAL ROLE OF. v. 3.
- JONES, P. A.; TAKAI, D. (2001) The Role of DNA Methylation Mammalian Epigenetics. v. 293, n. 5532, p. 1068–1070.

- JUNG, S. et al. (2017) Cellular Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Coffee Extracts with Different Roasting Levels. v. 20, n. 6, p. 1–10.
- KIM, J. Y.; JUNG, K. S.; JEONG, H. G. (2004) Suppressive effects of the kahweol and cafestol on cyclooxygenase-2 expression in macrophages. v. 569, n. 1–3, p. 321–326.
- KOLBERG, M. et al. NU SC. The Journal of Nutritional Biochemistry, p. 39, 2015.
- KONOPKA, K. et al. (1996) Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. v. 1312, n. 3, p. 186–196.
- KURZROCK, T.; SPEER, K. (2001) Identification of kahweol fatty acid esters in Arabica coffee by means of LC/MS. v. 24, n. 10–11, p. 843–848.
- KY, C. et al. (2001) Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. v. 75, p. 223–230.
- LAM, L. K.; SPARNINS, V. L.; WATTENBERG, L. W. (1982) Isolation and identification of kahweol palmitate and cafestol palmitate as active constituents of green coffee beans that enhance glutathione S-transferase activity in the mouse. v. 42, n. 4, p. 1193–8.
- LASSUS, P. et al. (1998) Detection and quantification of apoptosis in transiently transfected adherent cells. v. 26, n. 22, p. 5233–5234.
- LEE, W. J.; ZHU, B. T. (2006) Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. v. 27, n. 2, p. 269–277.
- LI, X. J. et al. (2013) Coffee Consumption and Risk of Breast Cancer: An Up-To-Date Meta-Analysis. v. 8, n. 1.
- LUDWIG, I. A. et al. (2014) Coffee: biochemistry and potential impact on health - Review Article. v. 5, p. 1633–1978.
- MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability 1,2. n. February, 2018.
- MARCELO, F.; BEZERRA, R.; HARTMANN, M. L. Acompanhamento da safra brasileira. 2019.
- MARTINS, A. L. Abic história do café. 2018.
- MCCRANIE, K. D. et al. <No Title>. Journal of Strategic Studies, v. 34, n. 2, p. 281–293, 2011.
- MENDONÇA, L. et al. (2007) SUSCETÍVEIS E RESISTENTES À Hemileia vastatrix Berg et Br. p. 413–419.
- MENG, S. et al. (2013) Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism.
- MERRITT, M. A. et al. (2014) Dairy food and nutrient intake in different life periods in relation to risk of ovarian cancer. v. 25, n. 7, p. 795–808.
- MICCADEI, S. et al. (2008) Antioxidative and Apoptotic Properties of Polyphenolic Extracts from Edible Part of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) on Cultured Rat Hepatocytes and on Human Hepatoma Cells. p. 37–41.
- MILLER, N. J. et al. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. v. 412, p. 407–412.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E A. Café no Brasil — Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>>. Acesso em: 12 fev. 2019.
- MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. (2005) Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. v. 28, n. 4, p. 637–641.

- MORAIS, S. A. L. et al. Artigo. *Quim. Nova*, v. 32, n. 2, p. 327–331, 2009.
- MOREIRA, D. P. et al. Contribution of Chlorogenic Acids to the Iron-Reducing Activity of Coffee Beverages. *J. Agric. Food Chem*, p. 1399–1402, 2 jan. 2005.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. v. 65, p. 55–63, 1983.
- MURAD, L. D. et al. Effects of Caffeic and 5-Caffeoylquinic Acids on Cell Viability and Cellular Uptake in Human Colon Adenocarcinoma Cells Effects of Caffeic and 5-Caffeoylquinic Acids on Cell Viability and Cellular Uptake in Human Colon Adenocarcinoma Cells. *Nutrition and Cancer*, n. April, p. 37–41, 24 mar. 2015.
- NASCIMENTO, P. M. ANTIOXIDANTE E POTENCIAL ODORÍFICO DE UM. UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA INSTITUTO DE QUÍMICA Programa de Pós-Graduação em Química, 2006.
- NAVEED, M. et al. Biomedicine & Pharmacotherapy Chlorogenic acid ( CGA ): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 97, n. October 2017, p. 67–74, 2018.
- NKONDJOCK, A. Coffee consumption and the risk of cancer : An overview. *Cancer Letters*, v. 277, n. 2, p. 121–125, 2009.
- NOGUEIRA, M.; TRUGO, L. C. DE CAFEÍNA E TRIGONELINA EM CAFÉS SOLÚVEIS BRASILEIROS 1. *296 Ciênc. Tecnol. Aliment*, v. 23, n. 2, p. 296–299, 2003.
- OLIVEIRA, DANIELA MOURA & BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quim. Nova*, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.
- OLIVEIRA, G. S. DE et al. Análise de compostos bioativos , grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica ( *Coffea arabica* ) do cerrado e de seus grãos defeituosos ( PVA ) submetidos a diferentes torras. v. 2008, n. 002568, p. 198–207, 2008.
- PASA, D. et al. ALIMENTAÇÃO E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS EM IDOSOS PARTICIPANTES DE UM GRUPO DE TERCEIRA IDADE. *Revista INIABEU*, v. 9, n. 23, p. 111–125, 2016.
- PERRONE, D.; DONANGELO, C. M.; FARAH, A. Fast simultaneous analysis of caffeine , trigonelline , nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography – mass spectrometry. v. 110, p. 1030–1035, 2008.
- PHIMSEN, S. et al. (2016) Oil extracted from spent coffee grounds for bio-hydrotreated diesel production. v. 126, p. 1028–1036.
- PIMENTA. C. J. (2001) ÉPOCA DE COLHEITA E TEMPO DE DOS FRUTOS À ESPERA DA SECAGEM , NA QUALIDADE DO L.).
- PLEISSNER, D. et al. (2016) Bioresource Technology Fermentative lactic acid production from coffee pulp hydrolysate using *Bacillus coagulans* at laboratory and pilot scales. v. 218, p. 167–173.
- POOPATHI, S.; MANI, C.; AEGYPTI, A. A. (2015) Use of Coffee Husk Waste for

Production of Biopesticides for Mosquito Control.

PORTO, A. C. V. (2015) Utilização Da Asparaginase Na Prevenção Da Formação De Acrilamida Em Café. p. 61.

POUNIS, G. et al. (2017) Reduction by coffee consumption of prostate cancer risk: Evidence from the Moli-sani cohort and cellular models. v. 141, n. 1, p. 72–82.

POURFARZAD, A.; MAHDAVIAN-MEHR, H.; SEDAGHAT, N. (2013) Coffee silverskin as a source of dietary fiber in bread-making: Optimization of chemical treatment using response surface methodology. v. 50, n. 2, p. 599–606.

PRIFTIS, A. et al. (2018) Roasted and green coffee extracts show antioxidant and cytotoxic activity in myoblast and endothelial cell lines in a cell specific manner. v. 114, n. January, p. 119–127.

PRIOR, R. et al. (2003) Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. p. 0–6.

RAMALAKSHMI, K.; RAGHAVAN, B. (1999) Critical Reviews in Food Science and Nutrition Caffeine in Coffee: Its Removal. Why and How? Caffeine in Coffee: Its Removal. Why and How?, p. 37–41.

RE, R. et al. (1999) ANTIOXIDANT ACTIVITY APPLYING AN IMPROVED ABTS RADICAL. v. 26, n. 98, p. 1231–1237.

REVISTA CAFEICULTURA, R. Como é o Processamento do Café Solúvel. Disponível em: <[revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=ler&mat=5937](http://revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=ler&mat=5937)>.

RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effects of fruit and vegetables. American Journal of Clinical Nutrition, p. 559S–569S, 2003.

RIVELLI, D. P. et al. (2007) Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH· reduction. v. 43.

ROCHA, N. et al. (2012) Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits. p. 263–270.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. (2005) Food Chemistry Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. v. 92, p. 235–254.

ROMERO, N. G. (2007) Extração de compostos fenólicos a partir de café e sua caracterização química e funcional. p. 129.

ROOS, B. et al. (1997) Levels of Cafestol, Kahweol, and Related Diterpenoids in Wild Species of the Coffee Plant *Coffea*. v. 45, n. 8, p. 3065–3069.

ROTHFOS, B. Coffee Production. EUA: 1980.

RUFINO, M. S. M. et al. (2007) Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS+. p. 0–3.

RUSTAN, A. C. et al. (1997) Effect of coffee lipids (cafestol and kahweol) on regulation of cholesterol metabolism in HepG2 cells. v. 17, n. 10, p. 2140–9.

SALDAÑA, M. D. A.; MAZZAFERA, P.; MOHAMED, R. S. (1997) EXTRAÇÃO DOS ALCALÓIDES: CAFEÍNA E TRIGONELINA DOS GRÃOS DE CAFÉ COM C SUPERCRÍTICO. v. 17, n. 4, p. 371–376.

SAMPAIO, A. et al. SC. LWT - Food Science and Technology, p. 31, 2013.

SAMPAIO, U. M. (2017) CEREAL MATINAL EXTRUSADO À BASE DE ARROZ COM ADIÇÃO DE CAFÉ TORRADO E MICRONIZADO E EXTRATO DE CAFÉ CRIOCONCENTRADO.

SANTOS, M. H. DOS et al. (2007) INFLUENCE OF PROCESSING AND ROASTING ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF COFFEE (*Coffea arabica*). v. 30, n. 3, p. 604–610.

- SARAIVA, S. H. et al. (2009) COMPARAÇÃO DOS TIPOS DE PROCESSAMENTO PÓS-COLHEITA DO CAFÉ ARÁBICA QUANTO À QUALIDADE DO PRODUTO FINAL.
- SCHMIDT, C. A. P.; MIGLIORANZA, E.; PRUDENCIO, S. H. (2008) Influence of roasting and milling on consumers coffee preference at Parana west-Brazil. v. 38, n. 4, p. 1111–1117.
- SCHOLZ, M. B. S. et al. (2011) Características físico-químicas de grãos verdes. p. 245–255.
- SHAFIQUE, K. (2012) Analysis of the incidence and patient survival for prostate cancer in the West of Scotland.
- SHATERI, Z.; DJAFARIAN, K. (2016) Coffee Consumption and Coronary Heart Disease, v. 02, n. 01.
- SHIMAZU, T. et al. (2008) Coffee consumption and risk of endometrial cancer: A prospective study in Japan. v. 2410, p. 2406–2410.
- SILVIA A. et al. (2012) Effect of roasting on chlorogenic acids, caffeine and polycyclic aromatic hydrocarbons levels in two Coffea cultivars: Coffea arabica cv. Catuaí Amarelo IAC-62 and Coffea canephora cv. Apoatã IAC-2258. p. 406–415.
- SILVA, A. F. DA et al. (2010) Variabilidade espacial de atributos químicos do solo cultivado com café arábica (Coffea arabica L.) sob diferentes manejos. Coffee Science, p. 173–182.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A.; JR, J. (1965) COLORIMETRY OF TOTAL PHENOLICS WITH A C I D REAGENTS.
- SMITH, A. W. 1- Chemistry. In: PUBLISHERS, E. A. S. (Ed.). Introduction. In: Coffe. London: . p. 1–41. 1985.
- SOARES, C. M. (2006) Determinação dos Teores de Cobre e Zinco em Alimentos. p: 103-106.
- SOARES, S. E. (2002) Ácidos fenólicos como antioxidantes Phenolic acids as antioxidants. v. 15, n. 1, p. 71–81.
- SOUSA, C. M. D. M. et al. (2007) FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CINCO PLANTAS MEDICINAIS. v. 30, n. 2, p. 351–355.
- SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. Brazilian Journal of Plant Physiology, v. 18, n. 1, p. 201–216, 2006.
- STALMACH, A. et al. (2009) Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: Identification of biomarkers of coffee consumption. v. 37, n. 8, p. 1749–1758.
- SUNG, J.; GO, E.; SHIN, H. (2012) Cytoprotective Activity of Extract of Roasted Coffee Residue on Mouse Embryonic Fibroblasts Cells against Apoptosis Induced by Oxidative Stress. v. 21, n. 1, p. 137–143.
- SURH, Y. J. (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. v. 3, n. 10, p. 768–780.
- TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. (2007) Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. p: 1963–1967.
- TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. Corpo Humano fundamentos de anatoia e fidiologia. Artmed, v. 8º, 2012.
- TRUGO, L. C.; MACRAE, R. (1984) A Study of the Effect of Roasting on the Chlorogenic Acid Composition of Coffee Using HPLC. v. 15, p. 219–227.
- TSUKUI, A.; OIGMAN, S. S.; REZENDE, M. (2014) Óleo de Grãos de Café Cru: Diterpenos Cafestol e Caveol. v. 6, n. 1, p. 16–33.
- TVERDAL, A. (2015) Boiled coffee consumption and the risk of prostate cancer: Follow-up of 224,234 Norwegian men 20-69 years. v. 112, n. 3, p. 576–579.

- UCCELLA, S. et al. (2013) Intake of coffee, caffeine and other methylxanthines and risk of Type I vs Type II endometrial cancer. *British Journal of Cancer*, v. 109, n. 7, p. 1908–1913.
- VAN DAM, R. M.; HU, F. B. (2015) Coffee Consumption A Systematic Review. v. 294, n. 1, p. 97–104.
- VENDITTI, A. et al. (2015) Essential oil composition , polar compounds , glandular trichomes and biological activity of *Hyssopus officinalis* subsp . *aristatus* ( Godr .) Nyman from central Italy. v. 77, p. 353–363.
- VIEIRA, A. C. P.; CORNÉLIO, A. R.; SALGADO, J. M. *Alimentos funcionais*. p. 2, 2006.
- VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. (2011) Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. v. 124, n. 3, p. 863–868.
- VINDELOV, L. L. (1977) Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. v. 24, n. 3, p. 227–42.
- VITAGLIONE, P.; FOGLIANO, V.; PELLEGRINI, N. (2012) Coffee, colon function and colorectal cancer. v. 3, n. 9, p. 916–922.
- WHO. *World Health Statistics 2013*. In: World Health Organization. p. 168. 2013
- WHO. *World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals*. Geneva: 2017.
- WHO, 2018. *World Health Statistics*. 2018.
- YADIRA, P. B. et al. (2014) Bioethanol production from coffee mucilage. v. 57, p. 950–956.
- ZHONG, S. et al. (2014) Coffee consumption and risk of prostate cancer: An up-to-date meta-analysis. v. 68, n. 3, p. 330–337.
- ZHOU, J.; ZHOU, S. (2012) *Protection of Trigonelline on Experimental Diabetic Peripheral Neuropathy*. Hindawi Publishing Corporation *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012,
- ZHU, K. A. I. et al. (1999) Irreversible Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase by Dicafeoylquinic Acids †. v. 73, n. 4, p. 3309–3316.