

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Caracterização antioxidante do café (*Coffea arabica*, L.)
e efeitos da sua administração oral em ratos.**

Silvio José Valadão Vicente

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Saúde Pública para obtenção do título de
Doutor em Saúde Pública.

Área de concentração: Nutrição

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth A. F. S. Torres

São Paulo
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Esther Valadão Vicente, porto seguro para qualquer hora incerta,
incansável presença nas mais difíceis necessidades, exemplo de dedicação à família.

Na perda precoce de meu pai, Sylvio dos Santos Vicente,
desdobrou-se para iluminar as trilhas e indicar o caminho mais seguro.

Nada teria valido sem você.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Elizabeth A. F. S. Torres, pela confiança incondicional depositada neste trabalho, pelo apoio e incentivo sempre presentes nas horas mais necessárias e, principalmente, pela amizade e carinho que tornaram este trabalho de pesquisa mais humano.

Aos professores Dr. José Alfredo Gomes Arêas, Dr. Thomas Prates Ong e Dr. João Ernesto de Carvalho, membros da Comissão Julgadora, pelo precioso tempo dedicado à revisão deste trabalho e pelas importantes sugestões que muito colaboraram para a qualidade final do mesmo.

À professora Dra. Sabina Léa Davidson Gotlieb, pela imensa colaboração na revisão estatística e ortográfica deste trabalho, pela participação na Comissão Julgadora e, principalmente, pela amizade, paciência e exemplo de dedicação à nobre área do magistério.

A todas as amigas e amigos do laboratório de Bromatologia da FSP-USP que compartilharam desafios, dúvidas e horas exaustivas de trabalho, mas que também propiciaram momentos de agradável convívio durante a fase experimental desta pesquisa.

Às colegas Geni Sampaio, Emília Ishimoto e Yara Queiróz do laboratório de Bromatologia da FSP-USP, parceiras e companheiras incansáveis durante todas as etapas desta jornada que agora termina.

Aos amigos do BC-FM-USP e do IMT-USP que colaboraram na etapa bioterial deste estudo e, em particular, ao biólogo Robison Cruz que sacrificou vários finais de semana para a execução desta etapa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da verba necessária à realização deste trabalho de pesquisa.

A todas as pessoas que colaboraram, de qualquer forma, para transformar em realidade este projeto que tanto contribuiu para minha formação acadêmica e humana.

RESUMO

Vicente SJV. **Caracterização antioxidante do café (*Coffea arabica*, L.) e efeitos da sua administração oral em ratos** [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2009.

Introdução: Um dos fatores de risco para doenças crônicas não-transmissíveis é o excesso de espécies reativas causado pelo estresse oxidativo. Ácidos fenólicos atuam na defesa contra estas espécies, agindo como antioxidantes e como fatores de transcrição para as enzimas antioxidantes fase II (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase). Vários alimentos possuem ácidos fenólicos na composição porém o café se destaca pelo alto conteúdo dos mesmos e por ser consumido mundialmente. **Objetivos:** a) Comparar a capacidade antioxidante e a estabilidade dos cafés regular e descafeinado ao longo de seis meses; b) Verificar o tempo de resposta e possíveis correlações dose-resposta do efeito antioxidante em ratos após dose única de café; c) Avaliar o efeito antioxidante e possíveis danos hepáticos em ratos submetidos a doses repetidas de café durante 30 dias. **Métodos:** na etapa *in vitro*, foram analisados os compostos fenólicos totais, os principais ácidos fenólicos, a capacidade antioxidante (ORAC e DPPH) e a estabilidade destes parâmetros nos cafés regular e descafeinado durante seis meses. Na etapa *in vivo*, foram utilizados ratos machos Wistar, sendo dosadas as enzimas fase II e o ORAC, além do exame histopatológico e biomarcadores. **Resultados:** o café regular apresentou capacidade antioxidante inicial superior ao descafeinado com compostos fenólicos totais iguais e maiores teores de ácido fenólicos (15,3% cafêico, 17,0% p-cumárico e 38,1% ferúlico), ORAC (20,8%) e DPPH (3,9%). Após 6 meses, as amostras fechadas à vácuo praticamente não sofreram perdas, as abertas mantidas a 4°C apresentaram perdas medianas (9,6% fenólicos totais, 4,5-8,2% ácidos fenólicos, 21,3-21,6% ORAC e 2,8-3,2% DPPH) e as mantidas abertas a 20°C exibiram perdas elevadas (14,4-19,8% fenólicos totais, 11,9-19,6% ácidos fenólicos, 38,8-49,9% ORAC e 2,1-3,8% DPPH). Após dose única de café para os ratos, o tempo de resposta máxima para as enzimas fase II e ORAC foi de 1 hora, com significância estatística para as enzimas (p=0,015 SOD e Cat, p=0,007 GPx e p=0,403 ORAC). Após diferentes

doses, foram obtidas correlações dose-resposta positivas e com significância estatística para as enzimas ($p=0,050$ SOD, $p=0,033$ Cat, $p=0,008$ GPx e $p=0,113$ ORAC). Após doses repetidas (30 dias), a atividade das enzimas antioxidantes e o ORAC apresentaram grandes aumentos (74,8% SOD, 59,4% Cat, 135,2% GPx e 25,1% ORAC), todos estatisticamente significativos ($p<0,001$ para todos). O tecido hepático e os biomarcadores não apresentaram alterações em relação ao grupo controle. **Conclusões:** o café regular apresentou capacidade antioxidante superior ao descafeinado, os dois cafés não apresentaram perdas das características antioxidantes após seis meses se mantidos selados à vácuo e a administração oral de café regular aumentou a condição antioxidante dos ratos de maneira significativa, sem causar danos hepáticos.

Descritores: café, estresse oxidativo, enzimas antioxidantes, capacidade antioxidante, ácidos fenólicos.

ABSTRACT

Vicente SJV. **Antioxidant characterization of coffee (*Coffea arabica*, L.) and the effects of its oral feed in rats** [PhD thesis]. São Paulo (BR): School of Public Health of University of São Paulo; 2009.

Introduction: A risk factor for several degenerative diseases is the excess of reactive species caused by oxidative stress. Phenolic acids share in the defense against those species, acting as antioxidants and as transcriptional factors for the phase II antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase). Several foods have phenolic acids in their composition but coffee stands out by the high content of them and to be consumed worldwide. **Objectives:** a) Compare the antioxidant capacity and the stability of regular and decaffeinated coffees along six months; b) Verify the time of response and possible dose-response correlations of antioxidant effect in rats after a single dose of coffee; c) Evaluate the antioxidant effect and possible hepatic damages in rats submitted to repetitive doses along 30 days. **Methods:** in the *in vitro* step, it was analyzed the total phenolic compounds, main phenolic acids, antioxidant capacity (ORAC and DPPH) and the stability of these parameters in regular and decaffeinated coffees along six months. In the *in vivo* step, it was used male Wistar rats, being analyzed phase II enzymes and ORAC, besides histopathologic examination and biomarkers. **Results:** regular coffee presented a higher initial antioxidant capacity than decaffeinated coffee with equal total phenolic compounds and higher content of phenolic acids (15.3% caffeic, 17.0% p-coumaric and 38.1% ferulic), ORAC (20.8%) and DPPH (3.9%). After six months, closed samples kept under vacuum practically did not show any losses, opened samples kept at 4°C presented regular losses (9.6% total phenolic compounds, 4.5-8.2% phenolic acids, 21.3-21.6% ORAC and 2.8-3.2% DPPH) and opened samples kept at 20°C exhibited big losses (14.4-19.8% total phenolic compounds, 11.9-19.6% phenolic acids, 38.8-49.9% ORAC and 2.1-3.8% DPPH). After a single dose of coffee for rats, time for maximum response of phase II enzymes and ORAC was 1 hour, with statistic significance for enzymes (p=0.015 SOD and Cat, p=0.007 GPx and p=0.403 ORAC). After different doses, it was obtained positive dose-response correlations, with statistic significance for enzymes

($p=0.050$ SOD, $p=0.033$ Cat, $p=0.008$ GPx and $p=0.113$ ORAC). After repetitive doses (30 days), the activity of antioxidant enzymes and ORAC showed big increases (74.8% SOD, 59.4% Cat, 135.2% GPx and 25.1% ORAC), all with statistic significance ($p<0.001$ for all). Hepatic tissue and biomarkers did not show any change compared to control group. **Conclusions:** regular coffee presented higher antioxidant capacity than decaffeinated coffee, both coffees did not show any antioxidant losses after six months if kept sealed under vacuum and the oral administration of regular coffee increased significantly the antioxidant condition of rats, without any hepatic damages.

Descriptors: coffee, oxidative stress, antioxidant enzymes, antioxidant capacity, phenolic acids.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 RADICAIS LIVRES	20
2.2 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (ERO)	21
2.3 OUTRAS ESPÉCIES REATIVAS	27
2.4 DEFESAS CONTRA AS ESPÉCIES REATIVAS	30
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO	38
2.6 DOENÇAS ASSOCIADAS ÀS ESPÉCIES REATIVAS	42
2.7 CAFÉ E SUA INFLUÊNCIA NA SAÚDE HUMANA	48
3 OBJETIVOS	58
3.1 OBJETIVO GERAL	58
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
4 MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1 MATERIAIS	60
4.2 PREPARO DA INFUSÃO DE CAFÉ	62
4.3 REAGENTES	63
4.4 EQUIPAMENTOS	64
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	64
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1 TESTES <i>IN VITRO</i>	70
5.1.1 Umidade	70
5.1.2 Atividade de água	73
5.1.3 Compostos fenólicos totais	75
5.1.4 Capacidade antioxidante por DPPH	79
5.1.5 Capacidade antioxidante por ORAC	81

5.1.6 Teor de ácidos fenólicos	84
5.1.7 Discussão dos resultados <i>in vitro</i>	92
5.2 TESTES <i>IN VIVO</i>	96
5.2.1 Tempo de resposta	98
5.2.2 Dependência dose/resposta	102
5.2.3 Testes de doses repetidas	106
5.2.4 Análise histológica e biomarcadores hepáticos	111
5.2.5 Discussão dos resultados <i>in vivo</i>	113
6 CONCLUSÕES	118
7 REFERÊNCIAS	119
ANEXOS	
Anexo I - Parecer do Comitê de Ética do IMT-USP	129
Anexo II - Tabelas com os dados experimentais	130

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1:	Conversão do oxigênio molecular à água.	23
Fig. 2:	Rota endógena de formação de ERO.	24
Fig. 3:	Formação endógena de ERE.	29
Fig. 4:	Ação pró-oxidante do α -tocoferol na LDL.	36
Fig. 5:	Promoção tumoral pelo estresse oxidativo.	44
Fig. 6:	Estresse oxidativo associado ao mal de Parkinson.	48
Fig. 7:	Síntese dos ácidos hidroxicinâmicos (cafêico, ferúlico e p-cumárico) e dos respectivos ácidos clorogênicos (5-CQA, 5-FQA e 5-p-CoQA) em plantas superiores.	53
Fig. 8:	Delineamento da etapa experimental do projeto.	60
Fig. 9:	Esquema de partilha, estocagem e análise das cinco embalagens de cada um dos três lotes de café regular e descafeinado.	61
Fig. 10:	Umidade (% p/p) do café regular.	72
Fig. 11:	Umidade (% p/p) do café descafeinado.	73
Fig. 12:	Variação da atividade de água do café regular.	74
Fig. 13:	Variação da atividade de água do café descafeinado.	75
Fig. 14:	Curva-padrão para quantificação dos compostos fenólicos totais.	76
Fig. 15:	Teor de compostos fenólicos totais em café regular.	78
Fig. 16:	Teor de compostos fenólicos totais em café descafeinado.	78
Fig. 17:	Curvas típicas do ensaio de DPPH para diferentes amostras.	79
Fig. 18:	Resultados dos ensaios de DPPH (%) em café regular.	80
Fig. 19:	Resultados dos ensaios de DPPH (%) em café descafeinado.	81
Fig. 20:	Curvas típicas do teste de capacidade antioxidante por ORAC.	82
Fig. 21:	Resultados dos testes de ORAC em café regular.	83
Fig. 22:	Resultados dos testes de ORAC em café descafeinado.	83
Fig. 23:	Absorbância máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) dos ácidos fenólicos de interesse.	85
Fig. 24:	Cromatograma dos ácidos 5-CQA, cafêico, p-cumárico e ferúlico.	86
Fig. 25:	Curva de calibração para o ácido cafêico.	87
Fig. 26:	Curva de calibração para o ácido p-cumárico.	87
Fig. 27:	Curva de calibração para o ácido ferúlico.	88

Fig. 28:	Teor de ácido cafêico em função do tempo de armazenagem.	91
Fig. 29:	Teor de ácido p-cumárico em função do tempo de armazenagem.	91
Fig. 30:	Teor de ácido ferúlico em função do tempo de armazenagem.	92
Fig. 31:	<i>Ratus novergicus</i> variedade <i>Wistar</i> utilizados no estudo	96
Fig. 32:	Administração da gavagem da infusão de café.	97
Fig. 33:	Perfusão do fígado com soro fisiológico.	97
Fig. 34:	Variação da atividade enzimática hepática de ratos em função do tempo para eutanásia após gavagem de dose única de 2 mL de infusão de café.	98
Fig. 35:	Variação da atividade antioxidante hepática de ratos em função do tempo para eutanásia após gavagem de dose única de 2 mL de infusão de café.	101
Fig. 36:	Variação da atividade enzimática hepática de ratos uma hora após a gavagem, em função da dose de infusão de café administrada.	103
Fig. 37:	Variação da atividade antioxidante hepática de ratos uma hora após a gavagem, em função da dose de infusão de café administrada.	105
Fig. 38:	Atividades enzimáticas médias (SOD, Cat e GPx) com os desvios-padrão dos grupos controle e de estudo de doses repetidas.	107
Fig. 39:	Atividades antioxidantes totais médias (ORAC) com os desvios-padrão dos grupos controle e de estudo de doses repetidas.	109
Fig. 40:	Evolução do peso médio dos grupos 9 e 10 durante 28 dias.	110
Fig. 41:	Comparação dos tecidos hepáticos dos grupos 9 e 10.	112
Fig. 42:	Atividades médias da AST e ALT com os desvios-padrão dos grupos controle e de estudo de doses repetidas.	113

LISTA DE QUADROS

Q. 1:	Principais ERO e respectivos agentes defensivos.	30
Q. 2:	Biomarcadores associados a algumas das doenças humanas de origem oxidativa.	43
Q. 3:	Alguns compostos fenólicos presentes no café.	51
Q. 4:	Teor de CQA totais e CGA totais em algumas espécies de cafés.	51
Q. 5:	Absorbância dos padrões de ácido gálico em 750 nm.	76
Q. 6:	Valores de absorvâncias máximas ($\lambda_{m\acute{a}x}$) obtidos no presente estudo e citados na literatura.	85
Q. 7:	Tempos de retenção dos compostos de interesse.	86
Q. 8:	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e índice de recuperação (IR) para os compostos de interesse.	88
Q. 9:	Comparação dos ácidos fenólicos presentes nas infusões de café regular e quantidade de pó utilizada nas infusões.	89
Q. 10:	Redução (%) dos teores seis meses após a abertura das caixas.	90
Q. 11:	Atividades enzimáticas (SOD, Cat e GPx) e capacidade antioxidante total (ORAC) dos grupos de doses repetidas.	106
Q. 12:	Dados para o cálculo do quociente de eficiência alimentar (QEA) dos grupos controle e de estudo de doses repetidas.	111
Q. I:	Umidades iniciais e após seis meses dos três lotes de café regular armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.	130
Q. II:	Umidades iniciais e após seis meses dos três lotes de café descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.	131
Q. III:	Atividades de água iniciais e após seis meses dos três lotes de café regular armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.	132
Q. IV:	Atividades de água iniciais e após seis meses dos três lotes de café descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.	133
Q. V:	Compostos fenólicos totais iniciais e após seis meses dos três lotes de café regular armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.	134

- Q. VI: Compostos fenólicos totais iniciais e após seis meses dos três lotes de café descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira. 135
- Q. VII: Capacidade antioxidante (DPPH) iniciais e após seis meses dos três lotes de café regular armazenados à temperatura ambiente e em geladeira. 136
- Q. VIII: Capacidade antioxidante (DPPH) iniciais e após seis meses dos três lotes de café descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira. 137
- Q. IX: Capacidade antioxidante (ORAC) iniciais e após seis meses dos três lotes de café regular armazenados à temperatura ambiente e em geladeira. 138
- Q. X: Capacidade antioxidante (ORAC) iniciais e após seis meses dos três lotes de café descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira. 139
- Q. XI: Padrões de ácido cafêico analisados por HPLC. 140
- Q. XII: Padrões de ácido p-cumárico analisados por HPLC. 140
- Q. XIII: Padrões de ácido ferúlico analisados por HPLC. 140
- Q. XIV: Ácido cafêico inicial e após seis meses dos três lotes de café regular e descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira. 141
- Q. XV: Ácido p-cumárico inicial e após seis meses dos três lotes de café regular e descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira. 142
- Q. XVI: Ácido ferúlico inicial e após seis meses dos três lotes de café regular e descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira. 143
- Q. XVII: Variação da atividade enzimática e capacidade antioxidante hepática de ratos em função do tempo para a eutanásia após a gavagem. 144
- Q. XVIII: Variação da atividade enzimática e capacidade antioxidante hepática de ratos após o tempo de resposta máxima, em função da dose administrada. 144

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP	trifosfato de adenosina
Aw	atividade de água
Cat	catalase
CGA	ácido clorogênico
CQA	ácido cafeoilquínico
DCNT	doenças crônicas não-transmissíveis
DNA	ácido desoxirribonucléico
ERE	espécies reativas do enxofre
ERH	espécies reativas dos halogênios
ERN	espécies reativas do nitrogênio
ERO	espécies reativas do oxigênio
FQA	ácido ferroilquínico
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
GTP	trifosfato de guanosina
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HClO	ácido hipocloroso
HNO ₂	ácido nitroso
L*	radical lipídico
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LH	lipídio
LOO*	radical lipoxila
LOOH	hidroperóxido lipídico
NADH	nicotinamida-adenina dinucleotídeo
NADPH	nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato
*NO	radical óxido nítrico
*NO ₂	radical dióxido nítrico
O ₂	oxigênio molecular

$^1\text{O}_2$	oxigênio singlete
$^3\text{O}_2$	oxigênio triplete
O_2^-	ânion superóxido
O_2^{2-}	ânion peróxido
O_3	ozônio
$^*\text{OH}$	radical hidroxila
OH^-	ânion hidroxila
ONOO^-	ânion peroxinitrito
p-CoQA	ácido p-cumarilquínico
R^*	radical livre
R^{*+}	radical proteína livre
RO^*	radical alcoxila
RONOO	alquilperoxinitrato
ROO^*	radical peroxila
ROOH	hidroperóxido orgânico
RS^*	tiil radical
RSH	tiól ou mercaptana
RSO^*	radical sulfinil
RS^*OO	radical sulfonil
RSOO^*	radical tiil peroxil
RSO_2OO^*	radical sulfonil peroxil
RS^*R^+	cátion sulfeto orgânico
RSS^*	radical pertiil
RSS^*R^-	ânion dissulfeto orgânico
SOD	superóxido dismutase
UV	ultravioleta
XOS	xantina oxidase

1. INTRODUÇÃO

Uma das maiores ironias da arquitetura bioquímica dos organismos aeróbios, aos quais nós humanos pertencemos, é que o oxigênio que é absolutamente indispensável à vida, sob certas circunstâncias pode apresentar severos efeitos deletérios à saúde. A maior parte destes efeitos potencialmente perigosos advém da formação e da atividade de compostos químicos conhecidos como espécies reativas do oxigênio (ERO) ou do nitrogênio (ERN), os quais apresentam a tendência de promover reações oxidativas. Muitos deles são radicais livres, apresentando um ou mais elétrons desemparelhados sendo, por isto, instáveis e altamente reativos. Como exemplos, podem ser citadas as espécies superóxido (O_2^-), peróxido (O_2^{2-}), radical hidroxila ($*OH$), peroxila (ROO^*), hidroperóxido ($ROOH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), alcoxila (RO^*), óxido nítrico ($*NO$), dióxido nítrico ($*NO_2$), peroxinitrito ($ONOO^-$), alquilperoxinitrato ($RONOO$), ácido nitroso (HNO_2) e ácido hipocloroso ($HClO$), dentre outras. A geração destas espécies ocorre durante as funções normais das células como a cadeia respiratória mitocondrial, a fagocitose, o metabolismo do ácido araquidônico, a atuação das defesas antiinflamatórias e a fertilização, mas o excesso das mesmas pode provocar diferentes condições patológicas (Cooper et al., 2002; Singh et al., 2004; Johansen et al., 2005).

Nas últimas décadas, muitos trabalhos foram publicados relatando correlações diretas entre o estresse oxidativo (presença excessiva de radicais livres e espécies reativas) e o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT). Esta condição pode prejudicar várias moléculas e sistemas biológicos, sendo particularmente vulneráveis o DNA (ácido desoxirribonucléico) e as mitocôndrias. Doenças como aterosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, várias formas de cânceres, diabetes, fibrose cística, distúrbios neurodegenerativos como a doença de Alzheimer e o mal de Parkinson, esquizofrenia, síndrome de Down e catarata, dentre outras, já foram associadas ao estresse oxidativo (Maugeri et al., 2004; Wu et al., 2004).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm estabelecido correlações inversas entre o consumo de frutas, legumes e verduras e a ocorrência de várias DCNT. A ingestão de antioxidantes naturais (vitaminas E e C, carotenóides, oligoelementos como o

selênio e o zinco, compostos fenólicos etc.) é considerada fator de prevenção do estresse oxidativo e das doenças a ele associadas. Uma pesquisa revelou que o número de publicações científicas sobre antioxidantes e estresse oxidativo praticamente quadruplicou na última década, passando de 1.684 no ano de 1993 para 6.510 em 2003. Isto mostra o grande interesse da comunidade médica, dos especialistas em nutrição e dos pesquisadores da área da saúde em conhecer os constituintes dos alimentos, suas capacidades antioxidantes e seus efeitos sobre a saúde (Huang et al., 2005).

Além de causar sérios danos aos organismos, as espécies reativas também afetam os alimentos. Devido a fatores relacionados à saúde, nas últimas décadas as gorduras de origem animal vêm sendo gradativamente substituídas pelos óleos vegetais. Estes últimos, porém, apresentam elevados teores de ácidos graxos insaturados, sendo passíveis de sofrer reações oxidativas em maior extensão, o que pode provocar o aparecimento de odores desagradáveis, a destruição de valiosos nutrientes e a geração de compostos que podem participar do desenvolvimento das DCNT. Estudos verificaram que estas reações ocorrem conforme variados mecanismos, quase todos passando pela geração de radicais livres contendo oxigênio, os quais atuam como precursores de reações de oxidação em cadeia (Kanazawa et al., 2002; Muik et al., 2005).

Para se proteger dos efeitos indesejáveis das espécies reativas, os organismos aeróbios desenvolveram sistemas defensivos com a função de regular a geração destas espécies ou neutralizá-las após a sua produção. Estes mecanismos incluem a utilização de substâncias antioxidantes de origem endógena ou exógena que reduzem as ERO e ERN a formas menos reativas e a transcrição de enzimas antioxidantes com a função de degradar ou desativar substratos oxidados. Dentre estas enzimas, podem ser destacadas a superóxido dismutase (SOD) que elimina os radicais superóxido, a glutathiona peroxidase (GPx) que reduz os peróxidos e hidroperóxidos, a glutathiona redutase (GR) que regenera a glutathiona (GSH) a partir da sua forma oxidada (GSSG) e a catalase (Cat) que destrói o peróxido de hidrogênio por dismutação (Pincemail, 2006).

Modelos experimentais têm mostrado correlações positivas entre o consumo de ácidos fenólicos e o aumento da expressão gênica destas enzimas, resultando na

melhora da capacidade antioxidante que é a condição atuante na inativação das ERO e ERN. Já foi verificado que alguns ácidos fenólicos participam desta rotina defensiva, atuando como fatores de transcrição indiretos. Esta ação decorre da ativação de quinases como a MAPK (“mitogen-activated protein kinase”), a PI3K (“phosphatidylinositol-3-kinase”) e a PKC (“protein kinase C”) que fosforilam a proteína Nrf2 (“nuclear factor-E2-related factor”) liberando-a do complexo citoplasmático Keap1-Nrf2 (“cytoplasmic actin-binding protein”) e possibilitando sua translocação para o núcleo da célula a fim de atuar como promotora na transcrição gênica das enzimas antioxidantes fase II citadas (Kwak et al., 2004; Yeh & Yen, 2006).

Muito do conhecimento que associa a ingestão de ácidos fenólicos com a indução da transcrição destas enzimas e o conseqüente aumento da capacidade antioxidante foi obtido em estudos utilizando ratos de laboratório, uma vez que as respostas biológicas destes mamíferos se aproximam bastante daquelas apresentadas pelos seres humanos. Porém, ainda existem várias questões a ser respondidas como o tempo de indução das enzimas fase II a partir do estímulo nutricional, a relação dose/resposta para esta indução e a confirmação se o aumento da capacidade antioxidante está relacionada a biodisponibilidade dos ácidos fenólicos, das enzimas antioxidantes por eles induzidas ou a estes dois fatores. Todos estes fatos sugerem a necessidade de maiores investigações sobre alimentos contendo ácidos fenólicos e possíveis efeitos destas substâncias na indução das enzimas antioxidantes que podem prevenir ou minimizar a ocorrência de diversas DCNT.

A etapa *in vitro* deste estudo visou dosar os principais ácidos fenólicos, os compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante total dos cafés regular e descafeinado, assim como avaliar a estabilidade destes parâmetros ao longo de seis meses de estocagem. A etapa *in vivo* propôs quantificar alterações na condição antioxidante hepática de ratos, determinando o tempo de resposta, a relação dose/resposta e possíveis correlações advindas da administração oral de infusão de café, em dose única e doses repetidas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Ao longo dos milhões de anos da evolução dos seres vivos, nem todos os organismos desenvolveram a capacidade de realizar a fosforilação oxidativa. Os que o fizeram, acabaram extraindo consideravelmente mais energia a partir de seus alimentos. Esta situação pode ser exemplificada pela obtenção de energia nos músculos dos mamíferos. Na glicólise anaeróbia, os principais metabólitos são o ácido láctico e a água, com geração de apenas 2 moléculas de ATP (trifosfato de adenosina). Já no metabolismo aeróbio, os principais produtos são o dióxido de carbono e a água, com geração de 36 ATP e 2 GTP (trifosfato de guanosina). Desta forma, o metabolismo aeróbio da glicose é 19 vezes mais eficiente que o anaeróbio, quanto à produção de energia. Entretanto, este modelo tem seus inconvenientes pois acaba produzindo metabólitos reativos que podem causar danos aos componentes celulares. Evidentemente, o caminho evolutivo encontrou adaptações fisiológicas e bioquímicas que permitiram aproveitar as vantagens da rota aeróbia, minimizando os perigos derivados da mesma (Kumar et al., 2005; Voet et al., 2008).

2.1 RADICAIS LIVRES

Radicais livres, que incluem as ERO e as ERN, são derivados tanto de processos metabólicos normais e essenciais aos organismos (endógenos) como da exposição a fatores ambientais (exógenos). São reconhecidos por desempenhar papel biológico duplo que podem causar efeitos benéficos ou deletérios à saúde. Vários exemplos desta ambigüidade podem ser citados. Em um deles, ERO atuam como mensageiros secundários nas cascatas de sinalização intracelular que induzem e mantêm ativo o fenótipo da oncogênese nas células cancerosas mas, em oposição, podem também provocar a senescência celular e a apoptose, agindo como agentes antitumorais (Valko et al., 2006). Outra situação importante é a geração de ERN como o *NO no músculo cardíaco, sendo esta uma etapa crítica e necessária para manter o tônus vascular e a contratibilidade, mas que pode provocar danos celulares irreversíveis, chegando a provocar a morte deste tecido, dependendo das concentrações envolvidas (Giordano, 2005).

Estas espécies apresentam potencial para reagir com uma enorme variedade de substratos, tornando-as ideais para diversas funções biológicas como a sinalização celular e as reações enzimáticas. Porém, podem ser inadequadamente produzidas, sendo então capazes de oxidar quase todas as moléculas e sistemas biológicos incluindo carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos, membrana celular, DNA e lipídios, além de vários hormônios e vitaminas (Cooper et al., 2002). A produção das espécies reativas pode ocorrer conforme diferentes rotas, sumarizadas abaixo.

a) Processos endógenos enzimáticos: envolvem principalmente a cadeia respiratória, a fagocitose, a síntese da prostaglandina e as atividades do citocromo P450. Estão principalmente associados à respiração oxidativa que ocorre no interior das mitocôndrias, à ação dos fagócitos durante os processos inflamatórios, à xantina oxidase (XOS), às reações envolvendo metais de transição como o ferro e o cobre, às rotas metabólicas dos derivados do ácido araquidônico e aos peroxissomos. Sua incidência aumenta na condição da prática de exercícios intensos, assim como nos quadros inflamatórios e isquêmicos.

b) Processos endógenos não enzimáticos: incluem principalmente as reações do oxigênio com diferentes compostos orgânicos, como as que ocorrem durante a oxidação lipídica e protéica, além da produção de trióis.

c) Processos associados a fatores exógenos: estão relacionados às condições ambientais como radiação ultravioleta (UV), ozônio (O₃), vários agentes de poluição como pesticidas, drogas, anestésicos e solventes industriais, além de hábitos comportamentais como a prática do fumo e o uso do álcool.

2.2 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (ERO)

O átomo de oxigênio pode ser considerado um di-radical pois possui dois elétrons não emparelhados em diferentes orbitais atômicos tipo p. Cada átomo de oxigênio necessita receber ou compartilhar dois elétrons, a fim de formar espécie

mais estável e com energia mais baixa que a sua. Entretanto, as leis da termodinâmica afirmam ser energeticamente desfavorável a aceitação de elétrons com spins paralelos aos seus próprios. Esta ação se torna viável quando um de seus elétrons sofre uma reversão de spin, tornando possível o emparelhamento com o par eletrônico que está sendo recebido. Em condições ordinárias, esta reversão apresenta uma barreira energética muito grande para a maioria das reações oxidativas, o que faz com que o oxigênio seja um acceptor terminal de elétrons ideal para os sistemas biológicos (McCord, 2000).

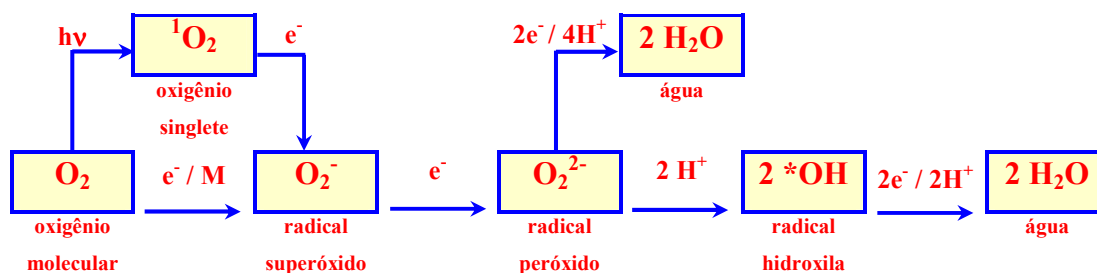
Por sua vez, o oxigênio molecular (O_2), também denominado oxigênio triplete (3O_2), no estado mais baixo de energia ou estado fundamental é altamente oxidante pois possui dois elétrons não emparelhados e com spins paralelos localizados em diferentes orbitais moleculares π antiligantes. Sua reatividade, porém, é muito baixa pois, de acordo com o princípio da exclusão de Pauli, esta molécula só pode se reduzir se receber elétrons com spins antiparalelos ao seu próprio par eletrônico. Por este motivo, o O_2 só pode reagir muito lentamente na ausência de catalisadores (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001).

Em função desta inércia química, a ativação do O_2 nos sistemas biológicos depende, principalmente, da atuação de íons metálicos de transição como o ferro e o cobre. Por este motivo, as proteínas envolvidas no transporte de O_2 no sangue (hemoglobina) e nos músculos (mioglobina), assim como as oxidases e oxigenases que utilizam o oxigênio durante reações metabólicas, são metaloenzimas (Baynes & Dominiczak, 2007).

A cadeia respiratória mitocondrial exerce papel-chave no funcionamento celular, sendo responsável pela conversão do O_2 à água, em um processo de redução que envolve 4 elétrons e um complexo sistema metaloenzimático (figura 1). As conseqüências desta atividade são antagônicas: por um lado, provê a mais importante fonte de energia aeróbia com a produção de 34 moléculas de ATP por mol de glicose metabolizado mas, por outro lado, pequena parte deste O_2 não é convertida à água por vazamento eletrônico associado a imperfeições na cadeia respiratória, dando origem às ERO e ERN. Baixas concentrações destas espécies exercem importantes papéis fisiológicos como a regulação da apoptose (morte de células direcionadas para estados pré-cancerosos), a ativação de fatores de transcrição responsáveis por genes

envolvidos nas respostas imunes e a modulação da expressão de códigos genéticos para enzimas antioxidantes. Porém, em quantidade excessiva, estas espécies apresentam efeitos perigosos pois induzem a apoptose de células saudáveis, ativam códigos genéticos pró-inflamatórios, causam mutações no DNA, inativam proteínas e enzimas, além de oxidar açúcares, lipídios, lipoproteínas e a própria membrana celular (Pincemail, 2006).

Figura 1 - Conversão do oxigênio molecular à água (adaptada de Pincemail, 2006).



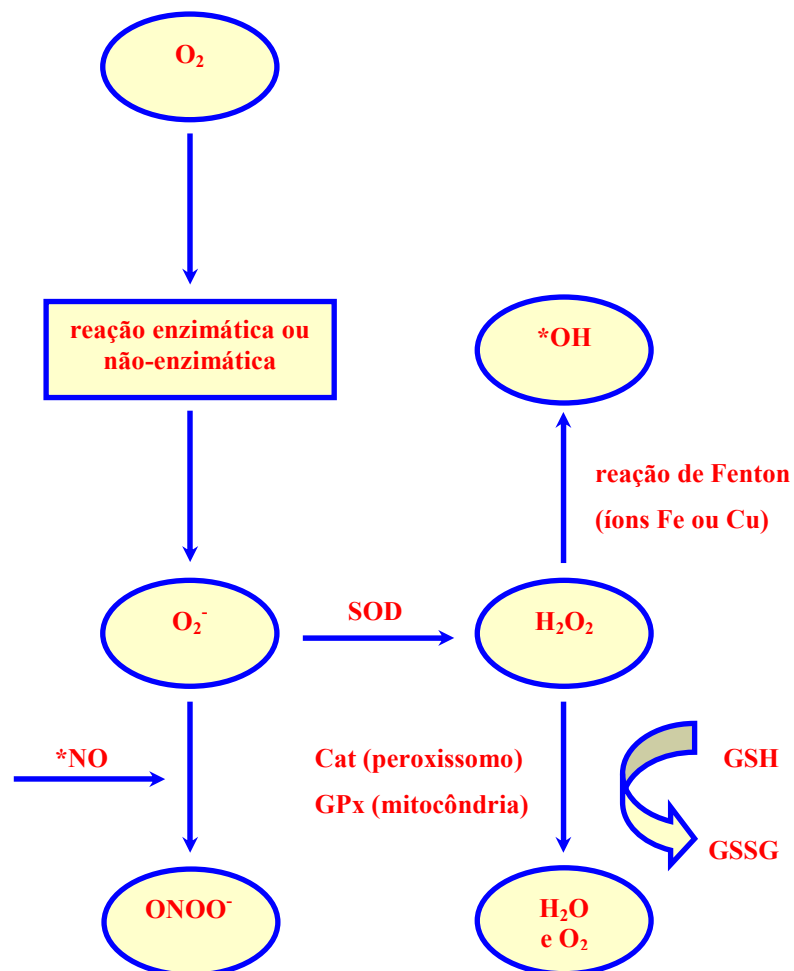
A respiração oxidativa mitocondrial é a maior responsável pela geração de ERO (O_2^- , H_2O_2 e $\cdot OH$) e ERN ($\cdot NO$) mas as células brancas fagocíticas também produzem várias espécies reativas que eliminam patógenos invasores. Sob estresse oxidativo, neutrófilos podem se infiltrar no músculo esquelético, prejudicando células saudáveis. Na sua forma ativada, utilizam a enzima nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase para gerar O_2^- que pode reagir com os compostos-alvos, ser dismutado a H_2O_2 ou produzir danos oxidativos se não for neutralizado (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001).

O coração humano é um dos órgãos mais dependente do oxigênio. Na condição de repouso, cem gramas deste tecido consomem entre 8 a 15 mL de O_2 /min, o que é de três a cinco vezes mais que o consumido pelo tecido cerebral. Sob esforço vigoroso como nos exercícios físicos aeróbios, esta taxa pode aumentar muito, alcançando até 70 mL de O_2 /min. Como o músculo cardíaco não consegue produzir energia suficiente sob condição anaeróbia, um constante fluxo de O_2 é requerido para manter seus processos, mas esta condição pode dar acesso às rotas de produção de ERO e ERN, com conseqüências importantes (Giordano, 2005).

A produção endógena de espécies reativas pode ser iniciada quando o oxigênio molecular é utilizado em rota enzimática ou não (NADPH oxidase, ciclooxigenase,

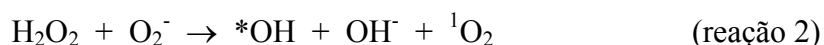
XOS, cadeia respiratória mitocondrial, auto-oxidação da glicose, formação de polióis, produção de hexosamina etc.), formando o radical primário superóxido. Este pode reagir com *NO gerando o extremamente perigoso peroxinitrito ou ser atacado pela Mn-SOD (mitocondrial) ou Cu-SOD (citosólica), sendo transformado em peróxido de hidrogênio que é medianamente reativo. Esta última molécula pode sofrer reação de Fenton pela ação dos íons ferro ou cobre formando *OH que é um dos mais nocivos radicais livres ou ser reduzida à água e O₂ pela ação da GPx (mitocondrial) ou Cat (peroxissômica). Estas reações e as enzimas envolvidas podem ser vistas na figura 2 (Johansen et al., 2005).

Figura 2 - Rota endógena de formação de ERO (adaptada de Johansen et al., 2005).



Apesar de não ser as únicas espécies reativas, as ERO são as mais abundantes e, conseqüentemente, as mais importantes quando estudamos o metabolismo humano. Algumas destas espécies estão descritas a seguir.

a) Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$): não é um verdadeiro radical livre, mas a forma excitada do oxigênio molecular. Possui meia-vida extremamente curta e alta reatividade, sendo formado quando um dos elétrons mais externos do O_2 é promovido a um estado de energia mais alta. Pode ser produzido através de diferentes mecanismos como por rota exógena na qual o oxigênio triplete absorve um fóton na região UV (reação 1) ou por via endógena pela reação de Haber-Weiss na qual peróxido de hidrogênio reage com radical superóxido formando radical hidroxila, ânion hidroxila (OH^-) e oxigênio singlete (reação 2). Sua formação é aumentada quando compostos fotoexcitáveis estão presentes com o oxigênio molecular. Vários sensibilizadores naturais são conhecidos como tetrapirroles (bilirrubina), flavinas, clorofila, hemoproteínas e formas reduzidas da piridina nucleotídeo, podendo catalisar esta reação. A presença de metais de transição pode contribuir decisivamente para acelerar a formação do oxigênio singlete (Giordano, 2005).

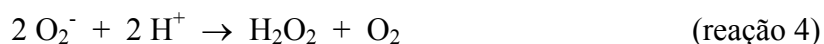


b) Radical superóxido (O_2^-): aproximadamente 98% do oxigênio utilizado pelos seres eucarióticos é metabolizado nas mitocôndrias pela citocromo oxidase. Esta enzima que possui quatro centros redox (dois grupos heme e dois íons cobre) transfere quatro elétrons ao O_2 para produzir duas moléculas de água. Ao longo do processo evolutivo, a rota metabólica eletrônica foi isolada de modo a prevenir perdas, mas em pelo menos dois sítios já identificados da cadeia de transporte eletrônico (complexo I e ubisemiquinona), podem ocorrer vazamentos do fluxo eletrônico levando à formação de radicais superóxido pela transferência de um único elétron ao O_2 (reação 3). A estimativa deste vazamento varia tendo sido citado de 1,0 a 2,0% por McCord (2000), até 1% por Klein & Ackerman (2003) e de 0,4 a 4,0% por Pincemail (2006). Durante condições de hipoxia, a taxa de vazamento destes sítios aumenta com a pressão parcial de O_2 , o que foi comprovado através de estudos com ratos adultos e sádios que morreram após 72 horas sob atmosfera de O_2 puro. Um limitado número de enzimas como a triptofano deoxigenase, a indole-amina deoxigenase e a XOS também podem produzir este radical. Apesar de apresentar reatividade

moderada, o O_2^- possui alta citotoxicidade inativando enzimas como glutamina sintetase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, α,β -dehidroxiisovalerato desidratase, 6-fosfogluconato desidratase, ornitina descarboxilase, GPx, Cat, ATPase miofibrilar, creatinina fosfoquinase e adenilato ciclase, dentre outras. Esta espécie tem meia-vida de $1,0 \times 10^{-6}$ segundo e seu destino metabólico normal é a redução para formar H_2O_2 através da ação da SOD (McCord, 2000; Evans & Halliwell, 2001; Singh et al., 2004; Voet et al., 2008).

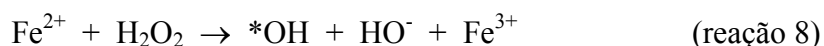


c) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion divalente peróxido (O_2^{2-}): normalmente são produzidos pela ação da SOD sobre o radical O_2^- , através de reação de dismutação ou desproporcionamento (reação 4). A desativação destas espécies pode ocorrer pela ação da catalase que as decompõe à água e oxigênio (reação 5) ou da glutathione peroxidase que reduz estas espécies à água ao oxidar a GSH a GSSG (reação 6). Em função desta última reação, o balanço GSH/GSSG indica o estado redox da célula e sua condição defensiva contra o estresse oxidativo. Outra rota de formação é a redução dieletrônica do O_2 que ocorre pela ação das oxidases (reação 7). Peróxidos são espécies intermediárias na cadeia de formação dos radicais livres, apresentam reatividade mediana e podem oxidar vários substratos, mas o maior risco associado à esta espécie é sua transformação a $*OH$ catalisada por íons de metais de transição (McCord, 2000; Leeuwenburgh & Heinecke, 2001; Klein & Ackerman, 2003; Kumar et al., 2005; Voet et al., 2008).



d) Radical hidroxila ($*OH$): vários estudos apontam esta espécie como a que causa maiores danos às proteínas, lipídios, carboidratos e DNA. Sua formação decorre principalmente da reação do H_2O_2 com íons pró-oxidantes como Fe e Cu, por um

processo denominado reação de Haber-Weiss ou Fenton (reação 8). Apesar de ter meia-vida extremamente curta ($1,0 \times 10^{-9}$ segundo), facilmente oxida outras moléculas. A produção deste radical também pode ocorrer pelo decaimento de ERN como o peroxinitrito e o ácido peroxinitroso ou pela reação envolvendo a mieloperoxidase e íons cloreto durante a fagocitose. Reações catalisadas por algumas enzimas como a monoamina oxidase e a L-aminoácido oxidase também produzem $\cdot\text{OH}$ (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001; Voet et al., 2008).



e) Radical lipoxila ($\text{LOO}\cdot$): esta espécie pode ser gerada através da ação do $\cdot\text{OH}$ sobre um lipídio (LH) gerando um radical lipídico $\text{L}\cdot$ (reação 9) que pode reagir com O_2 produzindo o radical lipoxila $\text{LOO}\cdot$ (reação 10). Este pode iniciar uma reação em cadeia agindo sobre outros lipídios, ácidos graxos, ésteres graxos e outras moléculas, levando ao processo conhecido como oxidação lipídica (Valko et al., 2007).

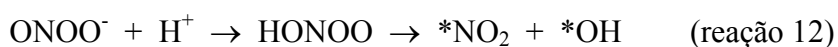


2.3 OUTRAS ESPÉCIES REATIVAS

Além das ERO, outras espécies reativas também podem ser observadas nos organismos vivos. Dentre elas, três podem ser destacadas.

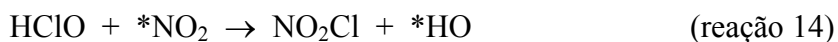
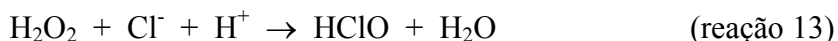
a) Espécies reativas do nitrogênio (ERN): o radical primário do nitrogênio é o $\cdot\text{NO}$ que possui um par de elétrons não emparelhados em orbital π antiligante. É normalmente produzido nos tecidos pela ação da eNOS (óxido nítrico sintetase endotelial) que metaboliza a L-arginina a citrulina com formação de $\cdot\text{NO}$ através de reação oxidativa envolvendo cinco elétrons (Ghafourifar & Cadenas, 2005). É encontrado em vários tipos de células e bem estudado no endotélio vascular onde exerce importante papel na regulação da pressão sanguínea e no relaxamento vascular pela ação sobre a guanilato ciclase das células vasculares lisas, iniciando a

casca que conduz à esta condição. O *NO atua como um importante sinalizador biológico oxidativo em processos como neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesas, relaxamento da musculatura lisa e regulação imunológica. Apresenta ainda propriedades antiproliferativas, inibe a adesão das plaquetas e dos leucócitos no endotélio vascular e afeta a transmissão neural e a plasticidade sináptica no sistema nervoso central. A produção aumentada deste radical é denominada estresse nitrosativo que pode provocar reações de nitrosilação, alterando a estrutura e as funções de proteínas (Ridnour et al., 2004). Apesar de não ser muito reativo, pode reagir com oxigênio molecular para formar *NO₂ ou com O₂⁻ (reação 11) produzindo a espécie extremamente reativa ONOO⁻ que pode levar à ocorrência de reações de nitroação e nitração. Adicionalmente, o radical ONOO⁻ pode reagir com dióxido de carbono, provocando danos às proteínas pela formação de nitrotirosinas. Em condições neutras ou alcalinas, o ONOO⁻ é estável, mas uma vez protonado em pH ácido, forma o ácido peroxinitroso que se decompõe em *NO₂ e a perigosa espécie *OH (reação 12). A presença do *NO em praticamente todos os tecidos combinada à sua facilidade de reagir com as ERO e outras moléculas assegura que ele faça parte de importantes reações oxidativas regulatórias. Esta espécie também é formada nos macrófagos ativados, sendo considerada o agente ativo em muitas patologias baseadas em inflamações. Em altas concentrações, pode agredir o endotélio vascular, formando lesões ateroscleróticas (Klein & Ackerman, 2003; Johansen et al., 2005; Pincemail, 2006).



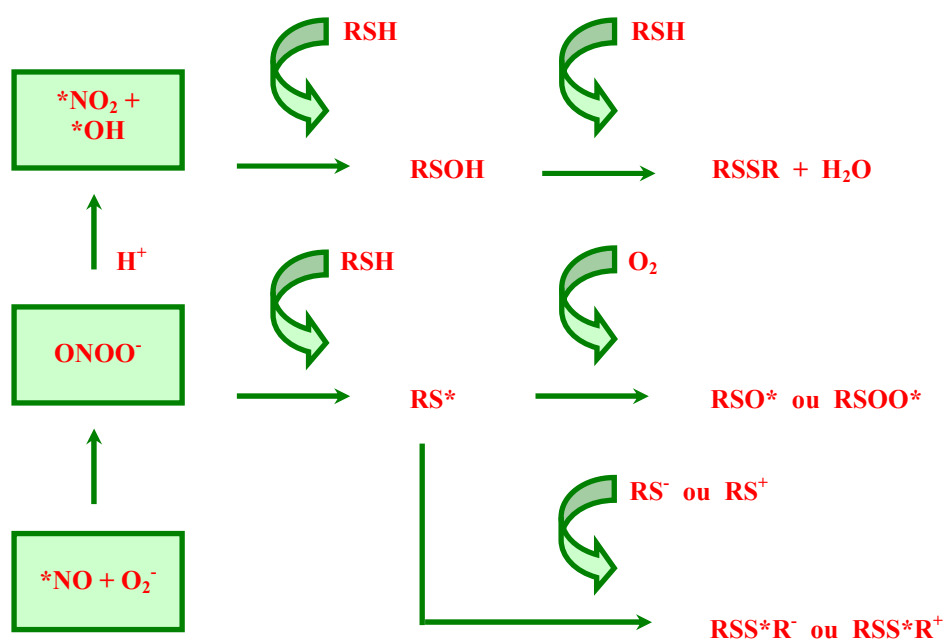
b) Espécies reativas dos halogênios (ERH): a mieloperoxidase (hemoproteína secretada nos neutrófilos e monócitos) forma um complexo com H₂O₂ que catalisa a oxidação dieletrônica do íon Cl⁻ para formar ácido hipocloroso (reação 13). Esta espécie atua na eliminação de microorganismos ingeridos pelos macrófagos, mas pode ser danosa aos tecidos próximos. Atua também na mediação inflamatória como agente oxidante e de cloração, podendo gerar outros metabólitos reativos como o cloreto de nitrila (NO₂Cl) e *OH na presença de *NO₂ (reação 14). Em menor escala,

reações semelhantes podem ser observadas com os íons dos outros halogênios como o Br^- e I^- (Evans & Halliwell, 2001; Leewenburgh & Heinecke, 2001).



c) Espécies reativas do enxofre (ERE): o átomo de enxofre pode apresentar número de oxidação entre -2 e +6, o que propicia a formação de uma extensa gama de ERE. Estas espécies reativas podem inibir sistemas redox, afetar a estrutura e a funcionalidade de proteínas e a atividade de enzimas. O ponto de partida para estes compostos geralmente são os tióis (RSH) como a cisteína e a glutatona que podem ser convertidos a tiil radicais (RS^*) pela doação de *H , por oxidação enzimática ou através de reações com ERO como *OH ou ERN como ONOO^- . Por sua vez, os RS^* podem ser transformados a radicais sulfinil (RSO^*), sulfonyl (RS^*OO), tiil peroxil (RSOO^*), pertiil (RSS^*), cátion sulfeto (RS^*R^+), ânion dissulfeto (RSS^*R^-) e sulfonyl peroxil (RSO_2OO^*), dentre outros (Giles & Jacob, 2002). Algumas rotas de produção das ERE são mostradas na figura 3, iniciando pela ação dos radicais *NO ou ONOO^- sobre tióis (Bonini & Augusto, 2001).

Figura 3 - Formação endógena de ERE (adaptada de Bonini & Augusto, 2001).



2.4 DEFESAS CONTRA AS ESPÉCIES REATIVAS

Devido aos enormes danos que podem ser causados pela atividade das espécies reativas, os sistemas biológicos tiveram de desenvolver alternativas defensivas para se proteger contra as mesmas. Para esta importante função, o processo evolutivo equipou os seres vivos com diferentes mecanismos que atuam utilizando substâncias antioxidantes de natureza endógena ou exógena, além de enzimas antioxidantes. Alguns exemplos de espécies reativas e seus respectivos agentes defensivos podem ser vistos no quadro 1 (Singh et al., 2004).

Quadro 1 - Principais ERO e respectivos agentes defensivos (Singh et al., 2004).

Espécie reativa do oxigênio (ERO)	Agentes defensivos endógenos		Agentes defensivos exógenos
	diretos	indiretos	
*OH	Glutaciona peroxidase (cofator Se)	...	Vitamina C e ácido lipóico
ROO* ou LOO*	Glutaciona peroxidase (cofator Se)	...	Vitamina E e β -caroteno
O ₂ ⁻	Superóxido dismutase (cofatores Cu/Zn/Mn)	Ceruloplasmina (Cu), metalotionina (Cu) e albumina (Cu)	Vitamina C
H ₂ O ₂ ou O ₂ ²⁻	Catalase (cofator Fe) e glutaciona peroxidase (cofator Se)	Transferrina (Fe), ferritina (Fe) e mioglobina (Fe)	Vitamina C, β -caroteno e ácido lipóico
Equilíbrio pró/antioxidante	Tióis (GSH e N-acetil-cisteína), NADPH, NADH e ubiquinona	Bilirrubina e ácido úrico	Flavonóides

a) Defesas endógenas enzimáticas

A vida em nosso planeta evoluiu inicialmente em um ambiente redutor e apenas com o aparecimento das algas fotossintetizadoras, o oxigênio começou a ser introduzido na atmosfera em quantidades crescentes. É surpreendente que poucas enzimas das rotas metabólicas modernas possam lidar com a molécula do O₂, apesar dos esquemas bioenergéticos serem quase totalmente dependentes dela. Por este

mesmo motivo, poucas rotas podem ser utilizadas para abater espécies reativas indesejadas, sendo que o meio mais eficiente para se atingir este objetivo é através de reações enzimáticas. Algumas enzimas antioxidantes evoluíram com esta finalidade, destacando-se a SOD, a Cat e a GPx (McCord, 2000).

A SOD é a enzima-chave na eliminação do O_2^- que é a espécie reativa primária formada a partir do oxigênio. Para agir corretamente, esta enzima requer a presença de oligoelementos como Cu, Zn e Mn. Dependendo da severidade do estresse oxidativo, a SOD exibe dois comportamentos diferentes: sob estresse moderado, o organismo aumenta a expressão de SOD mas, se o estresse se acentua, a SOD é destruída e sua concentração diminui. Nos humanos, a concentração plasmática normal de SOD é entre 780 e 1570 UI/g de proteína e seu excesso pode ser perigoso pois leva a superprodução de H_2O_2 (Pincemail, 2006). Humanos têm três genes codificadores para a SOD que atuam nas mitocôndrias, no citosol e nos espaços extracelulares. Estes derivam de dois genes ancestrais, sendo que um deles transcreve enzimas contendo Cu ou Zn enquanto que o outro codifica enzimas com Mn ou Fe. Estes genes ancestrais podem ser rastreados com alto grau de similaridade, em relação aos sítios ativos, nas formas de vida primitivas que evoluíram para sobreviver em ambiente cada vez mais oxidante (McCord, 2000).

A Cat é uma enzima presente no peroxissomo que promove, de maneira extremamente eficiente, a conversão de H_2O_2 e O_2^{2-} a água e oxigênio molecular, complementando a ação da SOD. Esta enzima tem uma das mais altas constantes de reação, uma vez que uma molécula de Cat pode reduzir aproximadamente 6 milhões de moléculas H_2O_2 ou íons O_2^{2-} por minuto. Muitas doenças como tumores apresentam reduzida capacidade de detoxificação frente a estas ERO em função da baixa concentração de Cat (Valko et al., 2006).

A GPx requer glutatona e acima de 60 $\mu\text{g/L}$ de selênio para atuar adequadamente. Sua função principal é abater H_2O_2 e peróxidos orgânicos resultantes da ação da SOD e do estresse oxidativo sobre lipídios e ácidos graxos insaturados. Seu comportamento em relação ao estresse oxidativo é semelhante ao exibido pela SOD (sobreexpressão e diminuição) e sua concentração plasmática normal nos humanos é de 30 a 55 UI/g de hemoglobina. Baixa atividade da GPx pode estar associada à falta de selênio na dieta (Pincemail, 2006).

A SOD, a Cat e a GPx são três enzimas primárias envolvidas na eliminação direta das ERO como o radical hidroxila, o íon monovalente superóxido e o peróxido de hidrogênio. Já a G6PD (glicose-6-fosfato dehidrogenase), a GR e a GST (glutathione-S-transferase) são enzimas secundárias que atuam na detoxificação das ERO pela redução da concentração do íon divalente peróxido ou mantendo um constante suprimento de metabólitos intermediários como a glutathione e a NADPH, imprescindíveis à eficiente atividade das enzimas antioxidantes primárias citadas acima (Singh et al., 2004).

Outra defesa enzimática importante é suprida pela tioredoxina redutase (TRxR) que atua em conjunção com a tioredoxina (TRx), a qual possui um grupo tiol que lhe confere atividade antioxidante intrínseca. Este par forma um sistema regulatório com forte característica redutora que age em diferentes processos relacionados com as ERO, podendo atuar na regeneração de diferentes moléculas antioxidantes incluindo a ubiquinona Q₁₀ e os ácidos L-ascórbico e α -lipóico ou degradar peróxidos lipídicos e H₂O₂. Compõem importante defesa contra as cardiomiopatias e atuam na regulação do sistema imunológico (Giordano, 2005).

b) Defesas endógenas não-enzimáticas

A segunda linha de defesa contra as espécies reativas é composta pelos antioxidantes endógenos não-enzimáticos. Podem ser incluídas nesta categoria a NADPH, a GSH, a ubiquinona, a bilirrubina, a histidina peptídeo, a transferrina, a ferritina, o ácido α -lipóico e seu derivado metabólico dihidrolipóico, a NADH (nicotinamida dinucleotídeo), o ácido úrico, a melatoína, a N-acetil cisteína, a ceruloplasmina e várias proteínas plasmáticas tiólicas, dentre outras (Singh et al., 2004; Johansen et al., 2005).

A defesa endógena não-enzimática mais importante é a GSH, que é o tiol de baixo peso molecular mais abundante no citosol (1 a 11 mM), no núcleo (3 a 15 mM) e nas mitocôndrias (5 a 11 mM). Uma vez que é sintetizada no citosol pela ação sequencial da glutamato-cisteína ligase e da glutathione sintetase, sua presença nas mitocôndrias requer um mecanismo de transporte através da membrana celular interna. Além de manter o estado redox dos grupos tiólicos das proteínas do núcleo

que são necessárias para a expressão e reparação do DNA, a GSH é um importante cofator para enzimas que atuam contra o estresse oxidativo como a glutathione transferase (GT) e a GPx. Além disto, participa do transporte de aminoácidos, atua na proliferação e apoptose celular, é importante na produção de citoquinas e na resposta imune, regenera diretamente a vitamina C e indiretamente a E, além de abater diretamente as espécies $\cdot\text{OH}$ e $^1\text{O}_2$ e indiretamente o H_2O_2 e as $\text{ROO}\cdot$ através da GPx. Acoplada à sua forma oxidada GSSG, é o mais importante par redox das células animal (Wu et al., 2004; Valko et al., 2007).

A NADPH é um antioxidante não-enzimático endógeno que realiza sua atividade defensiva conforme dois mecanismos. No primeiro caso, age como antioxidante de ação direta, abatendo as espécies oxidantes e impedindo suas rotas destrutivas. Este mecanismo assume que o radical derivado do antioxidante apresenta baixa ou nenhuma reatividade frente às biomoléculas e sistemas. No segundo caso, age como antioxidante de ação indireta regenerando as biomoléculas já oxidadas, sendo que este mecanismo também é denominado função de reparo. A NADPH apresenta concentração citosólica da ordem de 10^{-3} mM, atua na neutralização de espécies reativas como ONOO^- , $\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$ e $\text{GS}\cdot$ (radical glutatiil) além de participar como coenzima ou como substrato em diferentes processos protetores (Kirsch & DeGroot, 2001).

Estudos vêm mostrando que o ácido úrico é um poderoso neutralizador de radicais livres e que oferece proteção efetiva ao sistema cardiovascular. É o antioxidante endógeno não-enzimático mais abundante no meio aquoso e neutraliza cerca de 65% das espécies reativas $\cdot\text{OH}$, O_2^- e ONOO^- presentes no plasma, agindo na proteção contra a oxidação lipídica. Em vários tecidos, a concentração de ácido úrico aumenta durante o estresse oxidativo, por um mecanismo compensatório contra a atividade de radicais livres. Modelos de danos neurais isquêmicos mostraram que a adição de concentrações fisiológicas de ácido úrico protege os neurônios contra danos citotóxicos e metabólicos. Sob infarto agudo, a administração deste composto em ratos reduziu o volume e as conseqüências da ocorrência. Estudos recentes revelaram que a concentração sérica de ácido úrico após um derrame é inversamente proporcional ao tempo de melhora neurológica e à gravidade da ocorrência, independente da idade, uso de medicamentos ou condição renal (Waring, 2002).

Outro antioxidante endógeno não-enzimático importante é o ácido α -lipóico que tem característica hidrofílica mas pode exercer atividade protetora em meios aquosos e lipídicos. Pode ser reduzido ao ânion dihidrolipoato que também apresenta característica antioxidante e que pode regenerar importantes moléculas como as vitaminas C e E, assim como reduzir a GSSG a GSH. O ácido α -lipóico é produzido em pequenas quantidades nas células dos humanos a partir do piruvato gerado na metabolização dos carboidratos, mas pode também ser absorvido através da alimentação (Johansen et al., 2005).

A ubiquinona (coenzima Q_{10}) é um dos componentes críticos da atividade mitocondrial, transferindo elétrons do complexo I (NADH dehidrogenase) ou do complexo II (succinato dehidrogenase) para o complexo III (citocromo bc_1). Fora da mitocôndria, age como antioxidante lipossolúvel capaz de neutralizar diretamente radicais lipoperoxílicos e indiretamente os radicais do α -tocoferol, podendo ainda abater espécies reativas do ânion ascorbato extracelular. Esta molécula é composta de uma cadeia hidrofóbica isoprenóide que a fixa à membrana e um grupo quinona que é o responsável pela sua atividade (Jonassen & Clarke, 2000).

c) Defesas exógenas

Além das linhas de defesa endógenas, os organismos são auxiliados contra as reações oxidativas pelos antioxidantes exógenos (naturais ou sintéticos) obtidos através da alimentação. Dentre as várias definições já apresentadas, antioxidantes são substâncias que atuam inibindo ou reduzindo a taxa de oxidação sobre algum substrato, agindo em baixas concentrações em relação ao mesmo pois, em altas concentrações, podem agir como pró-oxidantes (Vicente, 2002). Baseado na atuação protetora, os antioxidantes podem ser classificados em três categorias.

Primários: atuam principalmente como inativadores de radicais livres, doando cátion hidrogênio ou elétron para formar espécies menos agressivas às biomoléculas.

Secundários: agem principalmente na decomposição de radicais livres oxigenados como ROO^* e RO^* , gerando produtos menos reativos e mais estáveis.

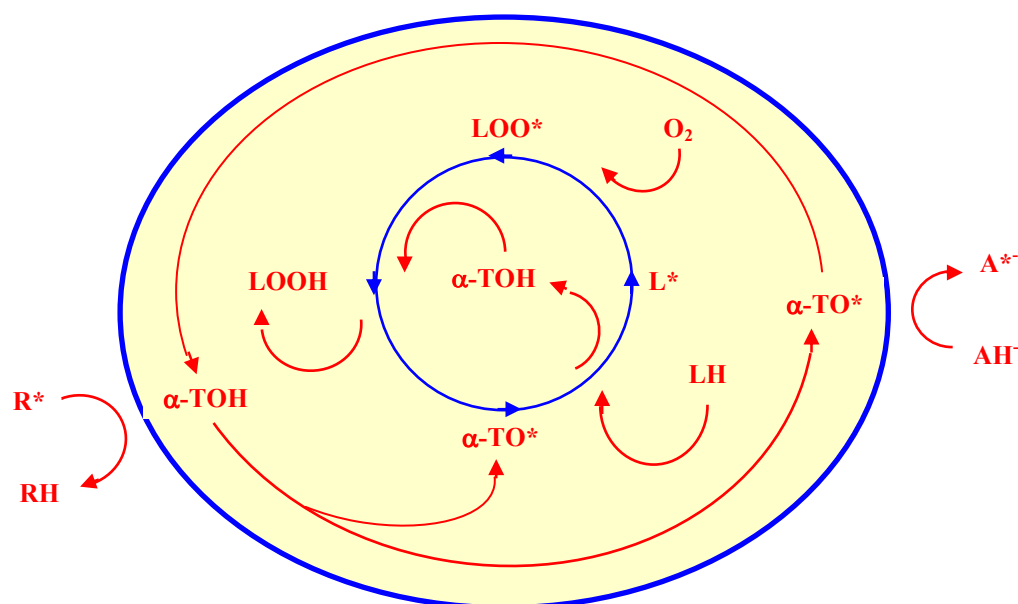
Sinergísticos: eliminam o O_2 de ambientes fechados como das embalagens ou sequestram íons metálicos pró-oxidantes impedindo suas ações na etapa de iniciação.

A vitamina C (ácido L-ascórbico) não é sintetizada no organismo humano e sua concentração plasmática depende da dieta diária pois, por ser hidrossolúvel, tende a ser rapidamente excretada pela urina. É um excelente abatedor de ERO e pode proteger substratos biológicos como proteínas, ácidos graxos e DNA da oxidação. Em concentrações fisiológicas, a vitamina C evita a oxidação da LDL (lipoproteína da baixa densidade) e a formação de células espumosas relacionadas à aterosclerose. O radical ascorbila, intermediário da oxidação do ácido L-ascórbico a ácido dehidroascórbico, tem um papel importante na cascata que regenera a vitamina E de sua forma oxidada. A concentração plasmática normal de vitamina C é de 6,2 a 15,2 mg/L para homens e 8,6 a 18,8 mg/L para mulheres, mas a mesma é prontamente consumida na presença do estresse oxidativo, sendo que concentrações abaixo de 4,0 mg/L são associadas ao risco de moléstias cardiovasculares (Pincemail, 2006).

A vitamina E é composta por oito moléculas (quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis) que apresentam atividades biológicas semelhantes ao α -tocoferol. Apresenta concentração plasmática entre 8 e 15 $\mu\text{g/mL}$ nos humanos, sendo o mais importante antioxidante lipossolúvel. Exibe poderosa proteção contra o estresse oxidativo, atuando na desativação de espécies altamente reativas como RO^* e ROO^* que podem propagar a oxidação lipídica. Além de antioxidante, exibe importante ação preventiva contra a aterosclerose evitando a oxidação da LDL, o que reduz a formação das placas ateroscleróticas. Entretanto, concentrações supra-fisiológicas de vitamina E, normalmente alcançadas por suplementação inadequada, revertem este quadro defensivo, passando a exibir atividade pró-oxidante sobre os lipídios da LDL (figura 4). Através de um processo seqüencial, a ação de um radical livre (R^*) sobre o α -tocoferol (α -TOH) transforma-o em radical α -tocoferoxila (α -TO *). Este abstrai H^* de um lipídio (LH), transformando-o em radical lipídico (L *) que pode reagir com O_2 para produzir o radical lipoxila (LOO *). Este último pode reagir com outra molécula de α -tocoferol gerando um hidroperóxido lipídico (LOOH) e um novo radical α -tocoferoxila que reinicia o processo. O ânion ascorbato (AH^-) pode inibir esta seqüência ao fornecer H^* ao α -TO * , regenerando o α -TOH e transformando-se

em radical ascorbila ($A^{\cdot-}$). Por reduzir o estresse oxidativo, a vitamina E facilita a síntese de EDNO (óxido nitroso endotélio-derivado) que é um antiaterogênico potente que atua estimulando a vasodilatação e reduzindo a agregação das plaquetas e a ação dos leucócitos. A vitamina E também melhora o sistema imune, protegendo contra doenças não-cardiovasculares como o câncer da próstata. Estudos já mostraram que células endoteliais previamente tratadas com concentrações fisiológicas de α -tocoferol apresentaram menor adesão de monócitos a elas (Carr et al., 2000; Pryor, 2000).

Figura 4 - Ação pró-oxidante do α -tocoferol na LDL (adaptada de Carr et al., 2000).



Vários estudos já mostraram uma forte associação inversa entre a ingestão de polifenóis e a ocorrência de eventos cardiovasculares, através da inibição da agregação das plaquetas. Esta ação parece estar relacionada ao reforço do estado redox, em função da capacidade antioxidante destas substâncias. Adicionalmente, polifenóis podem reduzir a produção de $O_2^{\cdot-}$ pela inibição da NADPH oxidase que é uma das enzimas-chave na produção desta espécie. Este fato decorre da supressão da atividade da PKC que participa da ativação da enzima citada. Nos humanos, a concentração plasmática normal de polifenóis é inferior a $1 \mu\text{M}$ mas, após uma refeição rica destas substâncias, pode chegar a $5 \mu\text{M}$ (Pignatelli et al., 2006).

Dentre os compostos bioativos, também podem ser citados os carotenóides. Frutas, vegetais com cores entre laranja e vermelho e verduras verde-escuro provêm os carotenóides necessários ao organismo humano como α e β -caroteno, luteína, criptoxantina, zeaxantina e licopeno. Além da atividade pró-vitamina A, apresentam efeitos benéficos como aumento da resposta imune e redução do risco das DCNT como câncer da próstata, mama, pulmão e trato digestório. Exercem efetiva proteção contra desordens oftalmológicas (catarata e maculopatia), além de auxiliar na prevenção contra doenças cardiovasculares pela capacidade de inativar a espécie altamente reativa $^1\text{O}_2$ e reduzir vários radicais livres. Estudos mais recentes estão associando estes compostos a diversos mecanismos como crescimento celular, modulação do metabolismo carcinógeno, inibição da proliferação celular, sinalização da comunicação de junção célula-célula, incremento da diferenciação e apoptose celular além da indução da transcrição gênica de enzimas antioxidantes (Stahl et al., 2002; Sentanin & Amaya, 2007).

Além das substâncias já citadas, vários micronutrientes participam das defesas antioxidantes. O zinco é necessário a mais de duzentas enzimas, estabiliza a membrana celular deslocando metais de transição e prevenindo a oxidação lipídica, atua na regeneração da GSH e evita a oxidação da LDL, proteínas e DNA. O magnésio está ligado a vários processos fisiológicos incluindo reações envolvendo o ATP e sua deficiência potencializa danos isquêmico-reperfusivos, aumenta a susceptibilidade à peroxidação lipídica, à retinopatia e aos problemas neonatais como a enterocolite necrosante e a displasia broncopulmonar, sendo que 80% deste íon é acumulado no último trimestre da gestação. O manganês participa de várias enzimas envolvidas na biosíntese de ácidos graxos e colesterol, de processos mitocondriais (Mn-SOD) e protege contra oxidação lipídica, anormalidades cardíacas, acúmulo de gorduras no fígado e músculos esqueléticos assim como da acidose metabólica. Apesar de concentrações supra-fisiológicas de ferro agirem na direção do estresse oxidativo, a sua deficiência está associada à formação de ERO, à tumorigênese, ao aumento da sensibilidade a diversos agentes oxidativos nos eritrócitos, às deficiências neurocomportamentais pela alta necessidade deste íon no tecido cerebral e à anemia, provocando a elevação das concentrações de etano na expiração e de malonaldeído nos tecidos hepático e renal, os quais são marcadores específicos da

peroxidação lipídica. Finalmente, o cobre participa da composição de várias enzimas e age como cofator para outras, sendo necessário à ceruloplasmina que armazena ferro na transferrina, inibe a hipertrofia cardíaca e reduz a formação de radicais livres como a proteína-carbonila (Evans & Halliwell, 2001).

Outros antioxidantes naturais, conhecidos como fitonutrientes ou fotoquímicos, estão aumentando suas participações na nutrição e na terapêutica e, dentre eles, destacam-se os flavonóides que são compostos polifenólicos. São largamente encontrados como derivados glucosilados em várias plantas, sendo responsáveis por padrões coloridos como azul, laranja e vermelho. Estão presentes em folhas, flores, frutas, sementes, castanhas, grãos, especiarias, plantas medicinais e bebidas como os vinhos e os chás. Os flavonóides exibem efeitos benéficos contra tumores, isquemias, alergias, hepatotoxicidades e inflamações, além de inibir enzimas oxidantes como lipoxigenase, ciclooxigenase, monooxigenase, GST, XOS, NADH oxidase, succinoxidase mitocondrial, fosfolipase A2 e proteína quinase. Estas propriedades são atribuídas às suas características antioxidantes e eliminadoras de radicais livres, mas as mesmas dependem primariamente das suas estruturas e grupos funcionais. Também exibem propriedades quelantes que reduzem a ação de metais pró-oxidantes (Pietta, 2000; Gale, 2001).

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO

Nos indivíduos saudáveis, o balanço entre as espécies reativas e as defesas antioxidantes pende ligeiramente em favor das primeiras, de modo que estas possam existir para desempenhar as suas funções biológicas. Nesta situação, os sistemas reparadores se encarregam de sanar pequenos danos que possam ocorrer através de reações oxidativas indesejadas. Quando acontece uma mudança significativa em favor das espécies reativas, instala-se a condição denominada estresse oxidativo que pode advir da má alimentação (falta de antioxidantes e micronutrientes exógenos), infecções, atividade física extenuante com o aumento da produção de espécies reativas, exposição a agentes exógenos (solventes, ozônio, pesticidas, radiações etc.), uso indevido ou exagerado de medicamentos e hábitos comportamentais nocivos como o tabagismo e o alcoolismo (Evans & Halliwell, 2001).

Espécies reativas devem existir em concentrações baixas mas mensuráveis nas células, sendo esta condição determinada pelo balanço entre as taxas de produção e remoção das mesmas. Cada tipo de célula apresenta um estado redox particular que caracteriza o seu perfeito funcionamento. Em condições normais, este estado é mantido dentro de uma estreita faixa, de modo similar à regulação do pH nos sistemas biológicos. Uma variação de apenas 30 mV no estado redox das células pode significar um aumento de até dez vezes na razão entre as espécies oxidantes e redutoras. Esta homeostase redox intracelular (ou tampão redox) é regulada primariamente pelas formas reduzidas da GSH e da TRx que são mantidas pela ação da GSH redutase e da TRx redutase em contraposição ao estresse oxidativo (Dröge, 2002; Valko et al., 2007).

Um dos tecidos mais vulneráveis ao estresse oxidativo é o sistema nervoso (cérebro, medula espinhal e nervos periféricos) que é rico em ferro e ácidos graxos insaturados. O alto conteúdo lipídico combinado à grande atividade metabólica aeróbia torna este tecido particularmente suscetível aos danos oxidativos. Adicionalmente, o cérebro é rico em catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina) que podem sofrer reações auto-oxidativas gerando radicais livres ou ser metabolizadas a estas espécies pela monoamina oxidase (MAO). Uma das regiões mais vulneráveis é a substância negra, na qual a redução da atividade antioxidante já foi associada à degeneração do tecido. Estudos já mostraram que antioxidantes como a GSH, a vitamina E, o ácido úrico e o β -caroteno podem proteger o tecido nervoso do estresse oxidativo e, diante deste fato, a associação de diversos distúrbios neurovegetativos com o estresse oxidativo já é bastante aceita (Contestabile, 2001; Singh et al., 2004).

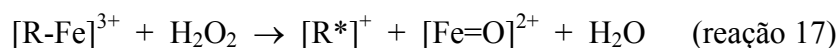
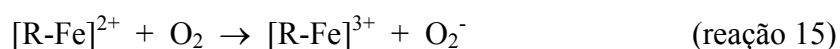
Várias situações podem iniciar ou agravar o estresse oxidativo como as alterações na cadeia do transporte eletrônico mitocondrial que ocorrem durante o processo de envelhecimento ou situações de isquemia-reperfusão geradas, por exemplo, durante o transplante de órgãos. A ativação das células brancas do sangue também é uma importante fonte de espécies reativas. Quando submetidas à ação de agentes invasores, estas células passam do estado latente para o ativo, resultando no aumento de até 400% no seu consumo de O_2 . Vários sistemas enzimáticos podem produzir ERO, as quais acabam atacando tecidos saudáveis e desenvolvendo a condição

denominada inflamação. Diversos outros mecanismos contribuem para o estresse oxidativo como a ativação da XOS, a oxidação da hemoglobina, a liberação de ferro, o metabolismo da prostaglandina, a ativação de células endoteliais e a oxidação da homocisteína, sendo esta última um importante fator de risco para infarto do miocárdio e derrame cerebral, pois a homocisteína oxidada apresenta sério efeito citotóxico para as células endoteliais. Muitas destas situações poderiam ser evitadas ou minimizadas pela ingestão de frutas, verduras e legumes que são fontes ricas em antioxidantes exógenos como as vitaminas A, C e E, oligoelementos, polifenóis etc., mas estudos epidemiológicos já mostraram que mais de 20% da população dos países industrializados nunca consome estes alimentos, praticando dietas pobres sob o ponto de vista antioxidante (Pincemail, 2006).

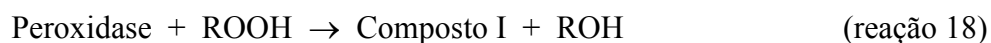
Uma vez que é impossível evitar a formação de espécies reativas, não chega a ser surpreendente a diversidade das defesas antioxidantes desenvolvidas pelos seres vivos. Entretanto, considerando que as mesmas são limitadas, o aumento na produção de espécies reativas ou a queda destas defesas por motivos variados, podem causar o desbalanceamento do equilíbrio pró e antioxidante, levando ao estresse oxidativo. Há claras indicações que os exercícios físicos praticados em quantidade ou intensidade inadequada levam a esta condição. Durante estes exercícios, há grande liberação de hormônios catecolamínicos, cuja auto-oxidação pode produzir radicais livres. Danos musculares causam inflamações e liberação de O_2^- através da NADPH oxidase. Porém, a fonte mais importante de ERO durante os exercícios físicos é a produção de O_2^- mitocondrial através de reações laterais da flavina e da ubisemiquinona com O_2 , uma vez que a demanda por esta última substância aumenta em até cem vezes nos músculos ativos (Cooper et al., 2002).

Uma segunda rota de produção de radicais livres relacionada aos exercícios físicos envolve a ocorrência de isquemia-reperfusão transiente. Exercícios intensos provocam uma situação de hipoxia momentânea em vários órgãos como os rins e o fígado, a fim de suprir a demanda aumentada para os músculos esqueléticos ativos e a pele. Cessado o exercício, a reoxigenação destes tecidos ocorre naturalmente, levando à produção de ERO pela ação da xantina dehidrogenase e da XOS sobre a hipoxantina, convertendo-a inicialmente a xantina e posteriormente a urato (Vina et al., 2000).

Finalmente, sob a mesma condição de exercício intenso, a hemoglobina e a mioglobina podem sofrer reações oxidativas, gerando várias ERO. A oxidação destas hemoproteínas sob alta pressão parcial de O₂ leva a produção de O₂⁻ (reação 15) e subsequente formação de H₂O₂ (reação 16). O peróxido de hidrogênio formado pode reagir com a forma férrica das hemoproteínas (reação 17) para gerar dois poderosos oxidantes, o íon ferril (Fe=O)²⁺ e o radical proteína livre (R*⁺), o que intensifica o estresse oxidativo já estabelecido pelos outros mecanismos citados (Alayash et al., 2001; Reeder & Wilson, 2001).



Outra possível rota para a instalação do estresse oxidativo vem do metabolismo de medicamentos através da ação do citocromo P450 e das peroxidases. Estas últimas são enzimas que catalisam uma enorme variedade de reações de oxidação sobre compostos xenobióticos (XOH). Em uma primeira etapa, a peroxidase reduz um hidroperóxido (ROOH) ao álcool correspondente (ROH), produzindo sua forma oxidada denominada Composto I (reação 18). Vários xenobióticos podem ser oxidados pelo Composto I, formando um radical livre (XO*) e a forma reduzida da peroxidase (Composto II⁻). Esta última pode reagir com nova molécula de xenobiótico, regenerando a peroxidase, liberando outro radical XO* e água (reação 20), com o reinício do ciclo (Tafazoli & O'Brien, 2005).



A literatura é rica em exemplos de drogas não-abusivas suscetíveis ao metabolismo via reações de oxiredução. Por este motivo, muitos pesquisadores têm proposto que o estresse oxidativo é um importante componente da toxicidade causada pelo uso indevido de medicamentos. A formação de subprodutos reativos

como H_2O_2 e O_2^- resulta em maior consumo de GSH que é uma das defesas redutoras mais importantes. Este fato pode agravar ainda mais o estresse oxidativo, afetando vários fatores de transcrição e sistemas sinalizadores controlados por eventos redox (Guengerich, 2006).

2.6 DOENÇAS ASSOCIADAS ÀS ESPÉCIES REATIVAS

Como citado por Kirsch & DeGroot (2001), estudos têm mostrado que o processo normal de envelhecimento está diretamente relacionado a alterações nos ácidos nucleicos, moléculas biológicas e tecidos, em função da presença excessiva de espécies oxidantes como ROO^* , $^*\text{OH}$ e NO_2^* produzidas pelo estresse oxidativo. Quando as mesmas não são neutralizadas pelas defesas antioxidantes e os danos não são corrigidos pelos mecanismos reparadores, também podem ocorrer alterações que resultam nas DCNT como câncer, distúrbios neurovegetativos, aterosclerose, diabetes e catarata.

As patologias associadas ao estresse oxidativo podem ser divididas em dois grupos principais. O primeiro, denominado estresse oxidativo mitocondrial inclui as doenças caracterizadas pelo deslocamento para a direção pró-oxidante do estado redox tiol/dissulfeto, podendo ser citadas o câncer e o diabetes. O segundo grupo engloba as condições oxidativas inflamatórias que aumentam a atividade da NADPH oxidase ou da XOS, sendo exemplos a aterosclerose e as inflamações crônicas (Valko et al., 2007).

Estudos indicam que as reações oxidativas estão ligadas aos mecanismos patofisiológicos primários e secundários das DCNT. Uma importante evidência desta ligação são os biomarcadores de estresse oxidativo que consistem de produtos de oxidação que podem ser dosados nos tecidos e/ou fluídos biológicos, a fim de se detectar diferenças de concentração entre as condições normais, patogênicas ou de intervenções terapêuticas. Uma vez que a maioria destes biomarcadores são moléculas relativamente estáveis, torna-se evidente a vantagem da dosagem dos mesmos em detrimento das espécies reativas que os originaram, pois estas últimas podem ter meia-vida extremamente curta. Como exemplo, o processo de peroxidação lipídica pode ser acompanhado pela dosagem de malonaldeído (MDA), 2-propenal

(acroleína) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE). Outros importantes biomarcadores que podem ser utilizados são 8-hidroxi-20-deoxiguanosina (8-OH-dG) que estima o índice de danos oxidativos ao DNA, concentração de GSH ou razão GSH/GSSG que indica estresse oxidativo, 3-nitrotirosina (NO₂-Tyr) que assinala reações nitrosativas e carbonilproteínas associadas à oxidação de moléculas protéicas. O quadro 2 sumariza alguns dos biomarcadores de oxidação mais utilizados e as doenças a eles associadas (Barnham et al., 2004; Dalle-Donne et al., 2006).

Quadro 2 - Biomarcadores associados a algumas das doenças humanas de origem oxidativa (Dalle-Donne et al., 2006).

Doenças	Biomarcadores
Câncer	GSH/GSSG, 8-OH-dG, NO ₂ -Tyr, proteínas carboniladas, proteínas S-glutationiladas.
Problemas cardiovasculares	HNE, acroleína, NO ₂ -Tyr, F ₂ -IsoPs, Cl-Tyr, Di-Tyr.
Esclerose lateral amiotrófica	MDA, GSH/GSSG, NO ₂ -Tyr, proteínas carboniladas.
Lúpus	F ₂ -IsoPs.
Artrite	F ₂ -IsoPs, NO ₂ -Tyr, GSH/GSSG, proteínas carboniladas.
Alzheimer	MDA, HNE, GSH/GSSG, F ₂ -IsoPs, proteínas carboniladas, NO ₂ -Tyr.
Mal de Parkinson	HNE, GSH/GSSG, proteínas carboniladas.
Fibrose cística	F ₂ -IsoPs, NO ₂ -Tyr, Cl-Tyr, Di-Tyr, proteínas carboniladas.
Catarata	Proteínas S-glutationiladas, proteínas carboniladas, Di-Tyr, GSH/GSSG.
Asma	MDA, F ₂ -IsoPs, NO ₂ -Tyr, Cl-Tyr, proteínas carboniladas, GSH/GSSG.
Diabetes	GSH/GSSG, NO ₂ -Tyr, F ₂ -IsoPs, proteínas S-glutationiladas, MDA.

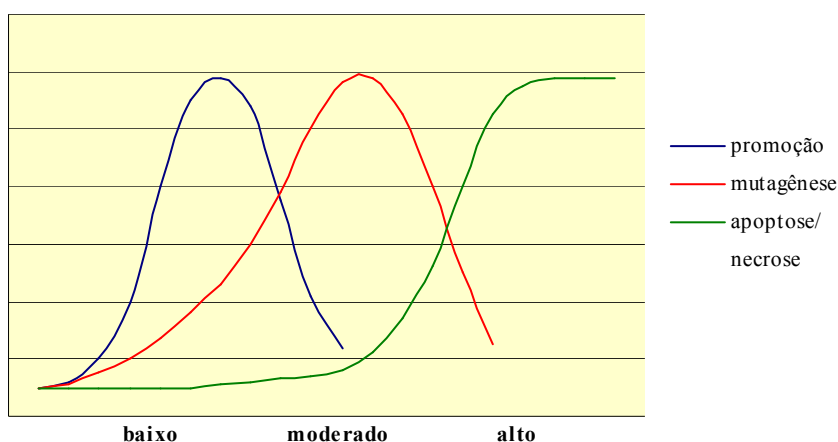
Notas: GSH = glutationa reduzida, GSSG = glutationa oxidada, 8-OH-dG = 8-hidroxi-20-deoxiguanosina, MDA = malonaldeído, NO₂-Tyr = 3-nitrotirosina, F₂-IsoPs = F₂-isoprostana, Cl-Tyr = 3-clorotirosina, Di-Tyr = σ,σ' -ditirosina, HNE = 4-hidroxi-2-nonenal.

Pela extensão do assunto, apenas algumas das DCNT e suas relações com as espécies reativas estão descritas a seguir.

a) Câncer: como relatado na literatura (Valko et al., 2006; Valko et al., 2007), o estresse oxidativo induz um desbalanceamento redox já identificado em vários tipos de células cancerosas, relacionando o estado pró-oxidante à estimulação oncogênica. Modificações permanentes do material genético resultantes deste tipo de agressão representam a primeira etapa envolvendo a mutagênese e carcinogênese. Mais de cem derivados oxidados do DNA já foram identificados incluindo quebras das fitas (simples ou dupla), modificações nas bases purínicas e pirimidínicas, alterações na desoxirribose e ligações cruzadas. Estas alterações podem resultar na indução ou interrupção da transcrição, alterar as rotas de transdução de sinais, provocar erros na replicação e causar instabilidade genômica, sendo que todos estes fatores podem ser associados a carcinogênese. O produto mais extensivamente estudado é o 8-OH-dG pois é relativamente fácil de ser formado, atuando como biomarcador para alterações no DNA. Vários metais pró-oxidantes incluindo ferro, cádmio, cromo VI e arsênio, também já mostraram propriedades carcinogênicas. O estresse oxidativo é uma agressão dose-dependente sobre o processo de promoção tumoral, mutagênese, apoptose e necrose, como visto na figura 5.

Figura 5 - Promoção tumoral pelo estresse oxidativo (Valko et al., 2007).

Estresse oxidativo e etapas do câncer



b) Esclerose lateral amiotrófica (ALS ou doença de Lou Gehrig): os indivíduos acometidos por esta doença hereditária apresentam mutação na SOD que passa a atuar como uma peroxidase. A ausência desta defesa enzimática facilita a instalação do estresse oxidativo, refletindo na oxidação de lipídios e causando a degeneração motora característica da doença. Pesquisas das condições debilitantes da ALS têm sido auxiliadas pela obtenção de camundongos geneticamente modificados que possuem o gene para a transcrição da SOD humana mutante. Desta forma, testes com compostos que podem amenizar os efeitos da ALS já estão sendo realizados *in vivo* (Barnham et al., 2004; Voet et al., 2008).

c) Doença de Alzheimer (AD): é a forma mais comum de desordem mental e afeta mais de 10% da população mundial de 65 e mais anos, sendo caracterizada pela degeneração progressiva dos neurônios e declínio da cognição, memória e intelecto. Estudos têm sugerido que a AD pode estar relacionada à toxicidade do β -peptídeo amilóide (principal componente das placas senis encontradas no cérebro dos pacientes) formado pela ação de radicais livres. Existem muitas evidências que indicam o envolvimento de mecanismos inflamatórios induzidos por citocinas como a TNF- α (“tumour necrosis factor α ”). A hipótese da ação de radicais livres é bem aceita por vários motivos: o metabolismo cerebral requer grandes quantidades de oxigênio aumentando as chances de formar espécies oxidantes, os neurônios são particularmente sensíveis a ataques por radicais livres pelo seu baixo conteúdo de GSH e alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, pela presença de traços dos íons metálicos Fe, Cu, Zn e Al no cérebro de pacientes acometidos pela doença que são capazes de catalisar a formação de radicais livres, pela relação da doença com anomalias mitocondriais (particularmente do citocromo oxidase) que poderiam explicar a presença anormal de radicais livres no tecido, pelo fato do envelhecimento ser o principal fator de risco acumulando os efeitos dos ataques de radicais livres e pela constatação que o uso clínico de eliminadores de radicais livres (vitamina E e C, *Ginkgo biloba* etc.) ou eliminadores de íons metálicos (EDTA, citratos etc.) serem bem sucedidos no tratamento. Já foi verificado que a esfingomiélin e seu produto metabólico ceramida estão ligadas ao processo de apoptose neural e agravamento da AD (Alessenko et al., 2004).

d) Diabetes: conforme Johansen et al. (2005), existem evidências crescentes que o excesso de radicais livres altamente reativos relacionados com a hiperglicemia pode resultar no desenvolvimento e progressão do diabetes e suas complicações. Evidência bioquímica desta relação é fornecida pela presença dos biomarcadores F_2 -IsoPs e NO_2 -Tyr, tanto no plasma como na urina dos pacientes diabéticos. Diversas fontes não-enzimáticas de estresse oxidativo são originadas no metabolismo da glicose gerando, principalmente, as espécies O_2^- e $*OH$. Outro fato adicional é a formação de AGEs (produtos finais de glicação avançada) através da reação da glicose com certas proteínas. Também já é sabido que a hiperglicemia acarreta o aumento da atividade da NADPH oxidase e da XOS, levando à excessiva produção enzimática de O_2^- . Estudos já mostraram a relação entre a hiperglicemia e o aumento da produção de O_2^- mitocondrial através do complexo II da cadeia respiratória, sendo verificado que o uso de antioxidantes é bem mais efetivo na etapa de prevenção do que nas intervenções terapêuticas desta doença.

e) Esquizofrenia: Singh et al. (2004) descreveram que há fortes evidências da relação direta deste distúrbio com a sobrecarga de radicais livres, pois elevadas taxas de peróxidos lipídicos são encontradas no sangue de pacientes esquizofrênicos. Foi também detectado o aumento de pentano (biomarcador de peroxidação lipídica) na expiração dos mesmos quando comparados a voluntários saudáveis ou a portadores de outras doenças psiquiátricas. A atividade da SOD é frequentemente encontrada aumentada, possivelmente em função de resposta adaptativa à sobrecarga de radicais livres nos pacientes esquizofrênicos. Estudos sobre tratamentos com antioxidantes têm sido raros e contraditórios. Uma vez que os níveis de GSH são reduzidos nos portadores desta condição, estudos clínicos com antioxidantes incluindo selênio e precursores de GSH estão sendo avaliados.

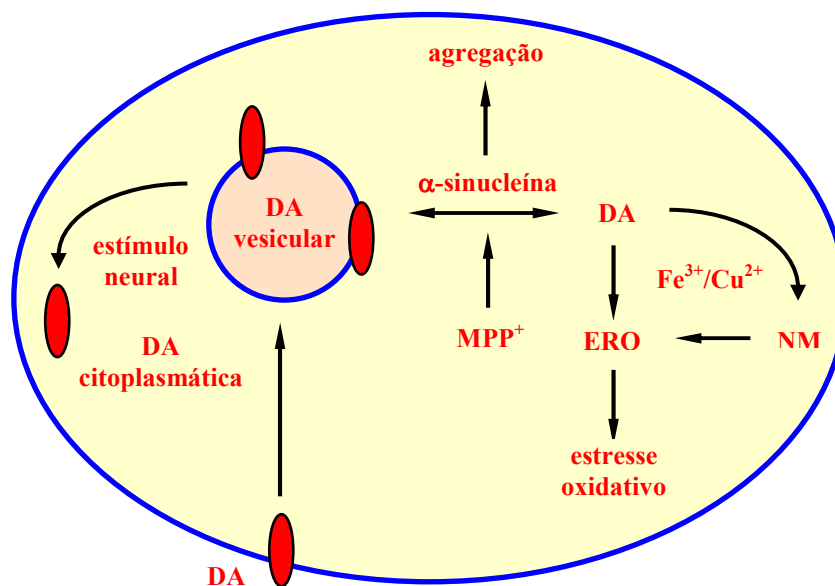
f) Doenças cardiovasculares: na revisão de Carr et al. (2000) é citado que o estresse oxidativo é um importante fator de risco para este grupo de doenças. Estudos observacionais têm demonstrado claras associações inversas entre a ingestão de antioxidantes e o risco de doenças cardiovasculares. Sob condições oxidantes, a LDL se converte na sua forma oxidada (ox-LDL), que está associada à aterosclerose. Esta

é absorvida por macrófagos, levando a formação de células espumosas. A adesão de leucócitos ao endotélio vascular também é importante na etapa inicial da aterogênese. Ensaio *in vitro* realizados com culturas de células endoteliais têm mostrado que monócitos podem se ligar a áreas aórticas pré-lesionadas através da expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1), VCAM-1 (molécula de adesão vascular 1) e E-selectina. Também foi observado que monócitos dos fumantes, que apresentam baixas concentrações plasmáticas do íon ascorbato, exibem maior adesão ao endotélio vascular que monócitos de pessoas não-fumantes. Outro fator importante é a síntese da EDNO que é uma das moléculas-chave na regulação do tônus vascular e da homeostase. Sua síntese utiliza L-arginina através da ação da NO sintetase que é dependente da concentração de NADPH e de cofatores como flavina-adenina dinucleotídeo, flavina mononucleotídeo, tetrahidrobiopterina e tióis. Todas estas moléculas são sensíveis ao estresse oxidativo e, em particular, à presença de O_2^- .

g) Mal de Parkinson (PD): em termos bioquímicos e fisiológicos, esta doença neurodegenerativa está associada à perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra e à deposição de corpúsculos de inclusão intracelular, cujo principal componente protéico é a α -sinucleína. Na revisão de Barnham et al. (2004), pode ser verificado que a dopamina (DA) é um neurotransmissor necessário ao funcionamento dos neurônios mas, por ser um catecol, também pode agir como quelante de metais e doador de elétrons, reduzindo os estados de oxidação do Fe^{3+} e do Cu^{2+} , gerando H_2O_2 e criando condições para a ocorrência de reações de Fenton. Quando ligada à vesícula, a DA é inerte sob o ponto de vista redox. O equilíbrio entre esta forma ligada e a forma livre no meio citoplasmático é regulada pela α -sinucleína. Alterações da α -sinucleína, inclusive as de natureza genética (A30P e A53T) que poderiam explicar o caráter hereditário da doença, levam a distúrbios na estocagem vesicular da DA, aumentando sua concentração no citoplasma e causando a geração de ERO através de reações com os íons férrico e cúprico. Também já foi verificado que a α -sinucleína regula a síntese da DA, inibindo a tirosina hidroxilase. Com o aumento da idade, os neurônios da substância negra podem passar a acumular a neuromelanina (NM) que é um produto derivado da química redox da dopamina. Em

baixas concentrações de íons ferro, esta molécula tem propriedades antioxidantes mas, em altas concentrações deste íon metálico, passa a atuar como pró-oxidante. Há várias evidências que o estresse oxidativo associado à PD pode ser o resultado de uma ruptura na regulação dopamina/neuromelanina/ferro, cujo mecanismo proposto pode ser visto na figura 6.

Figura 6 - Estresse oxidativo associado ao mal de Parkinson (Barnham et al., 2004).



2.7 CAFÉ E SUA INFLUÊNCIA NA SAÚDE HUMANA

a) Composição e produção mundial

Café, uma das “commodities” mais comercializada em termos globais, é a bebida não-alcoólica mais popular no mundo, totalizando cerca de 75% do volume consumido das mesmas. A planta do café pertence ao gênero *Coffea* e à família *Rubiaceae* sendo que, das mais de cem espécies conhecidas, apenas a *Coffea arabica* e a *Coffea canephora* variedade *robusta* apresentam interesse comercial. Conforme os apreciadores desta bebida, cafés contendo 100% de grãos da espécie *arabica* apresentam qualidade superior à *robusta* ou às misturas das duas. Os grãos verdes apresentam diversos mono, di e polissacarídeos, lipídios (75% na forma de triglicerídeos) e ácidos graxos livres, fitosteróis, terpenos e seus ésteres, tocoferóis e

tocotrienóis, proteínas e aminoácidos livres, xantinas (cafeína, teobromina e teofilina), compostos fenólicos (polifenóis, ácidos clorogênicos e ácidos fenólicos livres) e sais minerais (K, Mg, Ca, P, S, Zn, Cu, Ni e Fe, dentre outros). O teor médio de compostos fenólicos (livres ou associados) por xícara de 200 mL pode variar entre 200 e 550 mg, tornando esta bebida uma das mais importantes fontes nutricionais destes compostos. Após o processo de torra, podem ser observadas profundas alterações na sua composição química, principalmente em função da ocorrência de reações de Maillard, pirólises e reações de oxidação dos compostos sulfurados (Parras et al., 2007).

A produção mundial de café na safra 2004-2005 alcançou 116.244.000 sacas de 60 quilos, equivalente a quase 7 milhões de toneladas, divididos em cerca de 65% da espécie *arabica* e 35% da *robusta*. O Brasil participou com aproximadamente 35% do total mundial, contabilizando 41.050.000 sacas de 60 quilos ou cerca de 2,5 milhões de toneladas (Licht, 2008).

b) Atividades metabólicas das substâncias do café

O café é a maior fonte alimentícia de ácidos clorogênicos e sua ingestão oferece vários benefícios como redução do risco de problemas cardiovasculares, diabetes tipo 2 e doença de Alzheimer. Além disto, o café apresenta qualidades tonificantes que ativam o sistema nervoso central, aumentam a percepção e reduzem a fadiga (Farah & Donangelo, 2006; Farah et al., 2008).

Estudos sobre a associação do café com as DCNT têm produzido resultados contraditórios e este fato pode estar relacionado ao método de preparação. Como exemplo, é citado que o consumo de café fervido com a água pode provocar aumento da concentração plasmática de colesterol em até 10% em função da ingestão de compostos diterpênicos como o cafestol e o kawool, com conseqüências perigosas à saúde humana. Este fato não acontece com o café filtrado em papel que retém estas substâncias (Sánchez-González et al., 2005).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um alcalóide que totaliza de 0,9 a 2,5% da composição base seca do café. Apesar de ser amplamente consumida e estudada, os resultados sobre seus efeitos benéficos ou adversos têm sido inconclusivos. Baixa a

moderada ingestão de cafeína é associada à melhora na atenção, capacidade de aprendizado, desempenho físico e humor, sendo usada também em medicamentos analgésicos. Entretanto seus efeitos estimulantes podem afetar, de maneira adversa, pessoas sensíveis causando taquicardia, aumento da pressão arterial, ansiedade e insônia. Doses maiores parecem estar associadas à calcinúria (perda aumentada de cálcio através da urina) e hipercolesterolemia (Farah et al., 2006). Por estes e outros motivos, pessoas buscando um estilo de vida mais saudável estão optando por cafés descafeinados que já totalizam mais de 10% do mercado mundial. A descafeinização é realizada antes da etapa de torra, utilizando solventes seletivos como diclorometano ou acetato de etila pois a água, além de reduzir a cafeína, remove também outros compostos hidrossolúveis como os ácidos fenólicos e clorogênicos, além de vários polifenóis. Ao final deste processo, o teor de cafeína é reduzido para a faixa entre 0,02 e 0,30% (Silvarola et al., 2004).

Além da cafeína, o café possui muitas outras substâncias, destacando-se grandes quantidades de compostos fenólicos como diferentes ácidos clorogênicos e ácidos fenólicos livres. Estas substâncias conferem ao café potentes efeitos biológicos, incluindo atividades antioxidantes, antimutagênicas, anticarcinogênicas, antibióticas, antihipertensivas, antihipercolesterolêmicas e antiinflamatórias. Sob este ponto de vista, o café é uma bebida bastante útil à manutenção da boa saúde. Em contraste, alguns pesquisadores têm relatado que o café, em doses exageradas, pode atuar como fator de risco para doenças cardíacas, osteoporose e problemas periodontais (Yukawa et al., 2004).

c) Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são metabólitos secundários, geralmente envolvidos nas defesas contra radiações UV ou agressões de patógenos às plantas. Milhares destas substâncias têm sido descritas, sendo divididas em classes de acordo com sua estrutura, substituições específicas e associações com outras moléculas. A maior parte destes compostos tem recebido considerável atenção da comunidade científica por apresentar ação protetora, comprovada ou potencial, contra doenças como diabetes, catarata, degeneração macular, câncer, doenças neurovegetativas e

problemas cardiovasculares (Cheynier, 2005; Scalbert et al., 2005a). O quadro 3 relaciona alguns destes compostos presentes no café.

Quadro 3 - Alguns compostos fenólicos presentes no café (Manach et al., 2004).

Classe	Sub-classe	Exemplos
Flavonóides	Flavonóis	Kaempferol, quercetina e miricetina
	Antocianidinas	Pelargonidina, cianidina e malvidina
	Isoflavonas	Gernisteína, daidzeína e gliciteína
Não-flavonóides	Ác. benzóicos	Ácidos gálico e p-hidroxibenzóico
	Ác. hidroxicinâmicos	Ácidos cafêico, ferúlico e p-cumárico
	Estilbenos	Resveratrol
	Lignanas	Pinoresinol e lariciresinol

No café, os ácidos fenólicos estão predominantemente presentes como ésteres do ácido quínico com uma a três moléculas de ácidos hidroxicinâmicos, sendo conhecidos coletivamente como ácidos clorogênicos (CGA). Dependendo da espécie, o conteúdo de CGA pode chegar a 14% da matéria seca, o que contribui para a determinação da qualidade do café e para a formação do “flavor”. Conforme visto no quadro 4, a soma dos isômeros do ácido cafeoilquínico (CQA totais) representa a maior fração dos CGA, seguida de menores quantidades de derivados do ácido p-cumárico e do ácido ferúlico (Farah & Donangelo, 2006).

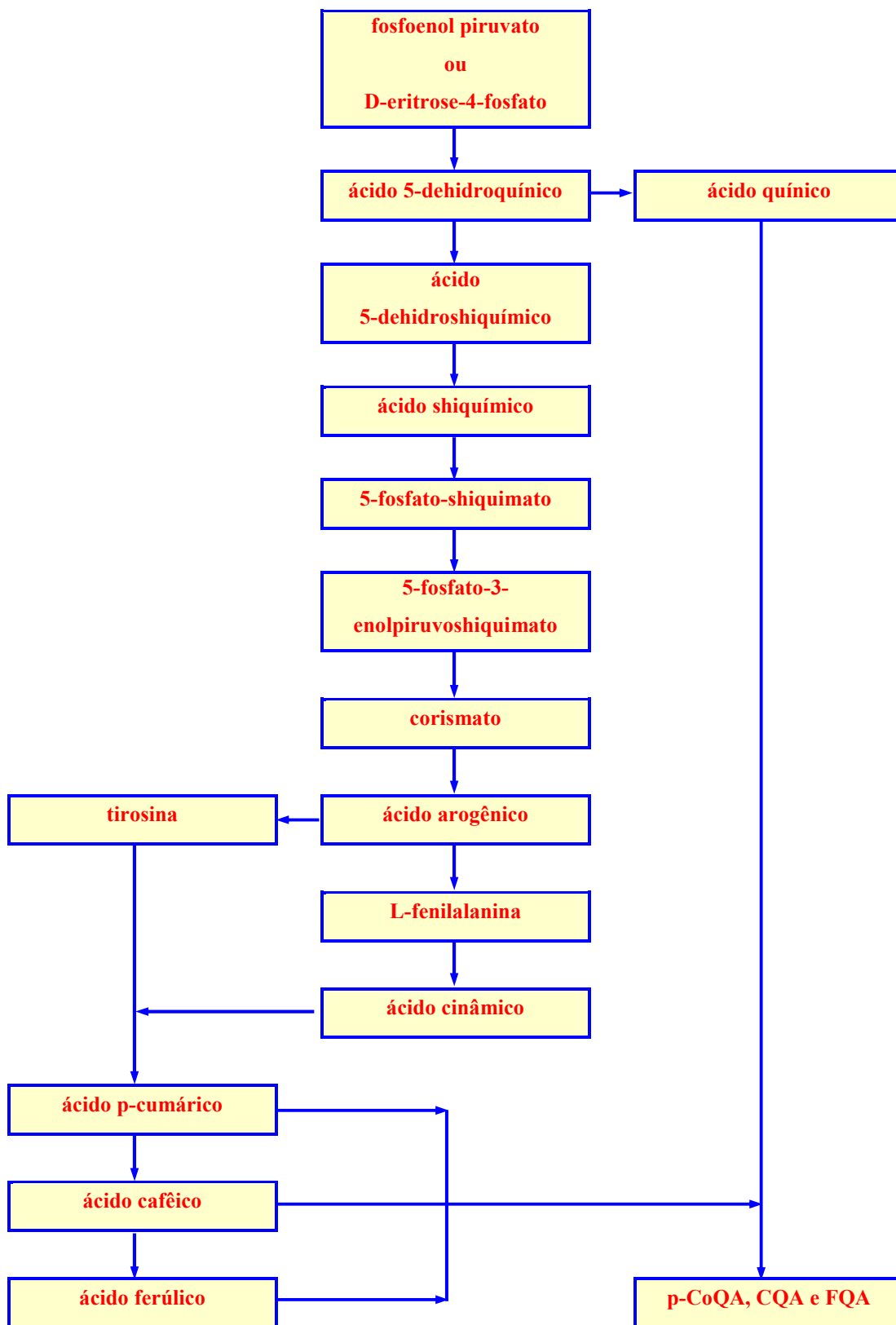
Quadro 4 - Teor de CQA totais e CGA totais em algumas espécies de cafés (Farah & Donangelo, 2006).

Espécie	CQA totais (g/100 g)	CGA totais (g/100g)
<i>C. arabica</i>	5,76	6,88
<i>C. arabica</i> var. <i>Bourbon</i>	4,77	5,67
<i>C. arabica</i> var. <i>Longberry</i>	4,60	5,73
<i>C. arabica</i> var. <i>Caturra</i>	4,63	5,62
<i>C. canephora</i> var. <i>Robusta</i>	6,82	8,80
<i>C. canephora</i> var. <i>Conillon</i>	7,42	9,47
<i>C. liberica</i> var. <i>Dewevrei</i>	5,39	6,97

Apesar das discrepâncias em consequência do uso de diferentes metodologias, a variação dos teores de CGA, as diferenças nas distribuições isoméricas e a presença ou ausência de outros derivados menos abundantes se constituem em critérios de identificação genotípica do café. A correlação da composição com a origem geográfica tem sido atribuída mais a fatores genéticos do que a práticas de agricultura. Entretanto, condições severas como frio, excesso de luminosidade, falta de água, uso de fertilizantes ricos em nitrogênio e deficiência de boro, tendem a aumentar o conteúdo de compostos fenólicos dos grãos (Guerrero et al., 2001; Ky et al., 2001; Pennycooke et al., 2005).

A síntese dos ácidos hidroxicinâmicos (cafêico, ferúlico e p-cumárico) e os ácidos clorogênicos derivados dos mesmos (cafeoilquínico ou CQA, ferroilquínico ou FQA e p-cumarilquínico ou p-CoQA) advém da rota fenilpropanóide, um dos ramos do metabolismo fenólico das plantas superiores que normalmente é induzido em resposta às condições de estresse ambiental como infecções microbianas, agressões mecânicas como cortes e excesso de luz UV ou visível. Os ácidos hidroxicinâmicos são sintetizados a partir da tirosina ou da L-fenilalanina formadas pela rota do ácido shiquímico segundo a qual, os carboidratos precursores simples derivados da glicólise e do desvio pentose-fosfato (D-eritrose-4-fosfato e fosfoenol piruvato) são convertidos a estes aminoácidos. O ácido quínico é sintetizado a partir do 5-deidroquinoato que é um dos metabólitos intermediários da rota do ácido shiquímico enquanto que o ácido cinâmico é obtido da L-fenilalanina pela ação da fenilalanina amônia-liase, enzima-chave na biossíntese de compostos fenólicos que é ativada em resposta a diferentes condições de estresse. Os ácidos cafêico, p-cumárico e ferúlico podem ser sintetizados a partir da hidroxilação do ácido cinâmico ou da tirosina através da ação da tirosina amino-liase. A etapa final da produção dos ácidos 5-monoacil clorogênicos ocorre pela ligação dos ácidos hidroxicinâmicos à coenzima A através da ação da CoA-liase, seguida da esterificação na posição 5 da molécula do ácido quínico através da cinamoil transferase. O mecanismo de reação para a formação dos derivados acilados nas posições 3 e 4, bem menos abundantes que os respectivos isômeros da posição 5, ainda não está totalmente esclarecido mas, possivelmente, trata-se de migração do grupo acila. Esta rota está sumarizada na figura 7 (Rechner et al., 2001; Farah & Donangelo, 2006).

Figura 7 - Síntese dos ácidos hidroxicinâmicos (cafêico, ferúlico e p-cumárico) e dos respectivos ácidos clorogênicos (5-CQA, 5-FQA e 5-p-CoQA) em plantas superiores (adaptada de Farah & Donangelo, 2006).



d) Ação dos ácidos fenólicos na modulação enzimática

Compostos fenólicos têm despertado o interesse dos pesquisadores da área da saúde por apresentar várias ações fisiológicas benéficas como a remoção de radicais livres e a complexação de cátions metálicos evitando suas atividades pró-oxidantes. Pesquisas têm mostrado que estas substâncias também podem afetar a atividade enzimática, atuar na transdução de sinais celulares, ativar fatores de transcrição e agir na expressão de genes. Estudos epidemiológicos têm sugerido associações positivas entre o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos e a prevenção de muitas DCNT humanas. Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam estas propriedades e estão fartamente presentes em frutas, vegetais, café, chás, vinho e azeite de oliva, geralmente esterificados com açúcares, lipídios ou com ácido quínico para compor os ácidos clorogênicos. Desta forma, estes alimentos são as maiores fontes de ácidos hidroxicinâmicos na dieta humana (Nardini et al., 2002a).

Uma importante atuação dos ácidos fenólicos é a quimioprevenção, definida como o uso de substâncias não tóxicas, incluindo aquelas presentes nos alimentos, com a finalidade de interferir no desenvolvimento da carcinogênese antes da ocorrência da invasão e da metástase. Uma importante linha da quimioprevenção envolve a modulação da atividade das enzimas antioxidantes fase II que convertem espécies carcinogênicas em metabólitos menos ativos que podem ser eliminados pelo organismo antes que tenham a possibilidade de reagir com o DNA. A indução destas enzimas antioxidantes por agentes quimioprotetores já mostrou ser uma estratégia efetiva na proteção das células contra a carcinogênese em estudos experimentais com animais (Yeh & Yen, 2006).

Um dos mecanismos propostos para a indução das enzimas fase II (SOD, GPx e Cat) pelos ácidos fenólicos envolve a ativação de quinases como MAPK, PI3K e PKC. Conforme esta rota, os ácidos fenólicos ativam estas quinases resultando na fosforilação da Nrf2 citoplasmática. Esta reação facilita a liberação desta proteína do complexo citoplasmático inibidor Keap1-Nrf2, em função de alteração na sua conformação. Esta alteração possibilita sua translocação para o núcleo celular, onde ela atua como fator de transcrição direto para o m-RNA das enzimas fase II citadas e da própria Nrf2 (Kwak et al., 2004).

e) Absorção dos ácidos fenólicos e clorogênicos

Compostos fenólicos ingeridos através da dieta têm recebido muita atenção em função dos seus numerosos efeitos biológicos como inativação de radicais livres, complexação de íons metálicos pró-oxidantes, modulação da atividade enzimática, inibição da proliferação celular e interação nos caminhos de transdução de sinais. Estudos epidemiológicos têm destacado associações positivas entre o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos e a prevenção de algumas doenças humanas. Estes compostos são abundantes em frutas, verduras, cereais, chocolate, chás, café e vinho tinto, podendo totalizar cerca de um grama por dia em dietas que contenham estes alimentos. Deste total, a maior parte é constituída de ácidos hidroxicinâmicos (livres ou esterificados como ácidos clorogênicos) e flavonóides (Manach et al., 2004; Scalbert et al., 2005b).

Entretanto, a extensão dos efeitos protetores *in vivo* depende da biodisponibilidade destes compostos para absorção, metabolismo e subsequente interação com os respectivos alvos. Estudos têm mostrado que, tanto em humanos quanto em ratos, a absorção dos ácidos fenólicos livres como o ácido cafêico ocorre com maior facilidade que a absorção de seus derivados esterificados como o 5-CQA. Isto se deve ao fato que a absorção dos ácidos clorogênicos só ocorre após hidrólise realizada por esterases existentes na mucosa do intestino delgado ou pela atuação das mesmas enzimas da microflora colônica (Nardini et al., 2002a; Gonthier et al., 2003; Olthof et al., 2003). Há porém resultados controversos sobre a rota predominante dos ácidos clorogênicos nos organismos. Enquanto a maior parte dos pesquisadores tem encontrado apenas ácidos livres no plasma após a ingestão dos CGA, outros detectaram pequenas quantidades não hidrolisadas na urina. Em trabalho recente, Lafay et al. (2006a) relataram também a absorção intacta de ácidos clorogênicos no estômago de ratos, porém a hidrólise com a liberação dos respectivos ácidos livres parece ser a rota predominante.

Pesquisas indicaram que o ácido cafêico é glucoronilado, orto-metilado ou sulfatado, transformando-se em ácido ferúlico ou isoferúlico. A microflora colônica transforma estes compostos em ácido m-cumárico e diferentes derivados como os ácidos fenilpropiónico e hipúrico. Em contraste, a maior parte do 5-CQA alcança o

cólon intacto, sendo então hidrolisado a ácido cafêico e quínico, sendo que o primeiro é absorvido e metabolizado como já descrito (Rechner et al., 2001; Rechner et al., 2002; Gonthier et al., 2003; Mateos et al., 2006).

De maneira semelhante, enquanto o ácido ferúlico livre é eficientemente absorvido, o 5-FQA e outros ésteres deste ácido com ligninas ou arabinoxilanas (encontrados abundantemente nas paredes celulares dos grãos) têm difícil absorção no organismo humano e dos ratos. Derivados glucoronilados, sulfoglucoronilados e sulfatados são os produtos metabólitos mais comuns do ácido ferúlico (Adam et al., 2002; Kern et al., 2003; Zhao et al., 2003).

Em estudo realizado em 2004, Zhao et al. mostraram que o ácido ferúlico é rapidamente absorvido no estômago de ratos. Após a administração de 2,25 μmol deste composto, verificaram que 74% já havia sido absorvido após 25 minutos, sendo posteriormente recuperado na forma livre ou conjugada no plasma, bile e urina. O estudo concluiu que a absorção ocorre primariamente no estômago para posterior metabolismo no fígado.

Em outra pesquisa, Olthof et al. (2001) concluíram que, após a ingestão simultânea de 2,8 μmol dos ácidos cafêico e 5-CQA, 95% do primeiro e apenas 33% do segundo foram absorvidos no intestino em curto espaço de tempo. Após 24 horas, apenas traços do 5-CQA e 11% do ácido cafêico foram excretados intactos na urina, indicando alta absorção de ambos.

Usando modelo de perfusão intestinal *in situ* com ratos (íleo e jejuno), Lafay et al. (2006b) concluíram que cerca de 20% do ácido cafêico e 8% do 5-CQA foram absorvidos do efluente perfundido. Uma pequena fração (0,5%) foi metabolizada na parede intestinal a ácido ferúlico e devolvida ao lúmen intestinal. Parte do 5-CQA (2%) foi recuperada no efluente intestinal como ácido cafêico, mostrando a atividade da esterase neste local e nenhum 5-CQA foi encontrado no plasma ou na bile. Estes resultados indicam que o 5-CQA é absorvido e hidrolisado no intestino delgado.

Medidas sobre as concentrações de ácidos fenólicos no plasma de humanos após a administração destas substâncias ou de alimentos ricos nas mesmas são limitadas, tanto quanto avaliações sobre a absorção intestinal. Evidência indireta desta ocorrência é o aumento da capacidade antioxidante do plasma após o consumo de cerveja (Ghiselli et al., 2000), vinho tinto (Simonetti et al., 2001), café (Natella et

al., 2002) e frutas como ameixa, cereja, uva, kiwi e morango (Prior et al., 2007). Sem dúvida, o conhecimento da absorção efetiva e biodisponibilidade é crucial para o entendimento da significância da ingestão de ácidos fenólicos na saúde humana (Nardini et al, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a capacidade antioxidante e a estabilidade do café regular e descafeinado e avaliar os efeitos da administração oral de sua infusão na capacidade antioxidante de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Estimar a umidade, atividade de água, teor de compostos fenólicos totais e concentrações dos ácidos cafêico, ferúlico e p-cumárico em amostras de café regular e descafeinado, verificando sua estabilidade ao longo de seis meses;

3.2.2 Comparar durante seis meses a capacidade antioxidante *in vitro* dos dois tipos de cafés por diferentes técnicas (ORAC e DPPH) e correlacionar os resultados obtidos com a composição das amostras;

3.2.3 Estimar o tempo de resposta e a dependência dose-resposta da atividade enzimática (SOD, GPx e Cat) e da capacidade antioxidante (ORAC) no tecido hepático de ratos, após a administração oral de dose única de infusão de café;

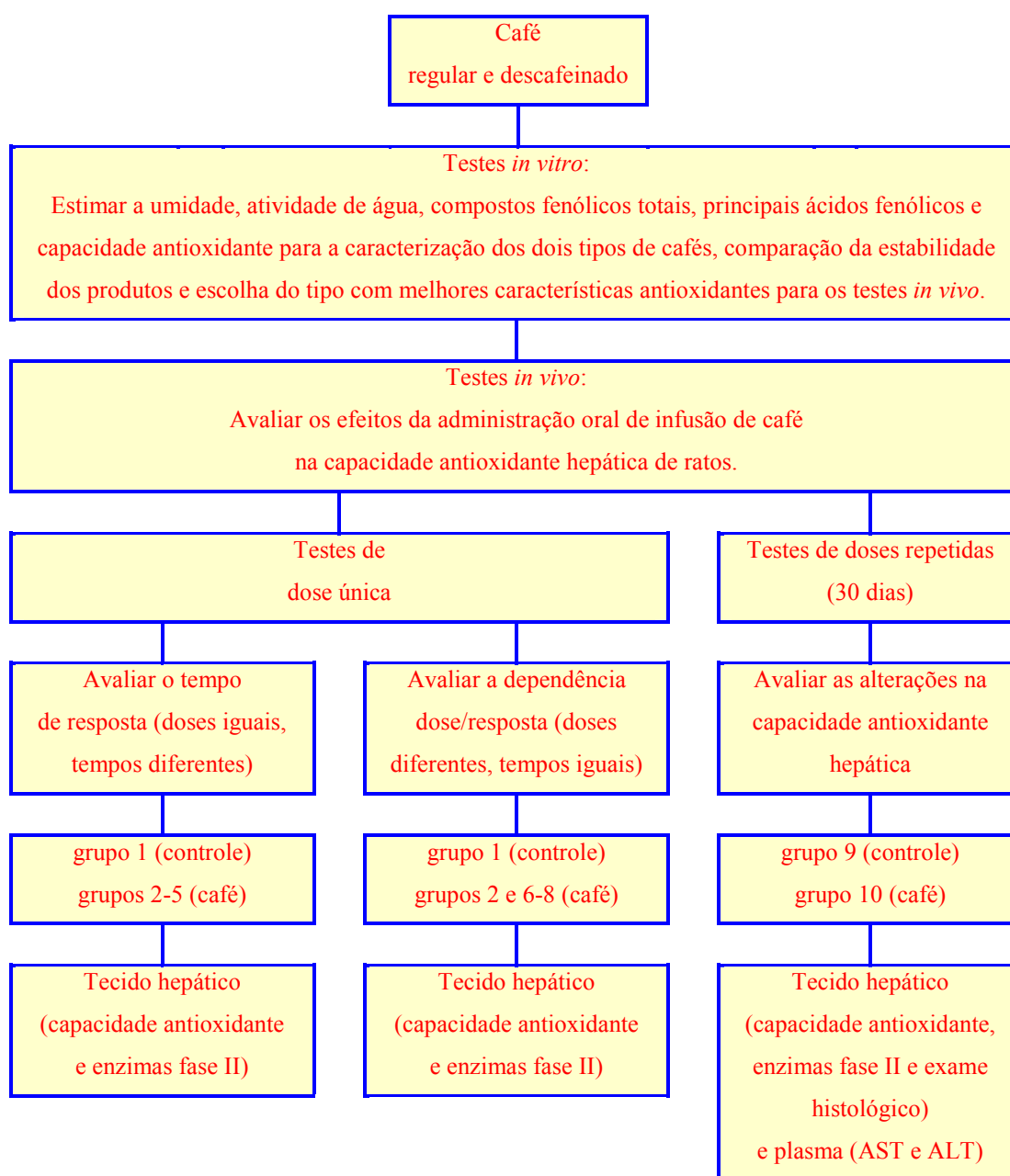
3.2.4 Avaliar a alteração da atividade enzimática (SOD, GPx e Cat) e da capacidade antioxidante (ORAC) no tecido hepático de ratos após a administração oral de doses repetidas (30 dias) de infusão de café;

3.2.5 Analisar o tecido hepático e biomarcadores plasmáticos específicos dos animais submetidos a doses repetidas para a verificação da ocorrência de alterações hepáticas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A etapa experimental foi dividida em duas partes: testes *in vitro* com café regular e descafeinado para a determinação do tipo de café com melhor capacidade antioxidante e testes *in vivo* utilizando ratos, divididos em dose única e doses repetidas (30 dias), para a verificação de alterações hepáticas antioxidantes e histológicas. Este delineamento pode ser visto na figura 8.

Figura 8 - Delineamento da etapa experimental do projeto.



4.1 MATERIAIS

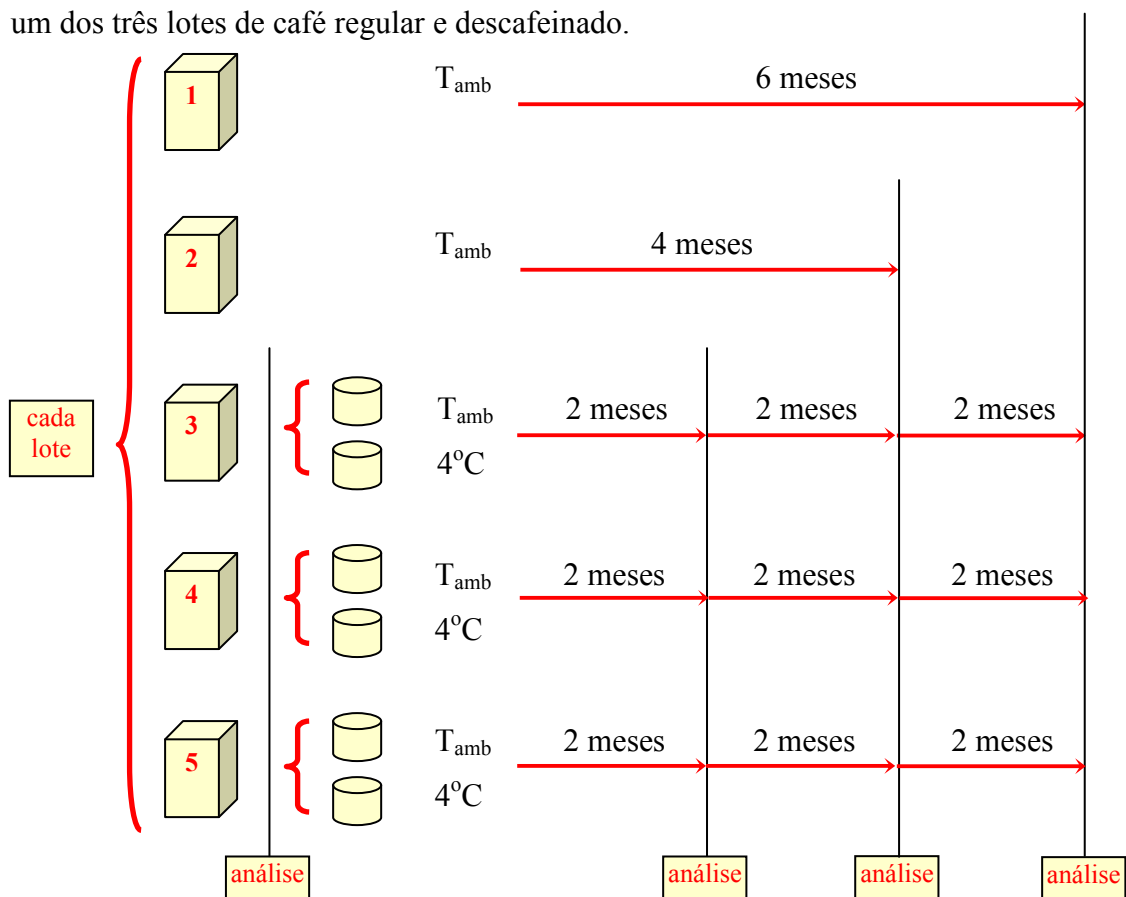
Para a etapa inicial de caracterização *in vitro*, foram obtidas 5 caixas de 3 lotes diferentes de café regular (15 unidades) e a mesma quantidade de café descafeinado. Estas amostras industrializadas, acondicionadas em embalagens aluminizadas sob vácuo e contendo 500 gramas cada, foram selecionadas com datas de fabricação próximas (todas produzidas em Março/2008), a fim de possibilitar uma melhor comparação dos resultados. As informações obtidas junto ao fabricante sobre a origem e a industrialização dos lotes estão relacionadas a seguir.

Café regular: os lotes foram produzidos através da combinação de grãos 100% da espécie *arabica* variedade *Bourbon* (“blend”) colhidos em Agosto de 2007 na região sul de Minas Gerais (cerrado mineiro). As plantações estão localizadas em solo medianamente alto (acima de 500 metros de altitude), em terreno predominantemente basáltico e com temperatura média entre 17 e 22°C. A colheita foi feita por processo mecanizado, seguida de separação dos grãos maduros por processo úmido (flotação). A secagem foi realizada em secadores mecanizados aquecidos a gás para evitar odores indesejados. A produção industrial ocorreu no mês de Março/2008 com grau de torra 3 (clássica) e moagem fina. A bebida obtida destes lotes foi classificada pelo fabricante como encorpada e com leve acidez.

Café descafeinado: os lotes foram produzidos com mistura de grãos 100% da espécie *arabica* variedade *Bourbon* (“blend”) colhidos entre Junho e Julho de 2007 nas regiões sul de Minas Gerais (cerrado mineiro) e Espírito Santo. As plantações estão localizadas em solo alto (entre 600 e 1300 metros de altitude), em terreno do tipo basáltico e com temperatura média entre 15 e 20°C. A colheita foi feita por processo mecanizado e os grãos foram selecionados por processo úmido (flotação). Na secagem, foram utilizados secadores a gás. A produção industrial foi realizada no mês de Março/2008, o grau de torra foi 3 (clássica) com moagem fina. A etapa de descafeinização, realizada antes do processo de torra, utilizou solventes com alta seletividade para cafeína. A bebida obtida destes lotes foi classificada pelo fabricante como encorpada e aromática.

Das 5 embalagens de cada lote, 2 foram selecionadas pelo método da amostragem casual sistemática (Berquó et al., 2005) para permanecer fechadas por quatro e seis meses (dentro do prazo de validade de dezoito meses), sendo analisadas após estes prazos para a verificação de alterações ocorridas durante a estocagem do produto ainda fechado. Cada uma das 3 caixas restantes foi aberta, homogeneizada, analisada em triplicata e dividida em 2 sub-amostras com cerca de 200 gramas cada, para ser estocadas à temperatura ambiente (20°C) e em geladeira (4°C), ambas ao abrigo da luz e na presença de oxigênio, sendo novamente analisadas a cada dois meses para o acompanhamento da qualidade do produto já aberto. Este esquema pode ser visto na figura 9.

Figura 9 - Esquema de partilha, estocagem e análise das cinco embalagens de cada um dos três lotes de café regular e descafeinado.



Considerando que o café regular apresentou melhores características antioxidantes *in vitro*, este tipo foi utilizado nos testes *in vivo* com os ratos. Para

estes testes, foram obtidas novas amostras de café regular recém-produzidas, as quais foram homogeneizadas e mantidas a -20°C (freezer) e ao abrigo da luz durante todo o período de testes, para preservar as características iniciais.

Para os testes *in vivo*, foram utilizados ratos machos brancos (*Ratus norvegicus* variedade *Wistar*) com peso inicial de 200 ± 10 gramas, separados pelo mesmo método da amostragem casual sistemática utilizado para as amostras de café (Berquó et al., 2005). Todos os indivíduos foram adquiridos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (BC-FM-USP), para assegurar a homogeneidade de linhagem. Durante a fase de adaptação (quatro dias) e testes, os animais ficaram alojados no biotério do Instituto de Medicina Tropical (IMT-USP) em gaiolas plásticas individuais com forração de maravalha, água e ração *ad libitum*, temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclos claro/escuro de doze horas. O manuseio dos animais (seleção, alimentação, pesagem, gavagem, anestesia, eutanásia e coleta do tecido hepático e sangue) foi realizado por técnicos qualificados do BC-FM-USP ou do IMT-USP a fim de reduzir o estresse dos ratos. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética do IMT-USP em 15 de Junho de 2007, recebendo aprovação em 06 de Setembro de 2007 sob o número CEP-IMT 10/07 (Anexo I).

Durante o período de adaptação e testes, os animais foram alimentados com ração purificada para ratos AIN-76 descrita pelo Committee on Standards for Nutritional Studies (1977). A ração desidratada, adquirida da NutriExperimental, foi mantida em freezer a -20°C , sendo hidratada com 10% de água deionizada e aglomerada por compressão e resfriamento a -20°C por 2 horas na ocasião do uso, a fim de evitar problemas microbiológicos.

4.2 PREPARO DA INFUSÃO DE CAFÉ

Para todos os testes *in vitro* e *in vivo*, a infusão de café foi preparada conforme recomendado pela Associação Brasileira da Indústria do Café - ABIC, utilizando-se a relação 80 gramas de pó de café para 1 litro de água mineral (ABIC, 2008). Todas as amostras foram filtradas em filtro de papel, uma vez que este é o método mais utilizado no Brasil. A água foi aquecida até 90°C , evitando-se a fervura uma vez que esta compromete, de forma decisiva, o aroma e o sabor do café. Ao atingir esta

temperatura, a água foi despejada sobre o pó de café uniformemente distribuído no filtro de papel, iniciando-se sempre pelas bordas. Uma vez que o tempo de percolação da água quente influencia sobremaneira a extração dos compostos solúveis do café, esta etapa foi cuidadosamente padronizada, incluindo a colocação do pó no filtro de papel (sem compactação) assim como o tempo e a forma de despejo da água sobre o mesmo. Após a filtração, o café foi esfriado naturalmente até temperatura ambiente e utilizado imediatamente, para evitar a perda de qualquer das suas características antioxidantes.

4.3 REAGENTES

Para a determinação dos ácidos fenólicos, foram utilizados padrões dos ácidos cafêico, p-cumárico, ferúlico e 5-CQA da Sigma-Aldrich Co. – EUA além de metanol OmniSolv grau HPLC e ácido acético da Merck KGaA – Alemanha.

Os compostos fenólicos totais foram determinados utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu (ácido fosfotúngstico-fosfomolibídico) e ácido gálico da Sigma-Aldrich Co. – EUA.

Para o teste de DPPH, foram utilizados DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) da Sigma-Aldrich Co. – EUA e metanol da Merck KGaA – Alemanha.

Para o teste de ORAC, foram usados AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano), fluoresceína (3',6'-dihidroxi-espiro[isobenzofurano-1[3H],9'[9H]-xanten-3-ona) e Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) da Sigma-Aldrich Co. – EUA além de cafeína (1,3,7-trimetilxantina) produzida pela Fluka Chemie GmbH – Alemanha.

Para a dosagem de proteínas totais, foram utilizados o reagente de Bradford e albumina bovina sérica (BSA) produzidos pela Sigma-Aldrich Co. – EUA.

Para a determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase, foram utilizados os kits Ransod[®] e Ransel[®] fabricados pela Randox Laboratories Ltd. – Reino Unido. Para a determinação da atividade da enzima catalase, foram utilizados peridrol (H₂O₂) 30% da Merck KGaA – Alemanha, tampão Trisma-HCl produzido pela Sigma Aldrich – EUA e Na₂EDTA fabricado pela Labsynth Ltda – Brasil.

Para os biomarcadores hepáticos, foram utilizados os kits AST/TGO Liquiform e ALT/TGP Liquiform da Labtest Diagnóstica S.A. – Brasil. Para a preservação do tecido hepático, foi utilizado metanal (formaldeído) da Labsynth Ltda. – Brasil.

4.4 EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro UV-VIS modelo UV-1650 da Shimadzu – Japão com célula de quartzo de 10 mm termostaticada;
- Fluorímetro modelo FL-55 da Perkin-Elmer – EUA com célula de quartzo de 10 mm termostaticada;
- Cromatógrafo líquido fabricado pela TSP – EUA com degaseificador automático SCM-1000, bomba quaternária P-4000, injetor automático AS-3000 e detector UV-2000, equipado com coluna C-18 Microsorb-MV (250 x 4,6 mm, partículas de 5 µm) da Varian Inc. – EUA;
- Ultracentrífuga modelo WXUltra90 e ultrafreezer modelo ULT-1386 fabricados pela Thermo Electron Corporation – EUA;
- Medidor de atividade de água AquaLab modelo CX2 fabricado pela Decagon Devices, Inc – EUA;
- Homogeneizador UltraTurrax TDS1 fabricado pela IKA Works Inc. – EUA;
- Deionizador de água EASYpureRF da Barnstead Thermolyne – EUA.

4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

a) Umidade: foi utilizado o método gravimétrico normatizado pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Aquecer a estufa até 105°C e aguardar a estabilização. Colocar a cápsula de porcelana na estufa e deixar secando por 2 a 3 horas. Transferir a cápsula para o dessecador, aguardar esfriar até temperatura ambiente e pesar em balança analítica. Utilizando a cápsula tarada, pesar uma massa representativa da amostra com cerca de 10 gramas. Colocar a cápsula com a amostra na estufa a 105°C e secar por exatamente 5 horas. Transferir a cápsula para o dessecador, aguardar até atingir temperatura ambiente, pesar e efetuar os cálculos. Todas as pesagens devem ser realizadas com precisão de $\pm 0,1$ mg.

b) Atividade de água: foram seguidas as instruções do manual do fabricante. Transferir uma amostra representativa de pó de café para o recipiente próprio de polietileno, de modo a cobrir toda a superfície do mesmo. Inserir o recipiente com a amostra no equipamento e iniciar o teste. Ao final da análise, o equipamento fornece o valor da atividade de água e a temperatura do ensaio.

c) Ácidos fenólicos: foi escolhida a técnica descrita por Kowalski & Wolski (2003) que utiliza cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Por ser um método isocrático, o mesmo preserva a integridade da coluna e evita perdas de tempo e solventes com constantes equalizações. Estes autores indicaram coluna de fase reversa C₁₈ com 250 x 4 mm e diâmetro de partículas de 5 µm, fase móvel composta de H₂O:metanol (75:25 v/v) com a adição de 1% (v/v) de ácido acético e fluxo de 0,8 mL/min. O volume a ser injetado é de 20 µL e as corridas são executadas a 25°C, com tempo total de 60 minutos. No método original, a identificação positiva dos ácidos fenólicos de interesse foi feita pela comparação dos tempos de retenção e dos espectros UV dos picos obtidos (varredura de 220 a 400 nm utilizando detector “diode array”) com os respectivos padrões. A etapa de quantificação foi realizada por padronização externa, obtendo-se curvas de calibração para cada um dos compostos de interesse.

d) Compostos fenólicos totais: foi escolhido o método que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu, conforme as alterações propostas por Genovese et al. (2003). Para a análise, 0,25 mL da amostra (ou de uma diluição adequada) é misturado com 2 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v). Após agitação, a mistura é mantida em repouso por 3 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, adiciona-se 0,25 mL de solução saturada de Na₂CO₃ (75 g/L) e a mistura é incubada por 30 minutos a 37°C para completar a reação. Ao oxidar os grupos fenólicos (-OH) da amostra transformando-os em grupos cetônicos (C=O), o reagente de Folin-Ciocalteu se reduz formando o composto W₈O₂₃.Mo₈O₂₃ de coloração azul, cuja absorbância é lida no espectrofotômetro em 750 nm. Os resultados são expressos em mg/mL de ácido gálico equivalente, utilizando curva de calibração preparada com este último composto.

e) Atividade antioxidante por DPPH: foi utilizado o teste que mede a capacidade antioxidante da amostra através da descoloração do radical estável DPPH no meio reacional (Brand-Williams et al., 1995; Yamaguchi et al., 1998). 750 μ L da amostra convenientemente diluída são misturados com 1500 μ L do reagente DPPH (20 mg/L) e a absorbância da mistura é registrada em 517 nm por 20 minutos. O equipamento é zerado com 750 μ L da amostra na mesma diluição misturados com 1500 μ L de metanol. Um padrão contendo 1500 μ L do reagente DPPH misturados com 750 μ L de metanol é preparado e o valor da sua absorbância é determinado, zerando-se o equipamento com água destilada. Através da equação adequada, calcula-se a proporção (%) de capacidade antioxidante da amostra.

f) Atividade antioxidante por ORAC (“oxygen radical absorbance capacity”): este método avalia a capacidade antioxidante da amostra, medindo sua habilidade de proteger a fluoresceína (FL) da oxidação pelo AAPH no meio reacional. O branco é preparado misturando-se 3000 μ L de tampão fosfato, 15 μ L de FL e 300 μ L de AAPH e, através da medida da fluorescência (excitação 494 nm, emissão = 515 nm), é calculada a área sob a curva de absorbância versus tempo. Para a avaliação da amostra, é preparada uma solução com 2700 μ L de tampão, 300 μ L de amostra convenientemente diluída, 15 μ L de FL e 300 μ L de AAPH, repetindo-se a medição feita para o branco. O caráter antioxidante da amostra protege a FL da oxidação pelo AAPH, aumentando a área sob a curva. O resultado é comparado com a área sob a curva de um padrão com 2700 μ L de tampão, 300 μ L de Trolox 20 μ M, 15 μ L de FL e 300 μ L de AAPH (Ou et al., 2001).

g) Catalase: foi baseada na técnica descrita por Aebi (1984) na qual a decomposição do H_2O_2 é medida por espectroscopia UV em 230 nm. O meio reacional é preparado com 9 mL de H_2O_2 0,015 volumes, 0,5 mL de tampão Tris-HCl 1 molar em Na_2EDTA 5 milimolar (pH=8,0) e 0,5 mL de água deionizada. A amostra é adequadamente diluída em tampão fosfato e misturada com o meio reacional (20 μ L de amostra para 980 μ L do meio reacional). A absorbância é lida imediatamente e a cada minuto por 6 minutos a 25°C. Quanto maior a redução da absorbância, maior é a atividade da catalase presente na amostra.

h) Glutathiona peroxidase: foi utilizada a metodologia de Paglia & Valentine (1967), adaptada para o uso do kit Ransel[®]. 25 µL da amostra adequadamente diluída são misturados com 625 µL do reagente 1 (GSH 4 milimolar, GR 0,5 U/L e NADPH 0,34 milimolar em tampão fosfato 0,5 molar / EDTA 4,3 milimolar) e 625 µL de tampão fosfato. Após estabilização a 30°C, são adicionados 50 µL de hidroperóxido de cumeno 0,18 milimolar, a mistura é homogeneizada e feitas leituras após 1, 2 e 3 minutos em 340 nm. O hidroperóxido de cumeno converte a GSH em GSSG com a participação da GPx. A GSSG formada oxida o NADPH produzindo NADP* com a participação da GR. A redução da absorbância indica o consumo do NADPH, o que é proporcional à atividade da GPx.

i) Superóxido dismutase: foi baseada na técnica descrita por Woolliams et al. (1983), adaptada para o uso do kit Ransod[®]. 38 µL da amostra adequadamente diluída são misturados com 1275 µL do substrato misto (xantina 0,05 milimolar e corante INT 0,025 milimolar diluídos em tampão CAPS 40 milimolar / EDTA 0,94 milimolar). Após estabilização a 25°C, são adicionados 187 µL da solução de XOS 80 U/L diluída em água deionizada. Após homogeneização, é feita a leitura inicial e após 3 minutos em 505 nm. No meio reacional, a xantina é convertida a ácido úrico e O₂⁻ com a participação da XOD. O O₂⁻ formado reage com o corante INT produzindo o corante Formazan cuja coloração é determinada por espectrofotometria. A SOD catalisa reação competitiva que converte o O₂⁻ a H₂O₂, reduzindo a produção do corante Formazan. Quanto menor a absorbância obtida, maior foi consumo do O₂⁻, o que é proporcional à atividade da SOD.

j) Proteínas totais: foi utilizada a técnica descrita por Bradford (1976), de fácil execução e resultados confiáveis. 10 µL do homogenato do tecido hepático foram diluídos em 990 µL de tampão fosfato 0,1 molar (pH=7,0). Desta diluição, 100 µL foram transferidos para a cubeta do espectrofotômetro e homogeneizados com 900 µL de água deionizada. Adiciona-se 100 µL do reagente de Bradford e após 10 minutos, é feita a leitura da absorbância em 595 nm. A curva-padrão de absorbância versus concentração de proteína é preparada utilizando-se soluções contendo de 0,1 a 1,0 mg/mL de albumina sérica bovina.

l) Hidrólise dos ácidos clorogênicos: foi utilizada a técnica descrita por Nardini et al. (2002b) para liberar os ácidos cafêico, p-cumárico e ferúlico dos respectivos ácidos clorogênicos. 0,5 mL de infusão de café foi submetido à hidrólise alcalina por 30 minutos a 30°C com 4,5 mL de NaOH 2 molar contendo 10 milimolar de Na₂EDTA e 1% de ácido ascórbico. Após a incubação, a solução foi acidificada até pH=3,0 com HCl 4 normal. 0,5 mL da solução acidificada foi extraído 3 vezes com 2 mL de acetato de etila, as frações orgânicas foram combinadas, secas sob nitrogênio e o resíduo obtido foi dissolvido na fase móvel do HPLC. Conforme os autores, a recuperação foi de 106,6% para o ácido cafêico, 103,9% para o ácido p-cumárico e 103,2% para o ácido ferúlico, com desvios-padrão de 4,8%, 9,8% e 1,0%, respectivamente. O EDTA e o ácido ascórbico têm a função de evitar a degradação dos ácidos fenólicos durante a hidrólise alcalina.

m) Atividade da aspartato aminotransferase (AST ou TGO): foi medida pela técnica descrita por Reitman & Frankel (1957), adaptada para o uso do kit AST/TGO Liquiform[®]. Para a curva-padrão foram preparadas soluções contendo de 0 a 0,4 mL de piruvato de sódio, de 0,6 a 1,0 mL de substrato para TGO (tampão, ácido α -cetoglutárico, ácido L-aspartico e azida sódica), 0,2 mL de água deionizada e 1,0 mL do reagente de cor (2,4-dinitrofenilhidrazina e HCl). Após 20 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 10 mL de NaOH. Após 5 minutos à temperatura ambiente, as absorvâncias destes padrões foram lidas em 505 nm, sendo que estes valores equivalem a 0 a 190 U/mL de TGO. Para as amostras, foi utilizado 0,25 mL de substrato para TGO (2 minutos a 37°C), adicionado 0,05 mL da amostra (60 minutos a 37°C), 0,25 mL do reagente de cor (temperatura ambiente por 20 minutos) e 2,5 mL de NaOH. Após 5 minutos à temperatura ambiente, a absorvância é lida em 505 nm e a atividade enzimática é obtida na curva-padrão. A AST promove a transferência do grupo amino do L-aspartato para o α -cetoglutatarato com a formação de glutamato e oxaloacetato. Este último é determinado através da formação de hidrazona que apresenta intensa coloração em meio alcalino.

n) Atividade da alanina aminotransferase (ALT ou TGP): foi quantificada conforme a técnica descrita por Reitman & Frankel (1957), adaptada para o uso do kit

ALT/TGP Liquiform[®]. Inicialmente foram preparadas as soluções para a curva-padrão contendo de 0 a 0,4 mL de piruvato de sódio, de 0,6 a 1,0 mL de substrato para TGP (tampão, ácido α -cetoglutárico, L-alanina e azida sódica), 0,2 mL de água deionizada e 1,0 mL do reagente de cor (2,4-dinitrofenilhidrazina e HCl). Após 20 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 10 mL de NaOH. Passados 5 minutos à temperatura ambiente, as absorvâncias foram lidas em 505 nm, sendo que estes valores equivalem a 0 a 150 U/mL de TGP. Para as amostras, foi utilizado 0,25 mL de substrato para TGP (2 minutos a 37°C), adicionado 0,05 mL da amostra (30 minutos a 37°C), 0,25 mL do reagente de cor (temperatura ambiente por 20 minutos) e 2,5 mL de NaOH. Após 5 minutos à temperatura ambiente, a absorvância é lida em 505 nm e a atividade enzimática é obtida através da curva-padrão. A ALT promove a transferência do grupo amino da L-alanina para o α -cetoglutarato com a formação de glutamato e piruvato. Este último é medido através da formação de hidrazona que apresenta intensa coloração em meio alcalino.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias, os desvios-padrão e a obtenção das curvas dos padrões com suas equações e respectivos coeficientes de explicação (R^2) foram determinados por meio do programa Microsoft Excel[®] for Windows[®] versão 2000.

As verificações de aderência à curva normal foram realizadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações das médias das variáveis com pressuposição de distribuição normal, tanto para as amostras independentes como para as pareadas, foram feitas baseadas no teste “t” de Student. A avaliação das relações entre pares de variáveis numéricas foi realizada utilizando-se a correlação linear de Pearson. Para todos estes cálculos estatísticos, foi utilizado o programa SPSS[®] versão 10.0 for Windows[®] (Berquó et al., 2005).

Onde adequado, foram relatadas as médias e seus respectivos desvios-padrão na forma média \pm desvio-padrão ($m\pm dp$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo foi dividido em duas etapas: identificação do café com melhor capacidade antioxidante e sua estabilidade durante a estocagem (testes *in vitro*) e avaliação das possíveis alterações na capacidade antioxidante hepática de ratos após a administração oral de infusão de café (testes *in vivo*).

5.1 TESTES *IN VITRO*

Os testes *in vitro* visaram identificar o tipo de café com melhor capacidade antioxidante, a fim de utilizá-lo nos testes com os animais. Nesta etapa, foi feita a comparação de três lotes de café regular com três de descafeinado, através da determinação da umidade, atividade de água, compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante e teor de ácidos fenólicos. Também foram realizados testes para avaliar a estabilidade dos produtos ao longo de seis meses sob diferentes condições de armazenagem. Todos os resultados indicaram que o café regular possui capacidade antioxidante superior ao descafeinado, sendo por este motivo selecionado para a etapa *in vivo* (item 5.2).

5.1.1 Umidade

O objetivo deste teste foi verificar se as umidades iniciais dos cafés regular e descafeinado eram equivalentes e como se comportava este parâmetro ao longo dos seis meses do estudo *in vitro*, sob diferentes condições de armazenagem (temperatura ambiente e geladeira). A recomendação da ABIC para o preparo da infusão de café é de 80 gramas de pó (base úmida) por litro de água mas, se as umidades dos cafés fossem significativamente diferentes, seria necessário efetuar esta preparação com base no resíduo seco de cada amostra, a fim de possibilitar as comparações previstas neste estudo.

As caixas 3, 4 e 5 dos três lotes de café regular selecionadas para análise imediata foram abertas, homogeneizadas e analisadas quanto à umidade. Os resultados mostraram excelente homogeneidade tanto dentro dos lotes (três caixas

em triplicata) como nas comparações entre os diferentes lotes. Da mesma maneira, as caixas 3, 4 e 5 dos três lotes de café descafeinado foram abertas, homogeneizadas e analisadas, apresentando a mesma homogeneidade do café regular. As médias das umidades iniciais dos cafés regular e descafeinado e seus desvios-padrão foram $2,48 \pm 0,06\%$ e $2,33 \pm 0,05\%$, respectivamente.

Os valores das umidades iniciais dos dois tipos de cafés foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, sendo verificado que as distribuições apresentaram aderência à curva normal ($p=0,973$ regular, $p=0,978$ descafeinado). Suas médias foram comparadas através do teste “t” para amostras independentes, concluindo-se que há evidências estatísticas que a média da umidade inicial do café regular é diferente da média da umidade inicial do café descafeinado ($p<0,001$).

Após as análises iniciais, as amostras 3, 4 e 5 dos três lotes de café regular foram divididas em duas sub-amostras cada e armazenadas, uma à temperatura ambiente na própria caixa de cartolina com saco aluminizado e a outra na geladeira em frasco plástico com tampa rosqueada, para ser novamente analisadas a cada dois meses. O objetivo destas análises foi avaliar possíveis alterações da umidade após a abertura das embalagens, simulando o que ocorre nas residências. Para as amostras 3, 4 e 5 de café descafeinado, igual procedimento foi adotado.

As caixas 1 e 2 dos três lotes de café regular foram guardadas ainda lacradas sob vácuo e à temperatura ambiente, sendo abertas e analisadas após quatro e seis meses de armazenamento, respectivamente. Este procedimento visou determinar possíveis alterações da umidade do café quando mantido fechado sob vácuo. Igual procedimento foi aplicado ao café descafeinado.

Após seis meses, observou-se que as amostras abertas e mantidas à temperatura ambiente apresentaram gradiente crescente de umidade, com variação média no período (diferença entre as amostras recém-abertas e após seis meses) de $+24,6\%$ no regular e $+26,6\%$ no descafeinado e distribuições normais (teste de Kolmogorov-Smirnov, $p=0,975$ regular, $p=0,940$ descafeinado). Estas diferenças foram avaliadas através do teste “t” para amostras pareadas, concluindo-se que há evidências estatísticas que as médias das umidades iniciais dos cafés regular e descafeinado são diferentes das respectivas médias após seis meses sob temperatura ambiente ($p<0,001$ para o dois tipos de cafés). Estas variações podem ser justificadas pela

absorção de umidade do ar, uma vez que as amostras 1 e 2, mantidas por seis meses sob as mesmas condições mas lacradas até o momento do teste, apresentaram praticamente o mesmo valor de umidade das amostras recém-abertas.

Após seis meses, as amostras mantidas na geladeira apresentaram pequena variação negativa de umidade (-1,2% regular, -2,1% descafeinado) e distribuições normais (teste de Kolmogorov-Smirnov, $p=0,838$ regular, $p=0,510$ descafeinado). Estas variações foram avaliadas através do teste “t” (amostras pareadas), concluindo-se que há evidências estatísticas que a média das umidades após seis meses dos cafés regular e descafeinado mantidos na geladeira são iguais às respectivas médias iniciais ($p=0,355$ regular, $p=0,295$ descafeinado). Estes resultados podem ser justificados pela baixa umidade dentro da geladeira pela liquefação e posterior solidificação do vapor de água presente no ar. Pode ser observado que os dois tipos de cafés mantidos na geladeira apresentaram comportamento similar ao das embalagens fechadas, exceto nas análises de dois meses (aumento da umidade). Existe a possibilidade destes resultados conterem alguma imprecisão experimental (variação na temperatura da estufa, calibração da balança analítica, interferência de amostras de outra natureza pois a estufa é utilizada simultaneamente em várias determinações etc.), já que os mesmos apresentaram comportamento diferente das demais amostras. Todos os resultados de umidade dos cafés regular e descafeinado podem ser vistos nas figuras 10 e 11, assim como nos quadros I e II do Anexo II.

Figura 10 - Umidade (% p/p) do café regular (n=3).

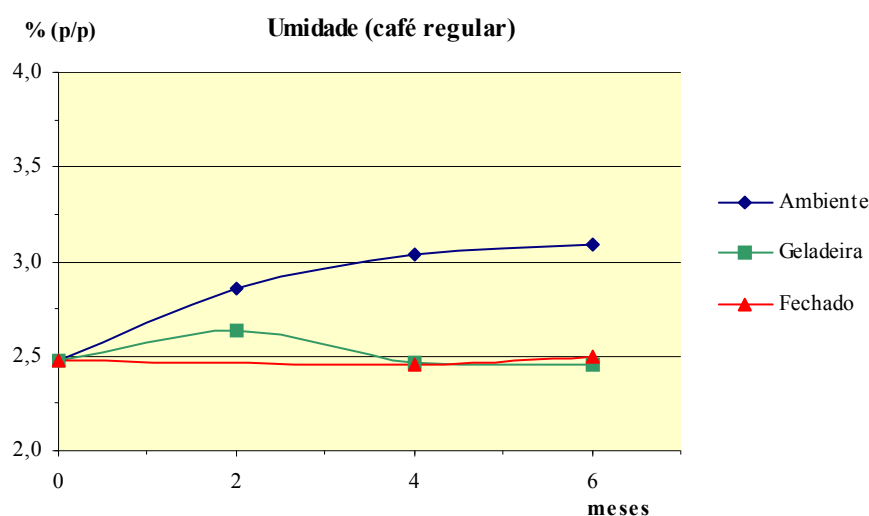
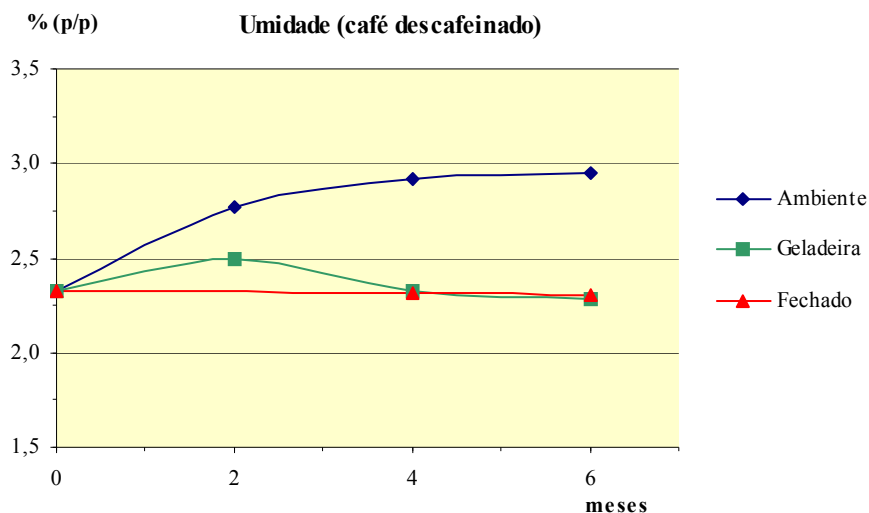


Figura 11 - Umidade (% p/p) do café descafeinado (n=3).



5.1.2 Atividade de água

Conforme Ross et al. (2006), as alterações nas características físico-químicas e organolépticas do café se iniciam durante a sua produção industrial (secagem, torra e moagem) e continuam ocorrendo durante a estocagem no ponto de venda e após a abertura da embalagem no local do consumo. Os fatores mais importantes para as alterações que ocorrem após a abertura da embalagem são a presença de oxigênio, a atividade de água (A_w) e a temperatura. De acordo com estes autores, o café preparado apenas duas semanas após a abertura da embalagem já pode apresentar alterações sensoriais perceptíveis.

Por este motivo, a determinação da atividade de água inicial foi realizada imediatamente após a abertura das caixas 3, 4 e 5 dos três lotes de café regular. Os resultados foram bastante homogêneos tanto dentro dos lotes (3 caixas analisadas em triplicata) como nas comparações entre os diferentes lotes. O mesmo procedimento foi aplicado às caixas 3, 4 e 5 dos três lotes de café descafeinado. As médias iniciais e desvios-padrão para os cafés regular e descafeinado foram $0,42 \pm 0,01$ e $0,38 \pm 0,01$, respectivamente. Observa-se que o café descafeinado apresentou média inicial 9,5% abaixo da média inicial do café regular.

Aplicando-se o teste Kolmogorov-Smirnov para os valores iniciais de A_w dos dois tipos de cafés, verificou-se que esta variável também apresentou distribuição

com adesão à curva normal ($p=0,839$ regular, $p=0,591$ descafeinado). Estes valores foram comparados através do teste “t” para amostras independentes, concluindo-se que há evidências estatísticas que a média inicial da A_w do café regular é diferente da média inicial do descafeinado ($p<0,001$).

Após as análises iniciais, as amostras 3, 4 e 5 dos cafés regular e descafeinado foram fracionadas em 2 sub-amostras, sendo armazenadas à temperatura ambiente e na geladeira para ser novamente analisadas a cada dois meses. Após este prazo, todas as amostras apresentaram reduções nas médias de A_w , menos acentuadas nas armazenadas à temperatura ambiente (-11,9% regular, -7,9% descafeinado) do que nas mantidas na geladeira (-26,2% regular, -23,7% descafeinado). As distribuições após seis meses foram avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov que indicou adesão à curva normal ($p=0,895$ regular ambiente, $p=0,945$ regular geladeira, $p=0,742$ descafeinado ambiente, $p=0,959$ descafeinado geladeira). As diferenças entre as médias iniciais e após seis meses foram analisadas pelo teste “t” (amostras pareadas), concluindo-se que há evidências estatísticas que todas as médias de A_w após seis meses são diferentes dos respectivos valores iniciais, independente da condição de armazenagem ($p=0,002$ descafeinado ambiente, $p<0,001$ para as demais amostras). Como as amostras 1 e 2 dos dois tipos de cafés (lacradas por 4 e 6 meses) apresentaram praticamente a mesma média de A_w das amostras recém-abertas, é possível associar a redução deste parâmetro com as interações com o ambiente.

Figura 12 - Variação da atividade de água do café regular (n=3).

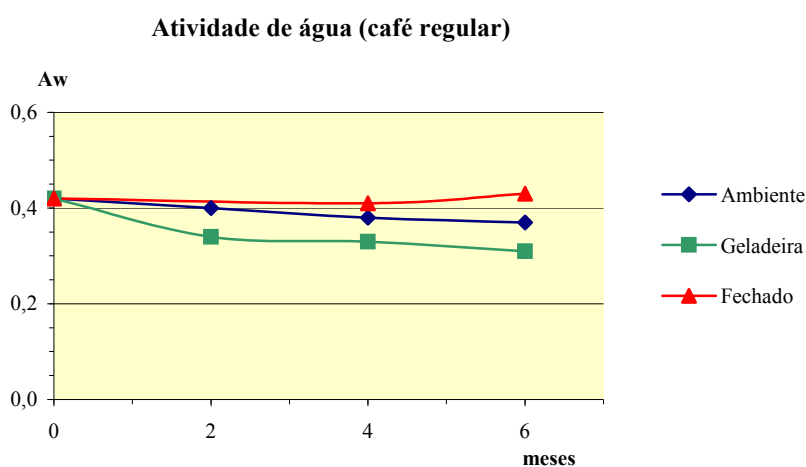
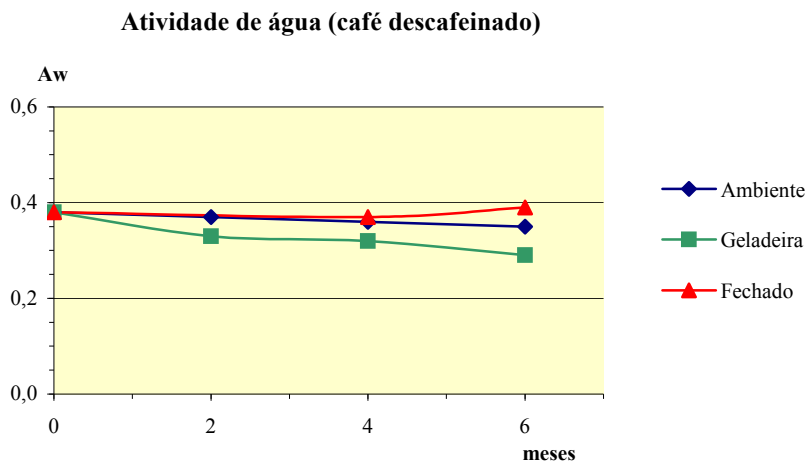


Figura 13 - Variação da atividade de água do café descafeinado (n=3).



Os resultados encontrados no teste de Aw para todas as amostras e condições de armazenagem, com valores iniciais baixos e decrescentes ao longo do experimento, são favoráveis à manutenção da boa qualidade dos dois tipos de cafés, dificultando o desenvolvimento de microorganismos e preservando a qualidade microbiológica dos produtos. Todos os resultados das análises de atividade de água podem ser visualizados nas figuras 12 e 13 assim como nos quadros III e IV do Anexo II.

5.1.3 Compostos fenólicos totais

Conforme citado por Natella et al. (2002), a ingestão de frutas e vegetais é inversamente associada ao risco de estresse oxidativo e ocorrência de DCNT, pois os compostos fenólicos presentes nestes alimentos apresentam poderosa ação antioxidante, atuam na modulação de enzimas, ativam fatores de transcrição e participam da expressão de diversos genes. Desta forma, a quantificação dos compostos fenólicos totais dos cafés foi importante, pois os mesmos participam ativamente dos efeitos *in vivo* avaliados neste estudo. Para esta determinação, foi adotada a técnica descrita por Genovese et al. (2003) que utiliza o composto de Folin-Ciocalteu em meio alcalino. Esta alternativa foi escolhida por ser rápida, econômica e apresentar resultados bastante confiáveis, sendo largamente utilizada em trabalhos desta natureza.

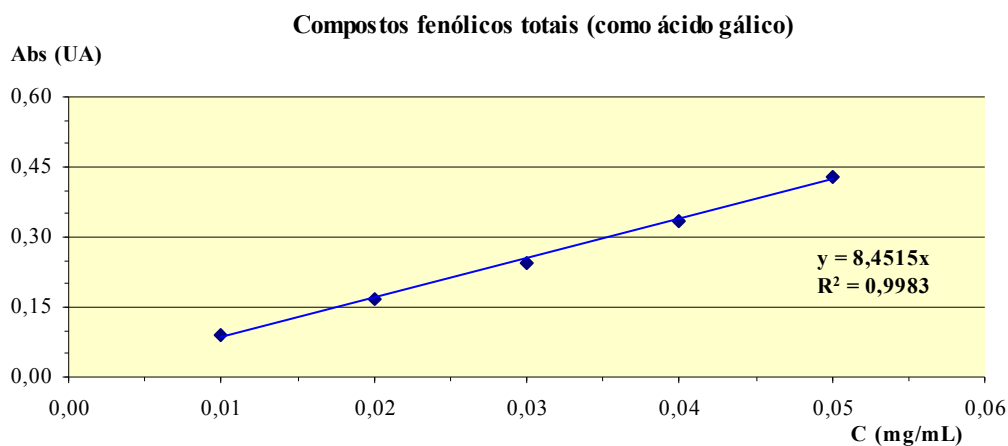
A curva para a quantificação dos compostos fenólicos totais foi obtida preparando-se cinco soluções contendo de 0,01 a 0,05 mg/mL de ácido gálico em água deionizada, que é o padrão usualmente utilizado nestas determinações. Através da metodologia descrita no item 4.5.d, as absorvâncias destes padrões foram medidas em 750 nm, gerando os resultados do quadro 5.

Quadro 5 - Absorbância dos padrões de ácido gálico em 750 nm (n=3).

Concentração (mg/mL)	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01
Absorbância (UA)	0,439	0,324	0,240	0,178	0,093
	0,416	0,347	0,260	0,162	0,089
	0,431	0,334	0,238	0,167	0,085
Média	0,429	0,335	0,246	0,169	0,089
Desvio-padrão	0,012	0,012	0,012	0,008	0,004
Coef. variação (%)	2,80	3,58	4,88	4,73	4,49

Observou-se resultados bastante homogêneos (coeficientes de variação entre 2,80 e 4,88%), os quais foram utilizados na elaboração da curva-padrão para a quantificação dos compostos fenólicos totais no café. A equação foi obtida pelo método dos quadrados mínimos (Excel for Windows[®] da Microsoft[®] versão 2000) e apresentou R² igual a 0,9983 (figura 14).

Figura 14 - Curva-padrão para quantificação dos compostos fenólicos totais (n=3).



Os compostos fenólicos totais iniciais das caixas 3, 4 e 5 dos três lotes de café regular e descafeinado foram medidos logo após a abertura das embalagens, com a infusão sendo diluída 200 vezes (v/v) com água deionizada. As médias iniciais e seus desvios-padrão foram $3,52 \pm 0,21$ e $3,55 \pm 0,28$ mg/mL de ácido gálico equivalente, respectivamente.

O teste de Kolmogorov-Smirnov indicou que as distribuições dos compostos fenólicos totais iniciais dos dois tipos de cafés apresentaram adesão à curva normal ($p=0,986$ regular, $p=0,958$ descafeinado). A comparação destas médias através do teste “t” para amostras independentes mostrou que há evidências estatísticas que o conteúdo de compostos fenólicos totais iniciais dos cafés regular e descafeinado são iguais ($p=0,836$).

Após a estocagem de seis meses das 2 sub-amostras de cada lote (ambiente e geladeira), observou-se sensível redução na média do teor de compostos fenólicos totais, mais acentuada nas amostras mantidas sob temperatura ambiente (-19,6% regular, -14,9% descafeinado) do que naquelas mantidas na geladeira (-9,6% nos dois tipos de cafés). Estas distribuições foram avaliadas através do teste de Kolmogorov-Smirnov verificando-se que apresentaram adesão à curva normal ($p=0,999$ regular ambiente, $p=0,976$ regular geladeira, $p=0,957$ descafeinado ambiente, $p=0,979$ descafeinado geladeira). Os resultados foram avaliados pelo teste “t” para amostras pareadas, verificando-se que há evidências estatísticas que as médias dos compostos fenólicos totais iniciais diferem dos respectivos resultados após seis meses da abertura das caixas, independentemente da condição de estocagem ($p=0,002$ regular geladeira, $p=0,007$ descafeinado geladeira, $p<0,001$ regular e descafeinado ambiente).

O decréscimo dos compostos fenólicos totais deve estar relacionado à oxidação gradual dos grupos fenólicos do café pelo O_2 presente no ar. Esta conclusão advém do fato que as amostras 1 e 2 exibiram, após quatro e seis meses de estocagem à temperatura ambiente mas fechadas sob vácuo, praticamente as mesmas médias das caixas 3, 4 e 5 recém-abertas, em ambos os cafés. Diversos compostos fenólicos apresentam forte atividade antioxidante, sendo alvos fáceis para reações de oxidação. Os potenciais redox dos mesmos são muito próximos aos das quinonas equivalentes, possibilitando esta conversão (Morrison & Boyd, 2005).

Destaca-se que a cafeína extraída durante a produção do café descafeinado é uma xantina que não reage com o reagente de Folin-Ciocalteu. Este fato justifica os valores iguais de compostos fenólicos totais iniciais para os dois tipos de cafés, pois a extração é bastante seletiva para a cafeína. Também se verificou que a temperatura mais baixa na geladeira reduziu a velocidade de oxidação dos compostos fenólicos, resultando em menores decréscimos das médias destas amostras. Todos os resultados podem ser vistos nas figuras 15 e 16 e nos quadros V e VI do Anexo II.

Figura 15 - Teor de compostos fenólicos totais (mg/mL de ácido gálico equivalente) em café regular (n=3).

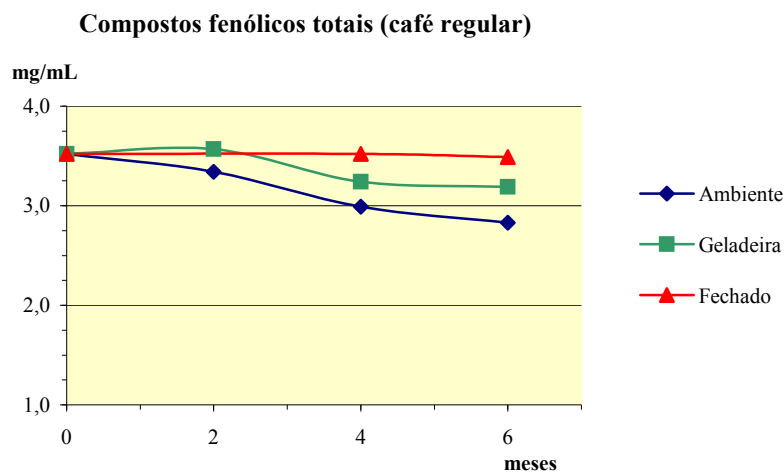
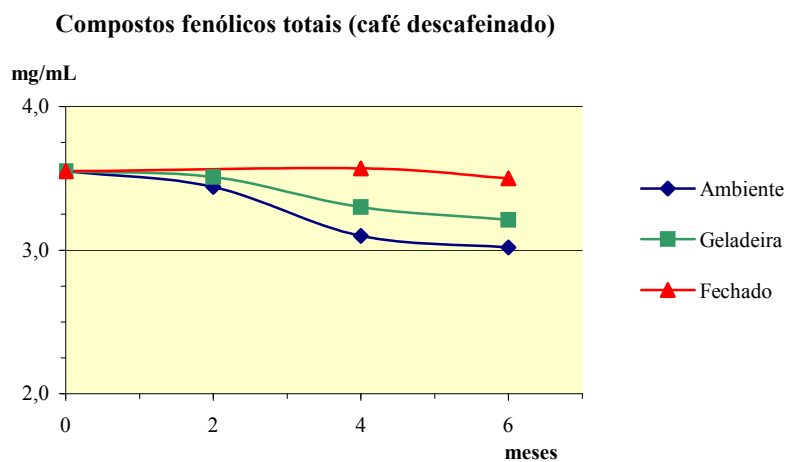


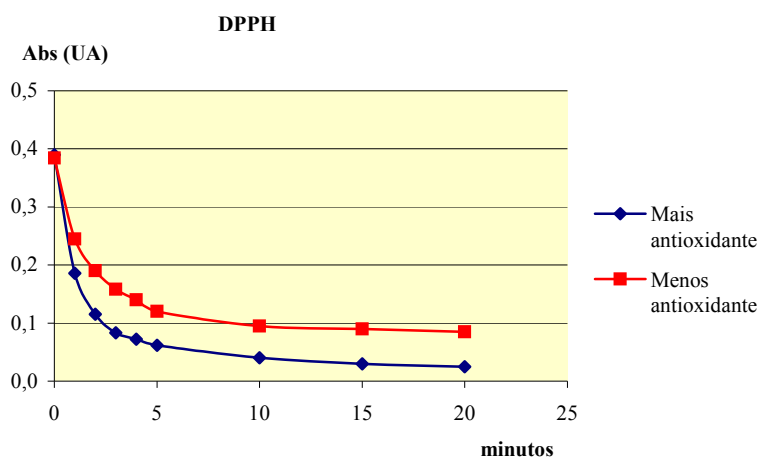
Figura 16 - Teor de compostos fenólicos totais (mg/mL de ácido gálico equivalente) em café descafeinado (n=3).



5.1.4 Capacidade antioxidante por DPPH

Conforme Huang et al. (2005), devido à complexa composição da maioria dos alimentos, a separação de cada antioxidante e o estudo individual dos mesmos seria altamente dispendioso e provavelmente ineficiente, devido a possíveis sinergismos entre os mesmos e com a matriz. Uma das técnicas desenvolvidas para contornar esta situação é o ensaio de DPPH que mede a capacidade antioxidante total da amostra através da conversão do radical livre DPPH*, que apresenta forte coloração violeta, à sua forma reduzida DPPHH que não apresenta esta cor. Quanto maior o caráter antioxidante da amostra, maior a redução da coloração. Curvas típicas para este ensaio podem ser vistas na figura 17.

Figura 17 - Curvas típicas do ensaio de DPPH para diferentes amostras.



Seguindo a metodologia descrita no item 4.5.e, as caixas 3, 4 e 5 dos três lotes de café regular foram analisadas logo após abertura. Utilizando-se diluição de 1:200 (v/v) da infusão padrão, foram observados resultados iniciais bastante homogêneos considerando-se cada lote (3 caixas em triplicata) e o conjunto dos 3 lotes. A média inicial e desvio-padrão do teste de DPPH para o café regular foi $93,16 \pm 0,69\%$. Os três lotes de café descafeinado foram igualmente analisadas, apresentando a mesma homogeneidade e média inicial com desvio-padrão de $89,64 \pm 1,24\%$.

O teste de Kolmogorov-Smirnov indicou que as distribuições dos resultados iniciais de DPPH para os dois tipos de cafés apresentaram adesão à curva normal

($p=0,993$ regular, $p=0,912$ descafeinado). Os resultados iniciais destes cafés foram comparados pelo teste “t” (amostras independentes), concluindo-se que há evidências estatísticas que a média dos valores iniciais de DPPH do café regular é diferente da média inicial do descafeinado ($p<0,001$).

Após seis meses de armazenagem das embalagens abertas (ambiente e geladeira), verificou-se que todas as amostras apresentaram pequenas reduções nas médias de DPPH, considerando-se a diferença entre os valores iniciais (na abertura da embalagem) e após este período. No café regular, esta redução foi de -2,1% (ambiente) e -2,8% (geladeira) enquanto que no café descafeinado, esta redução foi um pouco maior, totalizando -3,8% (ambiente) e -3,2% (geladeira). As amostras 1 e 2, mantidas lacradas por quatro e seis meses respectivamente, apresentaram valores médios de DPPH similares aos iniciais, indicando que estas reduções devem estar relacionadas à reações com o O_2 do ar.

Como as distribuições após seis meses apresentaram adesão à normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,482$ regular ambiente, $p=0,444$ regular geladeira, $p=0,996$ descafeinado ambiente, $p=0,773$ descafeinado geladeira), foi aplicado o teste “t” (amostras pareadas) concluindo-se que em todos os cafés, os valores de DPPH após seis meses foram diferentes dos respectivos valores iniciais ($p=0,007$ regular ambiente, $p<0,001$ para as demais amostras). Todos os resultados destes testes podem ser vistos nas figuras 18 e 19 e nos quadros VII e VIII do Anexo II.

Figura 18 - Resultados dos ensaios de DPPH (%) em café regular (n=3).

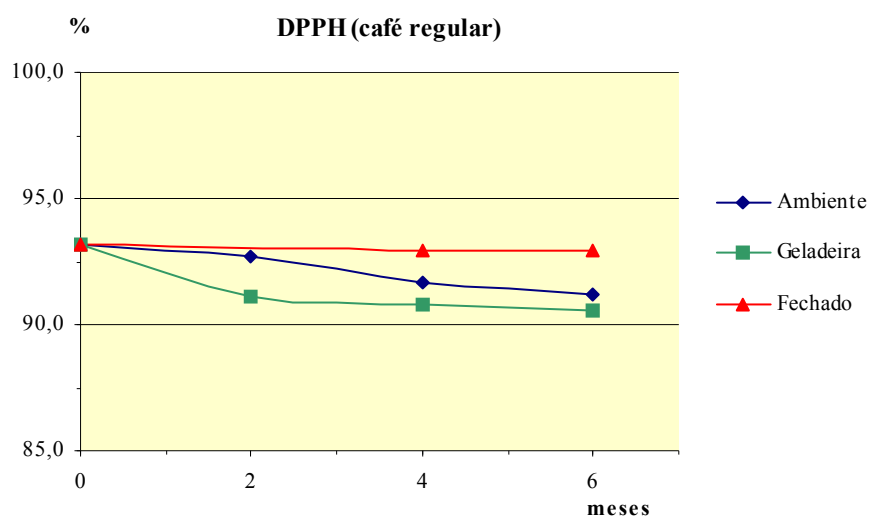
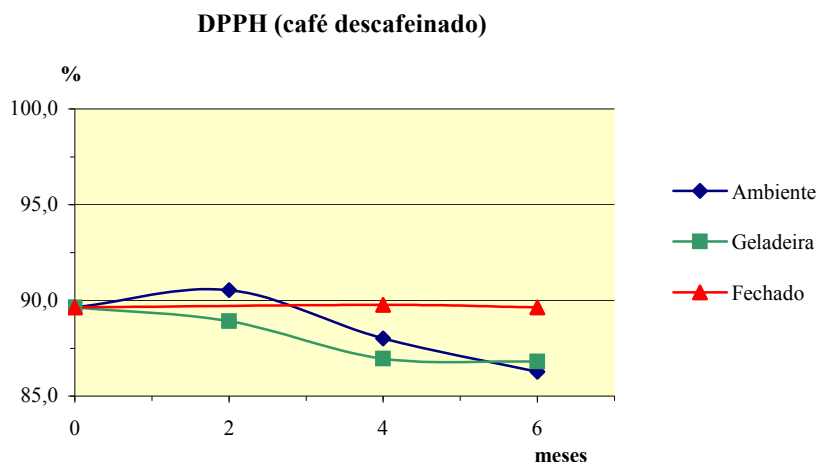


Figura 19 - Resultados dos ensaios de DPPH (%) em café descafeinado (n=3).

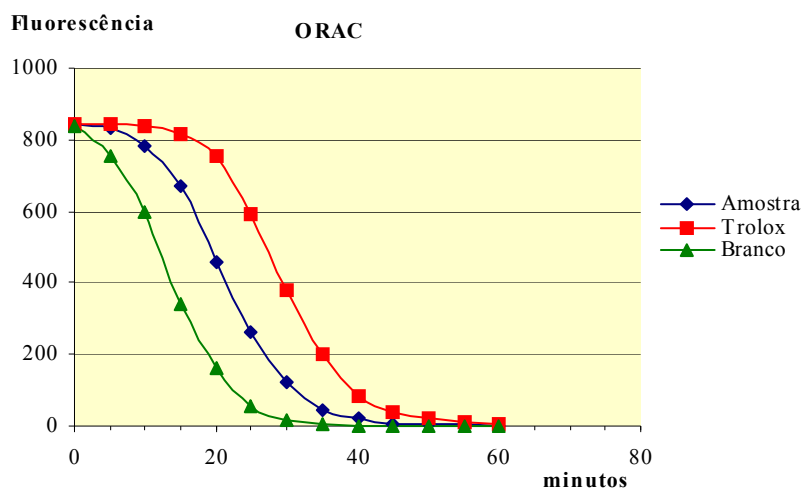


Verificou-se que todas as amostras mantidas sob observação durante seis meses apresentaram diminuição discreta da média de DPPH, independentemente da forma de armazenagem. Como as amostras mantidas lacradas praticamente mantiveram os valores iniciais, conclui-se que estas perdas devem estar relacionadas com o oxigênio do ar. Diferentemente dos outros parâmetros avaliados neste estudo, as amostras armazenadas na geladeira não apresentaram menores perdas em relação às armazenadas sob temperatura ambiente. Este fato indica que a dependência da velocidade de oxidação em relação à temperatura é mínima, dentro do intervalo avaliado (de 4°C a 20°C).

5.1.5 Capacidade antioxidante por ORAC

Outro teste utilizado para a avaliação da capacidade antioxidante total das amostras de café foi o ORAC. Esta metodologia avalia a capacidade da amostra de proteger a fluoresceína do ataque oxidante do radical livre AAPH e os resultados são expressos em comparação a um antioxidante padrão, normalmente Trolox na concentração 20 milimolar. O ORAC mede não só o tempo de proteção mas também a extensão da mesma, não se limitando ao valor final como ocorre no teste de DPPH (Ou et al, 2001). Curvas típicas deste experimento (amostra, Trolox e branco) podem ser vistas na figura 20.

Figura 20 - Curvas típicas do teste de capacidade antioxidante por ORAC.



As infusões preparadas logo após a abertura das caixas 3, 4 e 5 dos três lotes de café regular e descafeinado foram diluídas com tampão fosfato (1:4000 v/v) e analisadas, exibindo valores homogêneos. As médias iniciais e desvios-padrão do café regular e descafeinado foram 78419 ± 7041 e 64916 ± 4458 respectivamente, indicando para o descafeinado, resultado 17,2% inferior ao regular.

As distribuições iniciais de ORAC para os dois tipos de cafés apresentaram adesão à curva normal de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,313$ regular, $p=0,934$ descafeinado). As suas médias foram comparadas através do teste “t” para amostras independentes, verificando-se que existem evidências estatísticas que a média inicial do ORAC do café regular é diferente da média inicial do ORAC do descafeinado ($p < 0,001$).

Considerando-se que a maior diferença entre o café regular e o descafeinado é a ausência de cafeína no segundo, foram preparados 3 padrões desta substância com concentração próxima à do café regular (2% p/p) com os quais foram feitos testes de ORAC. A média e desvio-padrão obtidos para estes padrões após 3 repetições foi de 11673 ± 1605 , o que explica 86,4% da diferença observada entre os valores iniciais de ORAC para os cafés regular e descafeinado.

Após os testes iniciais, as amostras 3, 4 e 5 dos três lotes de café regular e descafeinado foram fracionadas em 2 sub-amostras cada, sendo armazenadas sob temperatura ambiente e em geladeira, para análise a cada dois meses. Após seis meses, todas as amostras apresentaram grandes reduções nos valores de ORAC, um

pouco mais acentuadas nas amostras de café regular (-49,9% ambiente, -21,6% geladeira) que no descafeinado (-38,8% ambiente, -21,3% geladeira). Estas reduções provavelmente estão associadas às reações dos compostos antioxidantes do café com o oxigênio presente no ar, uma vez que as amostras 1 e 2, mantidas sob temperatura ambiente porém com as caixas ainda seladas a vácuo, apresentaram valores bem próximos aos obtidos nas análises iniciais realizadas logo após a abertura das caixas 3, 4 e 5. Estes resultados de ORAC podem ser visualizados nas figuras 21 e 22 e nos quadros IX e X do Anexo II.

Figura 21 - Resultados dos testes de ORAC em café regular (n=3).

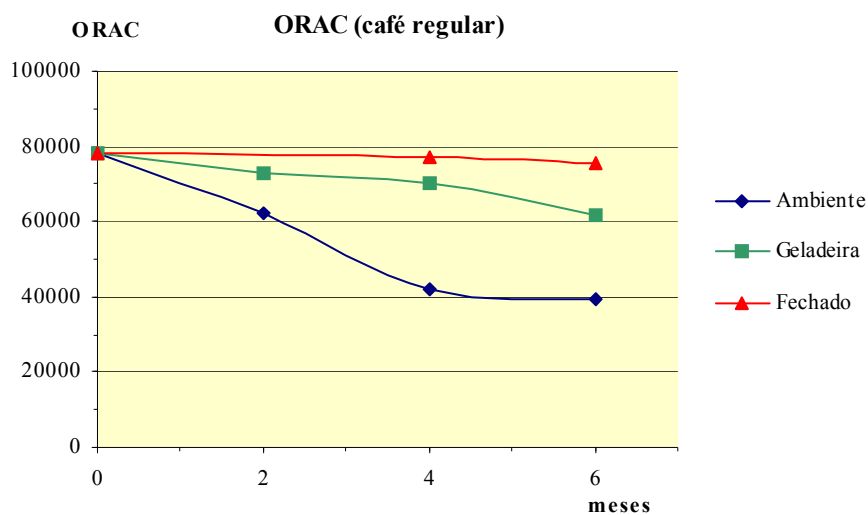
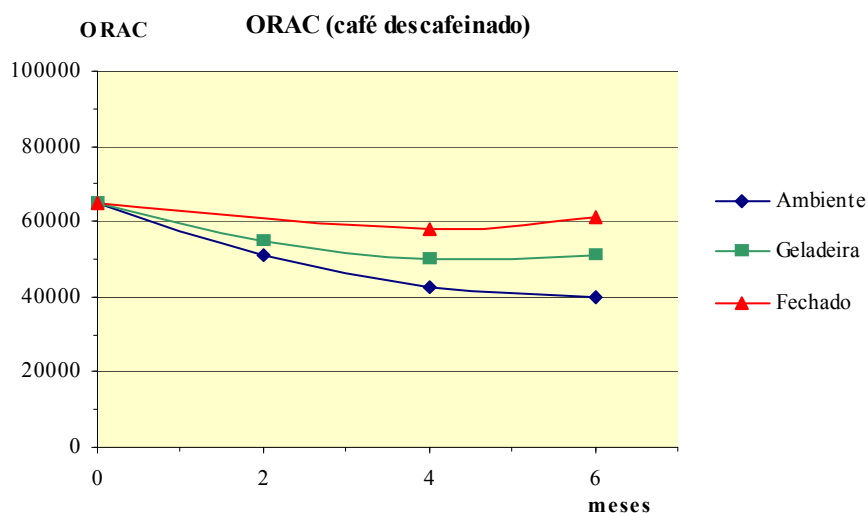


Figura 22 - Resultados dos testes de ORAC em café descafeinado (n=3).



Como as distribuições após os seis meses apresentaram adesão à curva normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,993$ regular ambiente, $p=0,541$ regular geladeira, $p=0,986$ descafeinado ambiente, $p=0,994$ descafeinado geladeira), suas médias foram comparadas com os respectivos valores iniciais através do teste “t” (amostras pareadas), concluindo-se que há evidências estatísticas que os valores de ORAC obtidos após este período são diferentes dos valores iniciais, independente da condição de estocagem à qual as embalagens abertas foram submetidas ($p=0,001$ regular geladeira, $p<0,001$ para as demais amostras). Deste fato conclui-se que ocorre grande perda da capacidade antioxidante dos cafés se os mesmos não forem utilizados em curto intervalo de tempo após a abertura da embalagem.

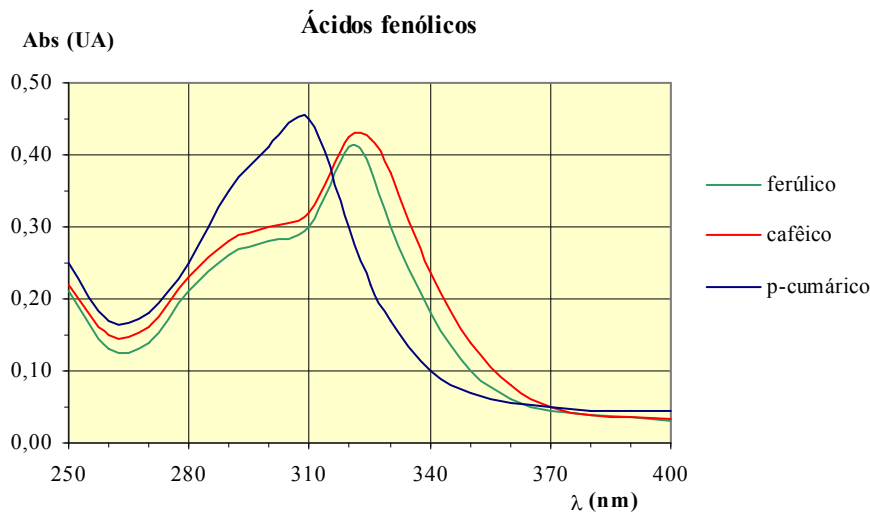
5.1.6 Teor de ácidos fenólicos

Esta foi uma das análises mais importantes da fase *in vitro*, visto que fração significativa do efeito *in vivo* esperado está diretamente relacionada com a presença destes compostos no café. Uma pesquisa indicou que os principais ácidos fenólicos deste fruto são o cafêico, o p-cumárico e o ferúlico, ocorrendo quase integralmente na forma esterificada com ácido quínico, formando os ácidos clorogênicos 5-CQA, 5-FQA e 5-p-CoQA (Mattila et al., 2006).

Como citado no item 2.7.e, a maior parte dos ácidos clorogênicos é hidrolisada nos organismos pela ação das esterases da mucosa intestinal ou pela atuação da microflora colônica, liberando os ácidos fenólicos simples (cafêico, p-cumárico e ferúlico) para absorção e biodisponibilização. Por este motivo, a quantificação dos ácidos fenólicos foi precedida da hidrólise dos ácidos clorogênicos presentes na infusão do café conforme a técnica descrita por Nardini et al. (2002b). Após a hidrólise, a quantificação foi feita por HPLC utilizando-se o método de Kowalski & Wolski (2003) pela simplicidade e rapidez. A utilização desta última metodologia foi precedida da necessária validação.

Inicialmente, foram preparados padrões de cada um dos compostos de interesse dissolvidos na fase móvel utilizada nos testes cromatográficos. Feita a varredura espectroscópica entre 250 e 400 nm, foi possível determinar o comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) para cada uma destas substâncias (figura 23).

Figura 23 - Absorbância máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) dos ácidos fenólicos de interesse.



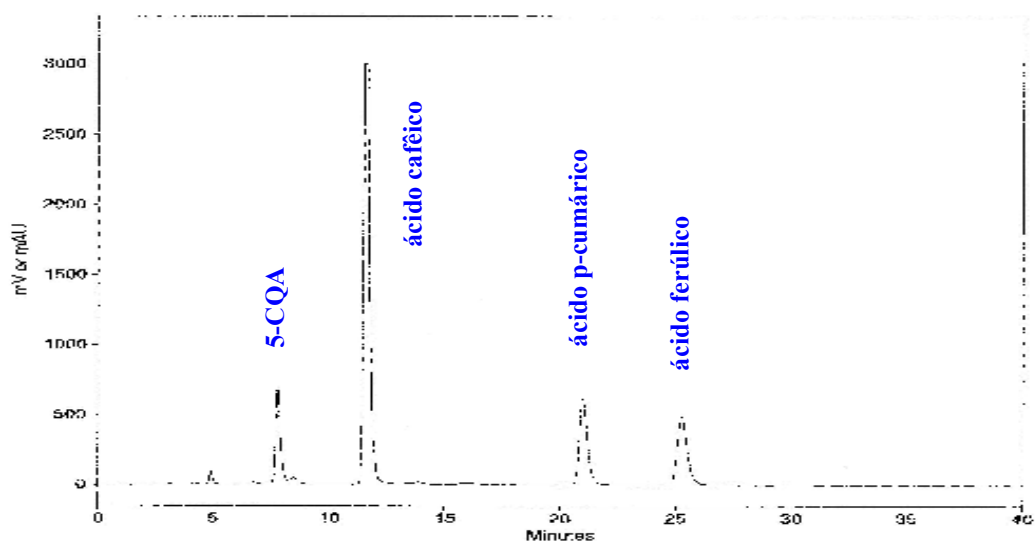
No quadro 6 podem ser vistos os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ obtidos experimentalmente neste estudo, os quais concordaram com aqueles citados na publicação de Kowalski & Wolski (2003). Desta forma, para a quantificação destes compostos foram utilizados dois canais do detector de HPLC, sendo 323 nm para os ácidos caféico e ferúlico e 309 nm para o ácido p-cumárico.

Quadro 6 - Valores de absorbâncias máximas ($\lambda_{\text{máx}}$) obtidos no presente estudo e citados na literatura (Kowalski & Wolski, 2003).

Ácido fenólico	Estudo (nm)	Literatura (nm)
Cafêico	323,0	322,6
p-Cumárico	308,8	308,9
Ferúlico	321,6	322,6

Após os testes de otimização das condições cromatográficas, verificou-se que os compostos de interesse podiam ser quantificados em corrida isocrática, à temperatura ambiente e com 30 minutos de duração, utilizando-se coluna C₁₈ de 250 x 4,6 mm, com partículas esféricas de 5 μm. A fase móvel foi definida com a composição H₂O:metanol:HAc (74:25:1 v/v), com fluxo de 0,8 mL/min. O cromatograma obtido após a injeção 20μL da amostra apresentou excelente separação, como visto na figura 24.

Figura 24 - Cromatograma dos ácidos 5-CQA, cafêico, p-cumárico e ferúlico.



Para a determinação dos tempos de retenção, foram preparadas soluções individuais destas substâncias e injetadas no HPLC para a localização dos picos. A seguir, estes padrões foram misturados e injetados novamente para a verificação de possíveis interações entre eles, sendo obtidos os mesmos tempos de retenção. Como a seqüência de separação coincidiu com a obtida por Kowalski & Wolski (2003) que confirmaram a natureza dos compostos por varredura espectroscópica no UV, não foi considerada necessária a repetição dos testes de identificação absoluta. A partir de cinco injeções da mistura, foi possível determinar os tempos de retenção médios dos compostos de interesse e os respectivos desvios-padrão (quadro 7).

Quadro 7 - Tempos de retenção dos compostos de interesse (n=5).

Repetição	Tempos de retenção (min)		
	ácido cafêico	ácido p-cumárico	ácido ferúlico
1	12,53	23,50	29,26
2	12,77	23,35	28,68
3	12,64	23,64	28,71
4	12,62	23,89	28,38
5	12,44	23,62	28,65
Média±dp	12,60±0,12	23,60±0,20	28,74±0,32

Após a determinação dos tempos de retenção, foram preparados cinco padrões com concentrações conhecidas de cada substância. Cada padrão foi injetado três vezes de maneira não consecutiva, determinando-se as respectivas áreas que apresentaram boa repetibilidade, com coeficientes de variação entre 0,35 e 1,88% (quadros XI a XIII do Anexo II). Para cada substância, foi elaborado o gráfico da média das áreas versus massa injetada, utilizado como curva de calibração para a quantificação dos ácidos fenólicos presentes nas infusões dos cafés (padrão externo). Para cada uma das curvas, foi calculada a equação linear da área versus massa, com R^2 próximos a 0,999. Os gráficos obtidos, incluindo as equações e os valores de R^2 , podem ser vistos nas figuras 25 a 27.

Figura 25 - Curva de calibração para o ácido cafêico (n=3).

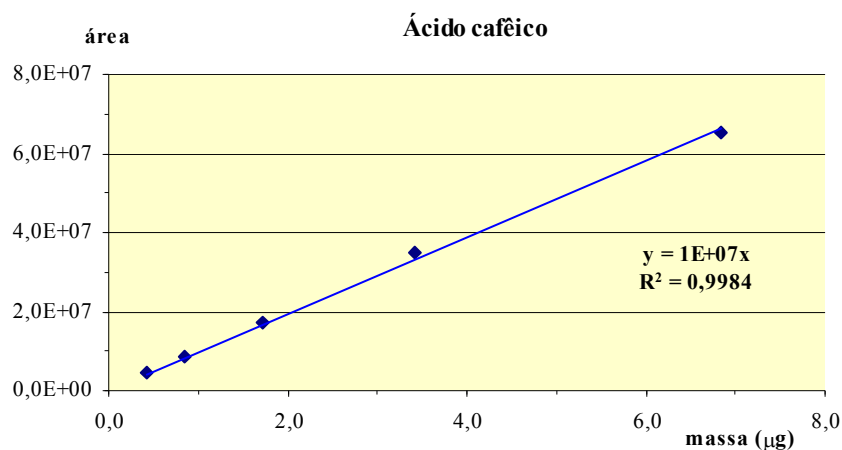


Figura 26 - Curva de calibração para o ácido p-cumárico (n=3).

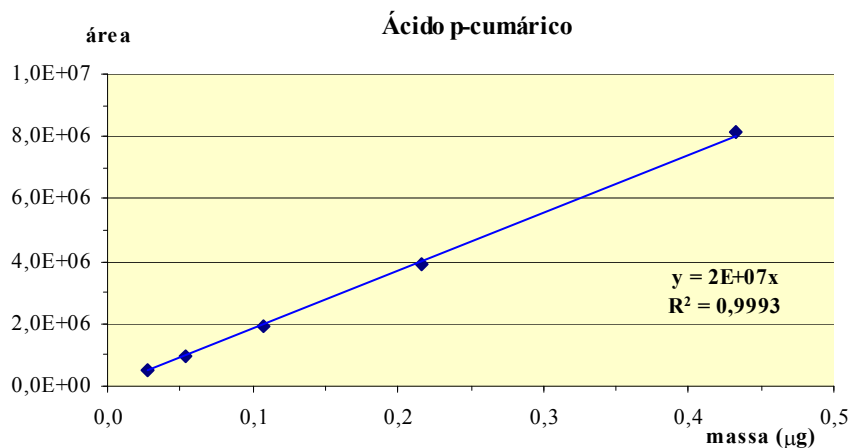
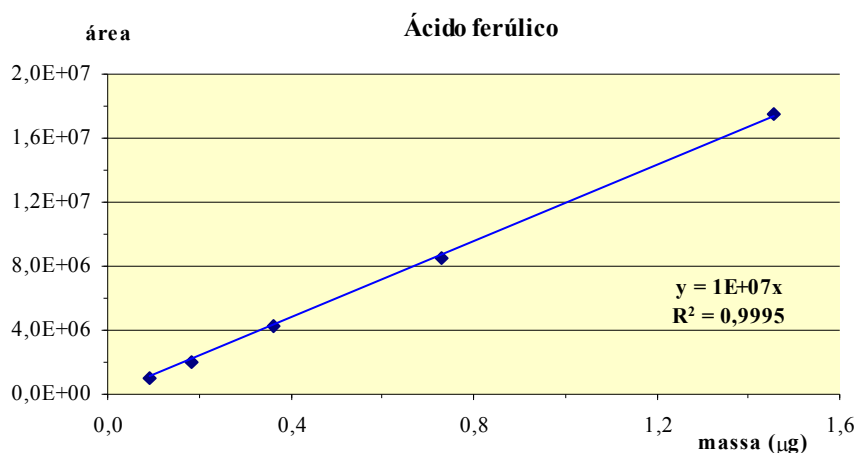


Figura 27 - Curva de calibração para o ácido ferúlico (n=3).



A seguir, foram determinados os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O ruído do HPLC foi determinado em cinco corridas consecutivas, obtendo-se média e desvio-padrão igual a $1,62 \times 10^4 \pm 0,18 \times 10^4$. Conforme Leite (1998), o limite de detecção representa o menor valor detectado com confiabilidade aceitável para o sistema, equivalendo a três vezes o ruído médio. Já o limite de quantificação equivale ao menor valor que pode ser quantificado com confiabilidade aceitável dentro das condições analíticas, sendo igual a dez vezes o ruído médio (quadro 8).

Finalmente, foram determinados os índices de recuperação para cada um dos compostos de interesse, pelo método da adição-padrão. Ao pó de café regular, foram adicionadas massas conhecidas dos ácidos cafêico, p-cumárico e ferúlico. Utilizando este café, foi preparada a infusão a qual foi analisada por HPLC para a quantificação dos três ácidos fenólicos. Os resultados variaram entre 92,9 e 101,9%, como visto no quadro 8.

Quadro 8 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e índice de recuperação (IR) para os compostos de interesse.

Ácido	Ruído médio (n=5)	LD (g) (n=5)	LQ (g) (n=5)	IR (%) (n=3)
cafêico	$1,62 \times 10^4$	$4,86 \times 10^{-9}$	$1,62 \times 10^{-8}$	95,7
p-cumárico		$2,43 \times 10^{-9}$	$0,81 \times 10^{-8}$	92,9
ferúlico		$4,86 \times 10^{-9}$	$1,62 \times 10^{-8}$	101,9

Após a validação, as infusões das caixas 3, 4 e 5 dos três lotes de café regular tiveram seu conteúdo inicial de ácidos fenólicos determinado (diluição 1:20 v/v), exibindo as médias e desvios-padrão 685,1±30,8 µg/mL para o ácido cafêico, 10,3±1,2 µg/mL para o ácido p-cumárico e 97,9±8,0 µg/mL para o ácido ferúlico. Da mesma forma, as infusões das caixas 3, 4 e 5 dos três lotes de café descafeinado foram analisadas, com os resultados 594,3±28,9 µg/mL para o ácido cafêico, 8,8±1,2 µg/mL para o ácido p-cumárico e 70,9±8,1 µg/mL para o ácido ferúlico. As médias iniciais do café descafeinado foram inferiores às do regular para todos os ácidos fenólicos, o que concorda com a tendência descrita por Farah et al. (2006).

Observou-se médias iniciais das infusões do café regular inferiores às relatadas nos trabalhos de Mattila & Kumpulainen (2002), Nardini et al. (2002a) e Mattila et al. (2006) e desvios-padrão compatíveis (quadro 9). Inicialmente estas diferenças pareceram inconsistentes uma vez que o presente estudo utilizou maior quantidade de pó de café na preparação das infusões. Este fato pode ser justificado pelos menores teores de ácidos fenólicos livres ou combinados nos cafés de origem brasileira, conforme relatado por Farah & Donangelo (2006).

Quadro 9 - Comparação dos ácidos fenólicos presentes nas infusões de café regular e quantidade de pó utilizada nas infusões.

Autores	Ácido (µg/mL)			Infusão
	cafêico	p-cumárico	ferúlico	
Mattila & Kumpulainen	960,0±31,3	13,7±0,6	90,0±3,0	54 g/L
Nardini et al.	830,0±69,9	14,0±1,1	142,8±12,3	60 g/L
Mattila et al.*	870,0±22,0	12,7±0,5	91,0±3,6	50 g/L
Estudo	685,1±30,8	10,3±1,2	97,9±8,0	80 g/L

Nota: a referência assinalada por * teve as unidades adaptadas para comparação dos resultados. Não foram citadas as espécies científicas dos cafés utilizados nos outros trabalhos.

As distribuições dos ácidos fenólicos presentes nas infusões dos cafés regular e descafeinado logo após a abertura das caixas foram avaliadas por Kolmogorov-Smirnov, apresentando adesão à curva normal (p=0,998 cafêico regular, p=0,964 p-cumárico regular, p=0,748 ferúlico regular, p=0,985 cafêico descafeinado, p=0,971

p-cumárico descafeinado, $p=0,915$ ferúlico descafeinado). Os valores foram comparados através do teste “t” (amostras independentes) concluindo-se que existem evidências estatísticas que as médias iniciais do café regular são diferentes do descafeinado ($p<0,001$ cafêico e ferúlico, $p=0,017$ p-cumárico).

Após os testes iniciais, o conteúdo das caixas 3, 4 e 5 dos cafés regular e descafeinado foram divididos e armazenados por seis meses à temperatura ambiente e em geladeira. Após este prazo, verificou-se que todas as amostras apresentaram reduções dos teores de ácidos fenólicos, bem mais acentuadas nas armazenadas à temperatura ambiente que na geladeira. As amostras mantidas lacradas sob vácuo à temperatura ambiente pelo mesmo período apresentaram apenas pequenas variações, dentro do desvio experimental (quadro 10).

Quadro 10 – Reduções (%) dos teores seis meses após a abertura das caixas (n=3).

Café tipo	Ácido fenólico	Ambiente (%)	Geladeira (%)	Lacrado (%)
Regular	cafêico	-19,2	-6,3	+2,0
	p-cumárico	-13,6	-7,8	-1,9
	ferúlico	-18,4	-8,2	-1,2
Descafeinado	cafêico	-11,9	-6,2	-3,2
	p-cumárico	-14,8	-4,5	+1,1
	ferúlico	-19,6	-7,1	+1,8

As distribuições após seis meses foram submetidas ao teste de Kolmogorov-Smirnov, verificando-se que apresentaram adesão à curva normal ($p=0,889$ cafêico regular ambiente, $p=0,985$ p-cumárico regular ambiente, $p=0,643$ ferúlico regular ambiente, $p=0,999$ cafêico regular geladeira, $p=0,709$ p-cumárico regular geladeira, $p=0,895$ ferúlico regular geladeira, $p=0,792$ cafêico descafeinado ambiente, $p=0,911$ p-cumárico descafeinado ambiente, $p=0,721$ ferúlico descafeinado ambiente, $p=0,896$ cafêico descafeinado geladeira, $p=0,992$ p-cumárico descafeinado geladeira, $p=0,773$ ferúlico descafeinado geladeira). As médias obtidas após seis meses para o café regular foram comparadas às respectivas médias iniciais (teste “t”, amostras pareadas), verificando-se que quatro condições apresentaram reduções

estatisticamente significativas ($p < 0,001$ café ambiente, $p = 0,015$ p-cumárico ambiente, $p = 0,001$ ferúlico ambiente, $p = 0,025$ café geladeira,) enquanto que nas demais, isto não ocorreu ($p = 0,083$ p-cumárico geladeira, $p = 0,080$ ferúlico geladeira). Da mesma maneira, as médias obtidas após seis meses para o café descafeinado foram comparadas às respectivas médias iniciais, verificando-se que duas apresentaram reduções estatisticamente significativas ($p < 0,001$ café ambiente, $p = 0,012$ ferúlico ambiente) enquanto que as demais não o fizeram ($p = 0,059$ p-cumárico ambiente, $p = 0,092$ café geladeira, $p = 0,183$ p-cumárico geladeira, $p = 0,137$ ferúlico geladeira). Todos estes valores podem ser vistos nas figuras 28 a 30 (média \pm dp) e nos quadros XIV a XVI do Anexo II.

Figura 28 - Teor de ácido caféico em função do tempo de armazenagem (n=3).

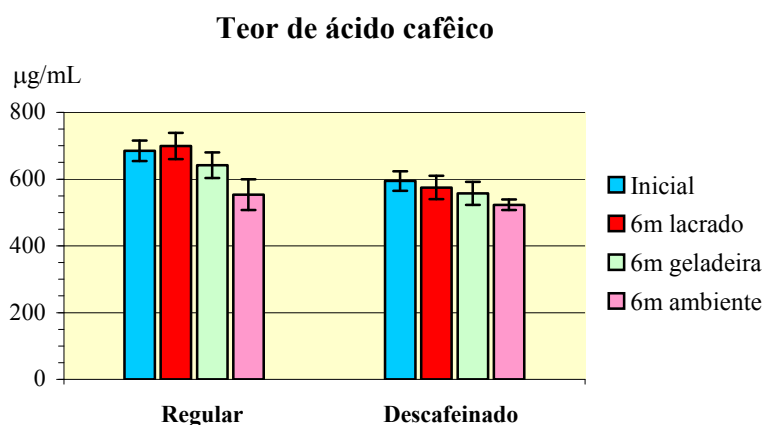


Figura 29 - Teor de ácido p-cumárico em função do tempo de armazenagem (n=3).

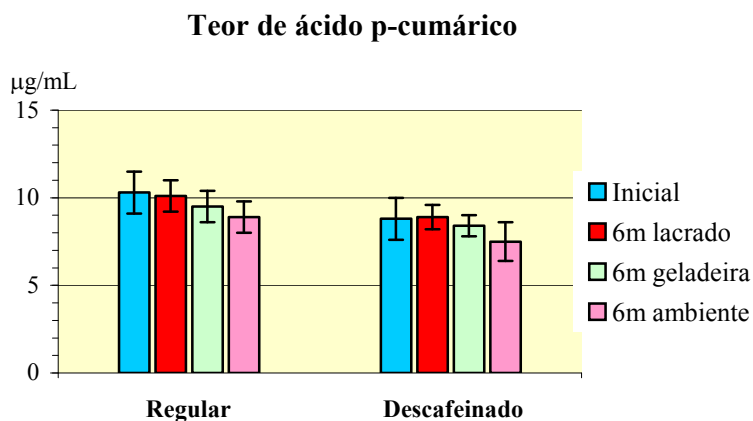
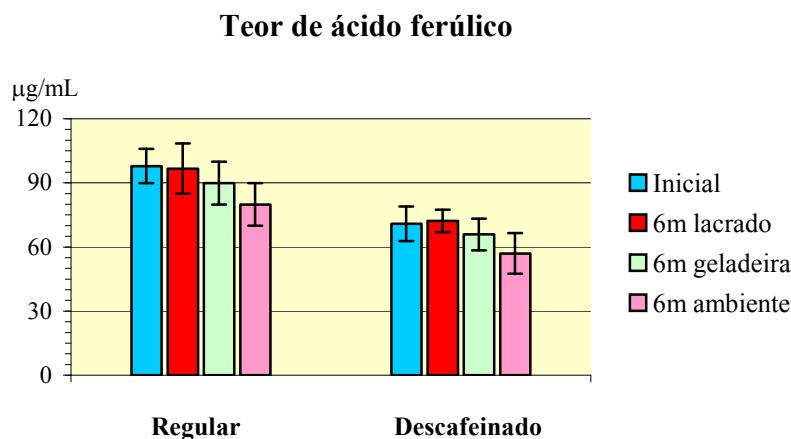


Figura 30 - Teor de ácido ferúlico em função do tempo de armazenagem (n=3).



Uma vez que as amostras armazenadas por seis meses ainda lacradas e sob vácuo apresentaram médias praticamente iguais às iniciais para todos os ácidos fenólicos, é razoável supor que estas reduções estão relacionadas à reações oxidativas causadas pelo oxigênio do ar.

5.1.7 Discussão dos resultados *in vitro*

Após a realização dos testes previstos para a etapa *in vitro*, foi possível verificar que os cafés regular e descafeinado apresentaram importantes diferenças de composição e de capacidade antioxidante. Os aspectos mais importantes estão discutidos a seguir.

a) Umidade: as caixas abertas e armazenadas por seis meses à temperatura ambiente apresentaram grande aumento percentual de umidade (+24,6% regular, +26,6% descafeinado) enquanto que as amostras da geladeira e as conservadas fechadas sob vácuo praticamente mantiveram os valores iniciais. Apesar do significativo aumento percentual verificado à temperatura ambiente, a composição centesimal das amostras foi pouco afetada pois as umidades iniciais eram bastante baixas (variação de 2,48% para 3,09% no regular e de 2,33% para 2,95% no descafeinado). Este item não se mostrou crítico na análise da estabilidade dos cafés e as infusões foram preparadas considerando-se base úmida, como indicado pela ABIC.

b) Atividade de água: os resultados iniciais e os obtidos após seis meses de armazenagem nas duas condições (ambiente e geladeira) mostraram-se bastante favoráveis à segurança microbiológica dos produtos pois se situaram abaixo de 0,43 no regular e de 0,39 no descafeinado. Interessante relatar que a atividade de água apresentou gradiente ligeiramente decrescente no período de estudo enquanto que a umidade apresentou nítida variação crescente. Novamente, as amostras mantidas lacradas e sob vácuo à temperatura ambiente apresentaram resultados semelhantes aos obtidos na abertura das caixas 3, 4 e 5 nos dois tipos de cafés.

c) Compostos fenólicos totais: as infusões dos dois tipos de cafés apresentam teor de compostos fenólicos totais iniciais praticamente iguais (3,52 e 3,55 mg/mL de ácido gálico equivalente para regular e descafeinado), indicando extração bastante seletiva para a cafeína na etapa de descafeinização. Após seis meses de armazenagem, as amostras abertas e mantidas à temperatura ambiente apresentaram grandes reduções (-19,6% regular, -14,9% descafeinado), as mantidas na geladeira exibiram reduções menores e iguais entre si (-9,6% nos dois tipos) e as conservadas fechadas e sob vácuo praticamente não apresentaram alterações. Estes resultados indicaram que a presença de oxigênio do ar é o fator mais importante na perda dos compostos fenólicos totais do café, mas a temperatura de armazenagem também influi.

d) Capacidade antioxidante por DPPH: as infusões preparadas à partir dos dois tipos de cafés apresentaram alta capacidade antioxidante inicial (93,16% regular, 89,64% descafeinado). Após a armazenagem por seis meses, foram observadas reduções entre -2,1 e -3,8% em todas as amostras abertas, independente da temperatura de armazenagem. Como as infusões obtidas das amostras mantidas fechadas e sob vácuo praticamente não apresentaram reduções, há fortes evidências que as perdas da capacidade antioxidante medidas por DPPH estejam relacionadas a reações oxidativas causadas pelo oxigênio do ar, sendo a cinética das mesmas pouco afetada pela temperatura no intervalo avaliado (de 4°C a 20°C).

e) Capacidade antioxidante por ORAC: as amostras recém-abertas dos dois tipos de cafés apresentaram capacidade antioxidante bastante elevadas (as infusões foram

diluídas 4.000 vezes para a realização dos testes), sendo que o tipo regular exibiu média 17,2% superior à do descafeinado. Testes com soluções 2% (p/p) de cafeína dissolvida em tampão fosfato mostraram que 86,4% desta diferença pode ser associada à ausência de cafeína no segundo tipo. Após seis meses de armazenagem, não houve perda significativa de ORAC nas amostras mantidas fechadas sob vácuo, as amostras abertas mantidas na geladeira apresentaram reduções significativas e praticamente iguais (-21,6% regular, -21,3% descafeinado) e nas caixas mantidas à temperatura ambiente, ocorreram elevadas perdas (-49,9% regular, -38,8% descafeinado). Estes resultados indicaram que as reduções da capacidade antioxidante medida por ORAC estão associadas à reações oxidativas causadas pelo oxigênio do ar e que a temperatura de armazenagem é crítica no aumento da velocidade destas reações.

f) Ácidos fenólicos: como relatado na literatura, as médias iniciais dos ácidos fenólicos avaliados (cafêico, p-cumárico e ferúlico) foram superiores no café regular em relação ao descafeinado. Também foi verificado que os cafés de origem brasileira possuem teores de ácidos fenólicos inferiores aos produtos de outros países, confirmando comparações já publicadas. Após a armazenagem das amostras abertas por seis meses, verificou-se que ocorreram reduções variando entre -4,5% e -19,6%, sendo que as perdas à temperatura ambiente foram pelo menos o dobro daquelas observadas nas amostras mantidas na geladeira. Como nos itens anteriores, as amostras mantidas lacradas e sob vácuo pelo mesmo período praticamente mantiveram os teores iniciais, o que permite relacionar as perdas à reações oxidativas causadas pelo oxigênio do ar e que as velocidades destas reações dependem diretamente da temperatura.

Os resultados obtidos indicaram que os dois tipos de cafés apresentam forte atividade antioxidante *in vitro*, o que é plenamente justificado pela composição deste fruto. A presença de grandes quantidades de compostos polifenólicos, ácidos fenólicos esterificados como CGA e cafeína (no caso do café regular) já permitiriam antecipar esta característica, fato confirmado pelos elevados resultados obtidos nos testes de ORAC e DPPH.

Como publicado por Parras et al. (2007), estudos já mostraram que o café apresenta capacidade antioxidante superior a vários alimentos reconhecidamente funcionais como cereais, chocolate e chá preto. Diferentes testes como oxidação da LDL, ensaios microssomais, Rancimat, sistema *OH-aldeído e linoleato também confirmaram esta conclusão. Parcela importante desta ação pode ser creditada à cafeína que exibe capacidade similar à glutathiona e superior ao ácido L-ascórbico de abater espécies reativas como LOO* e *OH. A cafeína apresenta característica eletrofílica que possibilita a remoção de elétrons em competição ao oxigênio, protegendo as células de danos oxidativos excessivos.

Utilizando o sistema β -caroteno-ácido linoléico, Pellegrini et al. (2003) estabeleceram uma boa posição para o café em uma lista de alimentos antioxidantes, seguido por frutas cítricas e diversas bebidas como chá e chocolate. Neste mesmo estudo, o café descafeinado apresentou resultado 25 a 30% inferior ao café regular, compatível com a diferença obtida no presente trabalho quando esta propriedade foi medida por ORAC. Os resultados relatados por Parras et al. (2007) para os dois tipos de cafés, medidos por TEAC (“Trolox equivalent antioxidant capacity”), variaram bastante dependendo da forma de preparo do café (filtrado, expresso ou tipo italiano), sendo que na bebida filtrada, a diferença variou entre 27 e 34%. Estes valores confirmam mais uma vez que a metodologia utilizada é de extrema importância para a obtenção das conclusões.

Os resultados relatados por Sánchez-González et al. (2005) para compostos fenólicos totais variaram entre $1,8 \pm 0,1$ a $3,7 \pm 0,1$ mg/mL de ácido gálico equivalente, compatíveis aos encontrados neste estudo. Entretanto, os mesmos autores destacaram que testes *in vitro* são simples indicadores do potencial antioxidante do alimento, pois não consideram a biodisponibilização nos organismos que, no caso dos CGA, depende da ação de esterases intestinais.

Todos os resultados indicaram que o café regular possui capacidade antioxidante *in vitro* superior ao descafeinado, sendo selecionado para os testes *in vivo* (item 5.2). As amostras mantidas fechadas e sob vácuo por seis meses não apresentaram perdas significativas em nenhum dos parâmetros analisados, indicando que os produtos comercializados neste tipo de embalagem são mais estáveis e devem ser preferidos pelo consumidor.

5.2 TESTES *IN VIVO*

Em função dos resultados obtidos no item 5.1, a etapa *in vivo* foi realizada utilizando-se infusão de café regular, sendo dividida em três séries. Na primeira, com administração de dose única, foi avaliada se a infusão deste fruto altera a atividade enzimática e a capacidade antioxidante hepática de ratos e qual o tempo para se obter esta resposta. Na segunda, também com dose única, estudou-se a dependência da intensidade da resposta a diferentes doses de infusão de café. Na última, com doses repetidas (30 dias), visou-se avaliar estas alterações em período mais longo de tempo e verificar a ocorrência de danos hepáticos.

Figura 31 - *Ratus norvegicus* variedade *Wistar* utilizados no estudo.



Para estas determinações, foi utilizado o homogenato do tecido hepático e as análises ocorreram em até 48 horas após a eutanásia, para minimizar possíveis perdas da atividade enzimática. Para a anestesia, foi utilizada uma mistura de Dopalen[®] (cloridrato de ketamina) e Anasedan[®] (cloridrato de xilazina) na proporção 3:1 (v/v), sendo administrado 0,1 mL/kg de massa corporal, por via intraperitoneal. Após a obtenção do efeito da anestesia, a eutanásia foi realizada por exangüinação através de punção cardíaca, seguida da abertura abdominal por incisão na linha média.

As doses de infusão de café previstas em cada série foram administradas por gavagem, sempre no período matinal e com a infusão preparada no momento do uso. O volume foi limitado ao máximo de 2,0 mL por gavagem, a fim de evitar desconforto aos animais e possíveis problemas gastrintestinais.

Figura 32 - Administração da gavagem da infusão de café.



Antes da coleta do fígado, o mesmo foi perfundido com 80 mL de soro fisiológico através da veia porta para a remoção do sangue. Após a coleta, o tecido foi lavado com soro fisiológico, embalado em papel-alumínio e resfriado em N₂ líquido para transporte até a FSP-USP, para preparação imediata do homogenato.

Figura 33 - Perfusão do fígado com soro fisiológico.



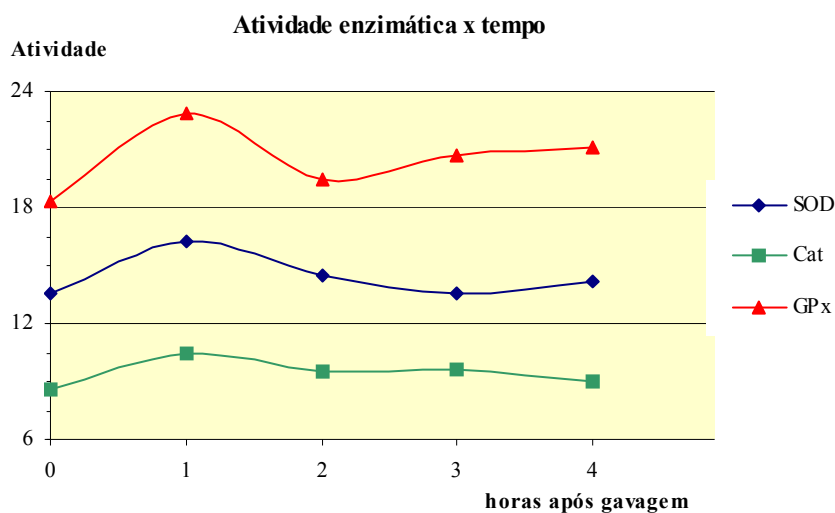
Para a obtenção do homogenato, cerca de 1,0 grama do tecido hepático foi homogeneizado com 3,0 mL de tampão fosfato (0,1 molar, pH=7,0) e centrifugado a 1.010g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado a 11.200g por 20 minutos a 4°C. O segundo sobrenadante foi diluído na proporção 1:10 (v/v) com tampão fosfato e submetido a ultracentrifugação a 30.000 rpm por 60 minutos a 4°C. O sobrenadante da última operação foi transferido para tubos Eppendorf e armazenado em ultrafreezer (-80°C) até o momento das análises.

5.2.1 Tempo de resposta

Neste item, foi pesquisado o tempo de resposta para alterações hepáticas após a administração oral de dose única de infusão de café. Os animais do grupo 1 (controle) foram mantidos por quatro dias em adaptação, recebendo ração AIN-76 e água *ad libitum*. Após este período, foram submetidos a jejum de 15 horas seguido de gavagem de 2 mL de água mineral. Uma hora após a gavagem, os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia para a retirada do fígado. O homogenato hepático foi analisado para a determinação da atividade enzimática (SOD, GPx e Cat) e da capacidade antioxidante (ORAC). O grupo 2 recebeu igual tratamento exceto pela substituição da água por 2 mL de infusão de café. Uma hora após a gavagem, os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia para coleta do fígado, sendo realizadas as mesmas análises do grupo 1. Os grupos 3, 4 e 5 foram submetidos ao mesmo tratamento mas a eutanásia e coleta do fígado foram realizadas 2, 3 e 4 horas após a gavagem, respectivamente.

Com os resultados obtidos (quadro XVII do Anexo II), foram elaboradas as figuras 34 e 35 que mostram a variação da atividade enzimática e da capacidade antioxidante em função do tempo para a eutanásia após a administração de 2 mL de infusão de café. Os resultados do grupo controle estão representados no tempo 0.

Figura 34 - Variação da atividade enzimática hepática de ratos em função do tempo para eutanásia após gavagem de dose única de 2 mL de infusão de café (n=6).



Para a SOD, os homogenatos foram diluídos na razão 1:20 (v/v) com tampão fosfato e analisados conforme o item 4.5.i. O grupo 1 (controle) apresentou média±desvio-padrão de 13,6±1,6 U/mg de proteína, próxima às publicadas por Kakarla et al. (2005) e Kim et al. (2008) que relataram 15,79±0,22 e 14,35±1,63 U/mg de proteína respectivamente e inferior à relatada por Yeh & Yen (2006) de 23,1±4,2 U/mg de proteína. O grupo 2 (2 mL de café, eutanásia após 1 hora) apresentou o valor 16,2±1,5 U/mg de proteína, 19,1% superior ao controle. Estas distribuições foram avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov verificando-se que apresentaram adesão à curva normal (p=0,485 grupo 1, p=0,371 grupo 2). As médias destes grupos foram comparadas pelo teste “t” para amostras independentes, verificando-se que a diferença foi estatisticamente significativa (p=0,015). A partir do grupo 3 (2 mL de café, eutanásia após 2 horas) até o grupo 5 (2,0 mL de café, eutanásia após 4 horas), os valores foram gradualmente diminuindo (14,5±0,9, 13,6±1,3 e 14,2±1,6 U/mg de proteína), mas ainda se mantiveram acima do controle. Pelo teste de Kolmogorov-Smirnov foi verificado que as distribuições destes últimos grupos também apresentaram distribuições normais (p=0,963 grupo 3, p=0,955 grupo 4, p=0,967 grupo 5) mas as diferenças em relação ao grupo controle não foram estatisticamente significativas pelo teste “t” para amostras independentes (p=0,224 grupo 3, p=0,999 grupo 4, p=0,531 grupo 5). Na figura 34 pode ser observado que o aumento máximo da atividade da SOD, nas condições dos ensaios, ocorreu 1 hora após a gavagem, decrescendo gradualmente após este período mas sem retornar ao valor do grupo controle após 4 horas, indicando efeito residual.

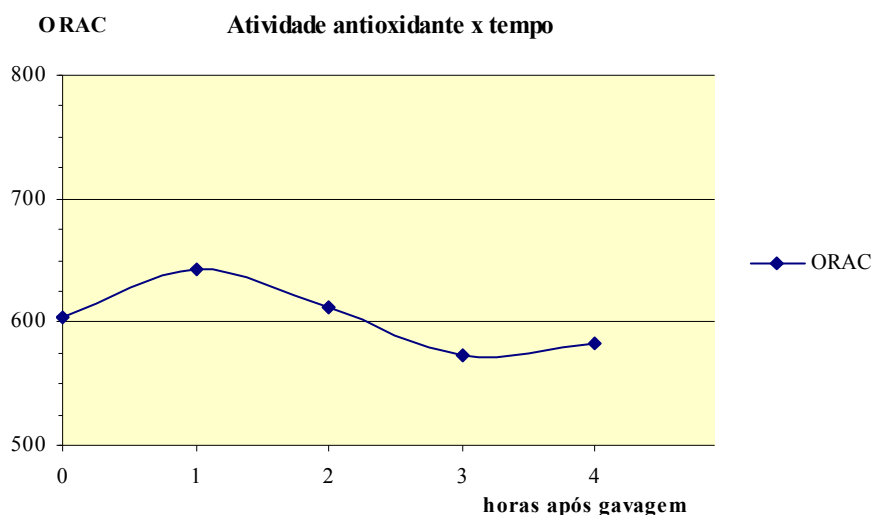
Para a Cat, os homogenatos foram diluídos na proporção 1:5 (v/v) com tampão fosfato, sendo utilizada a metodologia descrita no item 4.5.g. O grupo 1 apresentou média±desvio-padrão de 8,6±1,2 $\mu\text{mol}/\text{min.mg}$ de proteína, comparável aos trabalhos de Kakarla et al. (2005) e Yeh & Yen (2006) que encontraram 7,54±0,06 e 10,5±3,4 $\mu\text{mol}/\text{min.mg}$ de proteína respectivamente e superior à publicação de Kim et al. (2008) que relataram 2,41±0,23 $\mu\text{mol}/\text{min.mg}$ de proteína. Ao se analisar o grupo 2, foi obtido o valor 10,5±0,9 $\mu\text{mol}/\text{min.mg}$ de proteína, 22,1% superior ao grupo controle. Estas distribuições foram submetidas ao teste de Kolmogorov-Smirnov, concluindo-se que apresentaram adesão à curva normal (p=0,983 grupo 1, p=0,865 grupo 2). A diferença das médias foi avaliada pelo teste “t” para amostras

independentes, verificando-se que apresentou significância estatística ($p=0,015$). Para os grupos 3 a 5, foram obtidos os valores $9,5\pm 0,9$, $9,6\pm 0,8$ e $9,0\pm 0,8$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína, menores que do grupo 2 mas maiores que do controle. Estas distribuições foram analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, verificando-se que todas apresentaram aderência à curva normal ($p=0,846$ grupo 3, $p=0,677$ grupo 4, $p=0,970$ grupo 5). Apesar dos grupos 3, 4 e 5 apresentarem médias superiores ao controle, as suas diferenças não mostraram significância estatística quando avaliadas pelo teste “t” para amostras independentes ($p=0,194$ grupo 3, $0,153$ grupo 4, $p=0,618$ grupo 5). Através da figura 34 e de forma semelhante à SOD, foi possível observar que o maior ganho na atividade da Cat, nas condições dos ensaios, ocorreu 1 hora após a gavagem. Pode também ser visto que a atividade apresentou decréscimo ao longo do tempo, sem retornar ao valor do grupo controle após 4 horas, indicando efeito residual similar à SOD.

Para a GPx, os homogenatos foram analisados sem diluição, sendo utilizada a técnica mencionada item 4.5.h. Os animais do grupo 1 apresentaram média \pm desvio-padrão de $18,3\pm 2,4$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína, comparável aos trabalhos de Yeh & Yen (2006) e Shanmugarajan et al. (2008) que encontraram $20,1\pm 3,9$ e $19,65\pm 0,48$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína, respectivamente. Para o grupo 2, o valor obtido foi de $22,9\pm 2,3$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína, 25,1% acima do controle. As distribuições dos grupos 1 e 2 foram avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, concluindo-se que ambas apresentaram adesão à curva normal ($p=0,785$ grupo 1, $p=0,887$ grupo 2). Estas médias foram comparadas através do teste “t” para amostras independentes, observando-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,007$). Os grupos 3, 4 e 5 foram igualmente avaliados, obtendo-se $19,5\pm 2,0$, $20,7\pm 2,4$ e $21,1\pm 2,7$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína, todas inferiores ao grupo 2 mas superiores ao controle. As distribuições destes grupos também foram verificadas através do teste de Kolmogorov-Smirnov, constatando-se que todas apresentaram aderência à curva normal ($p=0,784$ grupo 3, $p=0,718$ grupo 4, $p=0,597$ grupo 5). Em relação ao controle, as médias dos grupos 3 a 5 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas pelo teste “t” para amostras independentes ($p=0,365$ grupo 3, $0,115$ grupo 4, $p=0,082$ grupo 5). Verificou-se na figura 34 que a administração de dose única de infusão de café aumentou em mais de 25% a atividade da GPx, similar ao observado para a

SOD e a Cat. Este aumento foi máximo 1 hora após a gavagem e a homeostasia redox do animal agiu no sentido de normalizar esta atividade no decorrer do tempo, sem retornar ao valor basal após 4 horas, como visto para as outras enzimas.

Figura 35 - Variação da atividade antioxidante hepática de ratos em função do tempo para eutanásia após gavagem de dose única de 2 mL de infusão de café (n=6).



Para os testes de ORAC, a diluição dos homogenatos foi feita na proporção 1:40 (v/v) com tampão fosfato, sendo utilizada a técnica analítica descrita no item 4.5.f. A média±desvio-padrão obtida para o grupo 1 (controle) foi 604±52 enquanto que para o grupo 2 foi 643±97, com aumento de 6,5% em relação ao grupo 1. Não foram encontradas publicações que tivessem estudado a administração de infusão de café em ratos para comparações, mas Prior et al. (2007) relataram aumentos de ORAC no plasma de humanos após a administração de porções únicas de morango (+7,0%), kiwi (+8,4%) e uva vermelha (+9,5%). As distribuições dos grupos 1 e 2 foram avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, concluindo-se que apresentaram adesão à curva normal (p=0,950 grupo 1, p=0,964 grupo 2). A diferença entre as médias foi avaliada pelo teste “t” para amostras independentes, concluindo-se que não foi estatisticamente significativa (p=0,403). Os grupos 3 a 5 foram igualmente analisados, obtendo-se os valores 612±23, 573±67 e 583±54, todos com distribuição normal segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov (p=0,709 grupo 3, p=0,983 grupo 4, p=0,981 grupo 5). As médias destes grupos foram avaliadas através do teste “t”

(amostras independentes), também não exibindo diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo 1 ($p=0,725$ grupo 3, $p=0,387$ grupo 4, $p=0,514$ grupo 5). Na figura 35 observa-se que a média do teste ORAC apresentou aumento máximo 1 hora após a gavagem e decresceu após este tempo, chegando a exibir valores inferiores ao do grupo controle nas amostras após 3 e 4 horas. Possível explicação para este comportamento seria o excesso de O_2^- e conseqüente O_2^{2-} e H_2O_2 causado pelo aumento da atividade da SOD (Pincemail, 2006) e/ou pela homeostase redox intracelular baseada principalmente no par GSH/GSSG que agiria no sentido de manter os potenciais redox nos hepatócitos (Dröge, 2002; Valko et al., 2007). Este fato também foi observado nos trabalhos de Prior et al. (2003) e Prior et al. (2007), nos quais o tempo de resposta máxima para humanos variou entre 1 e 3 horas, concordando com o presente estudo.

5.2.2 Dependência dose/resposta

Neste item, foram administradas diferentes doses de infusão de café para verificar se a variação da atividade enzimática e da capacidade antioxidante hepática é dose-dependente e qual a menor dose para se obter efeito estatisticamente significativo. Para o grupo controle, foram administrados 2 mL de água mineral (dose zero). A maior dose de infusão de café administrada foi de 2,0 mL, que é o volume máximo para não causar desconforto durante a gavagem e distúrbios no sistema gastrointestinal dos animais.

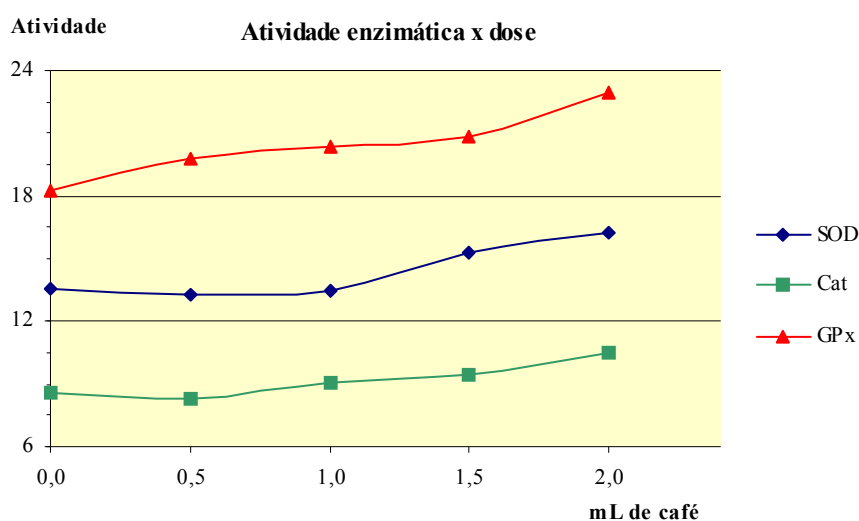
Conforme os resultados obtidos no item 5.2.1, o tempo para resposta máxima foi de 1 hora após a gavagem, sendo utilizado para todos os grupos desta série. Os resultados do grupo 1 (controle) e do grupo 2 (2,0 mL de infusão), já comentados anteriormente, também se enquadraram nas condições para esta série, sendo aproveitados para evitar a eutanásia desnecessária de animais.

O grupo 6 foi submetido à mesma adaptação do grupo 1. Após o período de jejum de 15 horas, foi administrado 0,5 mL de infusão de café. Decorrido o tempo de resposta máxima (1 hora), os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia para a coleta do fígado, sendo realizadas as mesmas análises já citadas. Os grupos 7 e 8 receberam o mesmo tratamento do grupo 6 exceto que as doses administradas

foram de 1,0 e 1,5 mL de infusão de café, respectivamente.

À partir dos resultados obtidos nesta série (quadro XVIII do Anexo II), foram elaboradas as figuras 36 e 37 que mostram a variação da atividade das enzimas SOD, GPx e Cat e as alterações da capacidade antioxidante total (ORAC) em função da dose administrada.

Figura 36 - Variação da atividade enzimática hepática de ratos uma hora após a gavagem, em função da dose de infusão de café administrada (n=6).



Para a atividade da SOD, as médias±desvios-padrão dos grupos 6 a 8 foram 13,3±1,3, 13,5±1,8 e 15,3±0,8 U/mg de proteína, respectivamente. Utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov, verificou-se que as distribuições apresentaram adesão à curva normal (p=0,999 grupo 6, p=0,753 grupo 7, p=0,518 grupo 8). As médias dos grupos 6, 7, 8 e 2 foram comparadas à média do grupo 1 (teste “t”, amostras independentes) verificando-se que os grupos com menores volumes de infusão (6 e 7) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (p=0,972 grupo 6, p=0,974 grupo 7) e nos grupos com maiores volumes (8 e 2), estas diferenças foram estatisticamente significativas (p=0,038 grupo 8, p=0,015 grupo 2). Foi aplicado o teste de Pearson para as variáveis dose de infusão de café e atividade da SOD, verificando-se existir uma correlação linear, positiva e estatisticamente significativa igual a 0,879 (p=0,050). Destes resultados, foi possível concluir que a atividade da SOD é dose-dependente e que o aumento de mesma se tornou estatisticamente

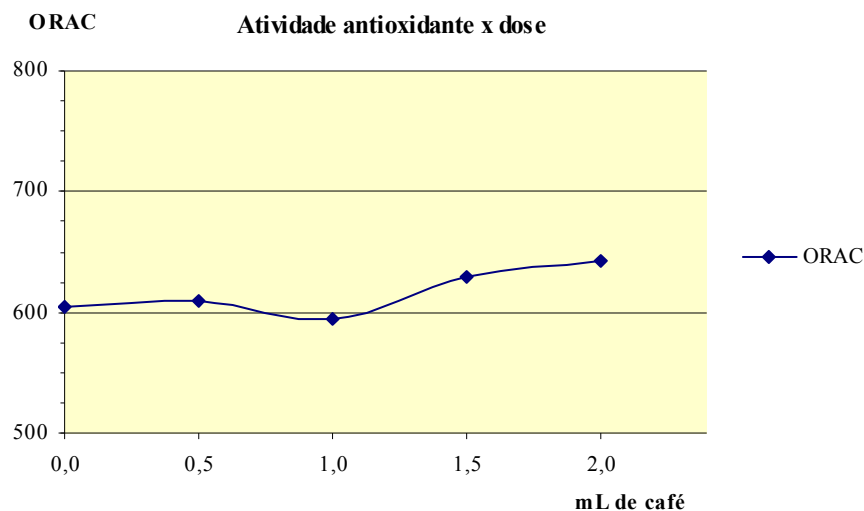
significativo à partir da administração de 1,5 mL de infusão de café.

Para a atividade da Cat, os grupos 6 a 8 apresentaram médias±desvios-padrão iguais a $8,3\pm 1,2$, $9,1\pm 0,8$ e $9,4\pm 1,1$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína, respectivamente. Os valores obtidos foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, verificando-se que as distribuições apresentaram aderência à curva normal ($p=0,968$ grupo 6, $p=0,665$ grupo 7, $p=0,996$ grupo 8). Como verificado através do teste “t” para amostras independentes, apesar dos grupos 7, 8 e 2 exibirem médias superiores à do grupo controle, apenas no último a diferença apresentou significância estatística ($p=0,657$ grupo 6, $p=0,437$ grupo 7, $p=0,285$ grupo 8, $p=0,015$ grupo 2). As variáveis dose de infusão de café e atividade da Cat foram avaliadas pelo teste de Pearson, verificando-se que apresentaram correlação linear, positiva e estatisticamente significativa igual a 0,909 ($p=0,033$). Estas informações indicaram que a atividade desta enzima também tem comportamento dose-dependente em relação ao volume de infusão de café administrado, que a dose para se obter aumento perceptível foi de 1,0 mL mas este só se tornou estatisticamente significativo com a gavagem de 2,0 mL de infusão de café.

Para a atividade da GPx, os grupos 6 a 8 exibiram médias±desvios-padrão iguais a $19,8\pm 1,9$, $20,4\pm 4,2$ e $20,8\pm 2,2$ $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ de proteína respectivamente, sugerindo que quanto maior a dose administrada, maior o aumento da atividade desta enzima. Os resultados obtidos nestes grupos foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, verificando-se que todas as distribuições apresentaram adesão à curva normal ($p=0,993$ grupo 6, $p=0,986$ grupo 7, $p=0,999$ grupo 8). Todos estes grupos (6, 7, 8 e 2) apresentaram médias superiores ao grupo controle mas, através do teste “t” para amostras independentes, verificou-se que a diferença foi estatisticamente significativa apenas para o grupo 2 ($p=0,007$), não sendo significativa para os demais grupos ($p=0,254$ grupo 6, $p=0,313$ grupo 7, $p=0,083$ grupo 8). Complementando a avaliação desta enzima, foi aplicado o teste de Pearson para as variáveis dose de infusão de café e atividade da GPx, verificando-se a existência de uma correlação linear, positiva e estatisticamente significativa igual a 0,965 ($p=0,008$). Através destes resultados e da figura 36, pode ser observado que as doses de infusão de café administradas produziram aumento na atividade da GPx, significativo apenas para 2,0 mL de infusão, o que concordou com a tendência obtida

para as outras enzimas fase II avaliadas (SOD e Cat).

Figura 37 - Variação da atividade antioxidante hepática de ratos uma hora após a gavagem, em função da dose de infusão de café administrada (n=6).



No teste de ORAC foram obtidas as médias \pm desvios-padrão 610 \pm 52, 595 \pm 65 e 630 \pm 31 para os grupos 6 a 8, respectivamente. Todos os resultados foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, apresentando distribuições normais (p=0,963 grupo 6, p=0,924 grupo 7, p=0,956 grupo 8). Conforme o teste “t” (amostras independentes), nenhuma dose apresentou diferença estatisticamente significativa de ORAC em relação ao controle (p=0,833 grupo 6, p=0,800 grupo 7, p=0,311 grupo 8, p=0,403 grupo 2). A capacidade antioxidante total é o somatório da ação de várias espécies defensivas (enzimas fase II, antioxidantes endógenos e exógenos etc.). Os resultados mostraram que o aumento das atividades das enzimas SOD, Cat e GPx somado aos antioxidantes presentes no café foram insuficientes para produzir aumento da capacidade antioxidante medida por ORAC com significância estatística. Aplicando-se o teste de Pearson para as variáveis dose de infusão de café e ORAC, obteve-se correlação linear, positiva mas estatisticamente não significativa igual a 0,788 (p=0,113). Na figura 37 pode ser visto que doses maiores resultaram em maiores variações do ORAC, em progressão praticamente linear, porém sem significância estatística em relação ao grupo controle. Doses maiores que poderiam apresentar este resultado foram evitadas em prol do bem-estar dos animais.

5.2.3 Testes de doses repetidas

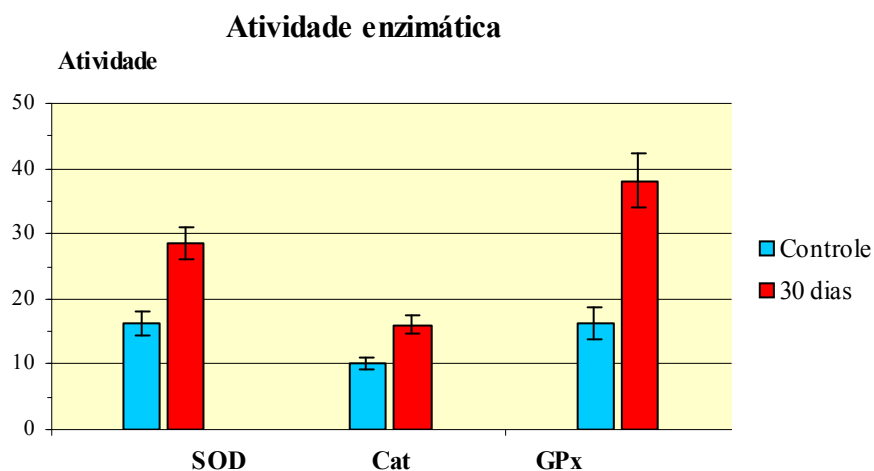
Neste item foram avaliadas as alterações da atividade enzimática e da capacidade antioxidante total no tecido hepático após 30 dias com a administração diária de infusão de café. Usando os mesmos critérios já apresentados, foram separados dois grupos de animais com seis indivíduos cada para compor o grupo controle (9) e o grupo de estudo (10). Os animais foram mantidos no IMT sob as condições já descritas nas séries de dose única, sendo submetidos à equalização por quatro dias recebendo ração AIN-76 e água *ad libitum*.

Após a equalização, os animais passaram a receber 2 mL de água mineral (grupo 9) ou 2 mL de infusão de café (grupo 10) por gavagem e em dose matinal diária. A ração consumida foi pesada diariamente e os animais foram pesados semanalmente para a determinação do quociente de eficiência alimentar (QEA). A cada sete dias, os animais foram submetidos à avaliação visual para a verificação de anormalidades como baixa atividade física, perda de peso ou apetite, aparência da pelagem, aspecto das fezes etc. Após trinta dias, os animais foram submetidos a jejum de 15 horas, anestesia e eutanásia para a retirada do sangue em frasco heparinizado e do fígado após perfusão com soro fisiológico. O sangue e parte do tecido hepático foram reservados para o item 5.2.4 e o restante do fígado foi utilizado na preparação do homogenato, como descrito no item 5.2. Os homogenatos dos dois grupos foram analisados conforme as metodologias já mencionadas, obtendo-se os resultados do quadro 11 que foram utilizados para a elaboração das figuras 38 e 39.

Quadro 11 - Atividades enzimáticas (SOD, Cat e GPx) e capacidade antioxidante total (ORAC) dos grupos de doses repetidas (n=6, média±desvio-padrão).

Grupo	SOD (U/mg proteína)	Cat ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ proteína)	GPx ($\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ proteína)	ORAC
9 (controle)	16,3±1,9	10,1±1,0	16,2±2,4	689±34
10 (café)	28,5±2,5	16,1±1,3	38,1±4,1	862±44

Figura 38 - Atividades enzimáticas médias (SOD, Cat e GPx) com os desvios-padrão dos grupos controle e de estudo de doses repetidas (n=6).



Para a SOD, o grupo 9 (controle, doses repetidas) apresentou a atividade média±desvio-padrão de 16,3±1,9 U/mg proteína, 19,9% superior ao grupo 1 (controle, dose única) mas ainda comparável aos trabalhos citados no item 5.2.1. O grupo 10 (estudo, doses repetidas) apresentou o valor 28,5±2,5 U/mg proteína, com aumento de 74,8% em relação ao grupo 9, compatível aos obtidos por Yeh & Yen (2006) em estudo com ácidos fenólicos puros. As distribuições dos grupos 9 e 10 foram avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, apresentando adesão à curva normal ($p=0,954$ grupo 9, $p=0,995$ grupo 10). As médias destes grupos foram comparadas através do teste “t” (amostras independentes) e a diferença apresentou significância estatística ($p<0,001$). Como doses diárias administradas por trinta dias resultaram em atividade da SOD muito superior à obtida para dose única (grupo 2) e considerando que a diferença entre os grupos 2 e 10 foi estatisticamente significativa quando avaliada pelo teste “t” para amostras independentes ($p<0,001$), há evidências que o aumento da atividade da SOD pela infusão de café tem efeito acumulativo no tecido hepático e que com uma única dose diária esta atividade é mantida aumentada, não retornando ao valor do grupo controle enquanto durar esta administração.

Para a atividade da Cat, o grupo 9 apresentou média±desvio-padrão de 10,1±1,0 $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ de proteína, 17,4% superior ao obtido para o grupo 1, mas ainda comparável aos trabalhos citados no item 5.2.1. O grupo 10 apresentou valor

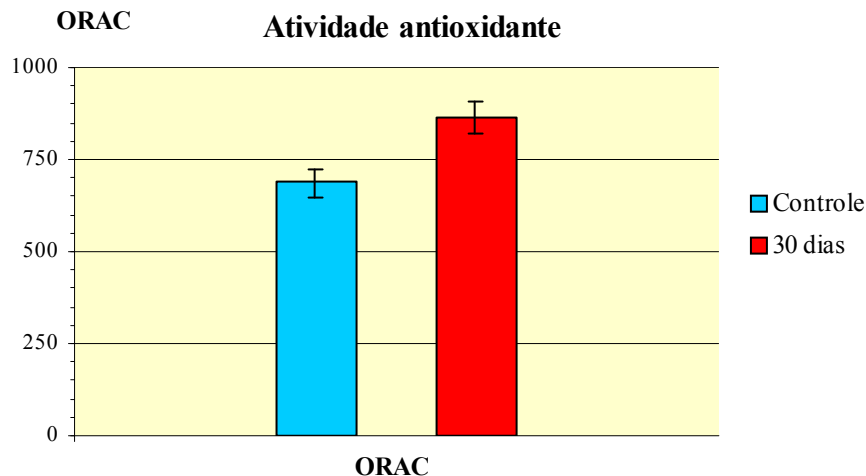
igual a $16,1 \pm 1,3$ $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ de proteína, superior ao grupo 9 em 59,4%, também compatível ao observado por Yeh & Yen (2006) para ácidos fenólicos puros. Os valores dos grupos 9 e 10 foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, verificando-se que apresentaram distribuições com adesão à curva normal ($p=0,725$ grupo 9, $p=0,911$ grupo 10). Estas médias foram submetidas ao teste “t” para amostras independentes, concluindo-se que a diferença entre elas foi estatisticamente significativa ($p<0,001$). Também para a Cat, uma dose diária repetida por trinta dias resultou em aumento da atividade enzimática maior que o obtido com dose única (grupo 2). Como a diferença entre as médias de dose única e doses repetidas foi estatisticamente significativa pelo teste “t” para amostras independentes ($p<0,001$), há evidências estatísticas que este efeito também é acumulativo e que se mantém acima do valor do grupo controle enquanto durar o estímulo.

Para a atividade da GPx, o grupo 9 apresentou média \pm desvio-padrão igual a $16,2 \pm 2,4$ $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ de proteína, 11,5% inferior ao grupo 1, mas ainda comparável aos trabalhos citados no item 5.2.1. O grupo 10 apresentou resultado igual a $38,1 \pm 4,1$ $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ de proteína, 135,2% superior ao grupo 9 e em consonância aos aumentos obtidos por Yeh & Yen (2006) para ácidos fenólicos puros. As distribuições dos grupos 9 e 10 foram avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, verificando-se que ambas apresentaram adesão à curva normal ($p=0,995$ grupo 9, $p=0,398$ grupo 10). As médias obtidas para estes grupos foram comparadas utilizando-se o teste “t” (amostras independentes), verificando-se que a diferença foi estatisticamente significativa ($p<0,001$). Tal qual observado para a SOD e a Cat, a administração por trinta dias de dose diária de infusão de café provocou aumento da atividade da GPx muito maior que o observado para a administração de dose única (grupo 2). Como o teste “t” para amostras independentes indicou que a diferença entre os grupo 2 e 10 foi estatisticamente significativa ($p<0,001$), há evidências que este efeito também é acumulativo e que a atividade desta enzima não retorna ao valor basal do grupo controle enquanto durar o estímulo alimentar.

Para o teste de atividade antioxidante total por ORAC, a média \pm desvio-padrão do grupo 9 foi igual a 689 ± 34 , resultado 14,1% superior ao obtido para a grupo 1. Para o grupo 10, foi obtido 862 ± 44 , superior ao grupo 9 em 25,1% e em consonância com a tendência observada no item 5.2.2 (dose versus resposta). As distribuições dos

grupos 9 e 10 foram avaliadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, verificando-se que apresentaram adesão à curva normal ($p=0,968$ grupo 9, $p=0,994$ grupo 10). As médias destes grupos foram comparadas através do teste “t” para amostras independentes, verificando-se diferença estatisticamente significativa ($p<0,001$). Em função da maior exposição ao café, estes resultados ficaram mais acentuados que os obtidos nas séries de dose única. Como a administração de doses repetidas (grupo 10) apresentou média superior à dose única (grupo 2) com significância estatística (teste “t”, amostras independentes, $p=0,001$), também há evidências que o aumento da capacidade antioxidante medida por ORAC apresenta caráter acumulativo que não retorna ao valor do grupo controle enquanto uma única exposição diária de 2 mL de infusão for mantida. Este resultado concorda com os aumentos já apresentados para as enzimas antioxidantes fase II (SOD, Cat e GPx) pois parcela considerável da capacidade antioxidante pode ser atribuída à estas enzimas.

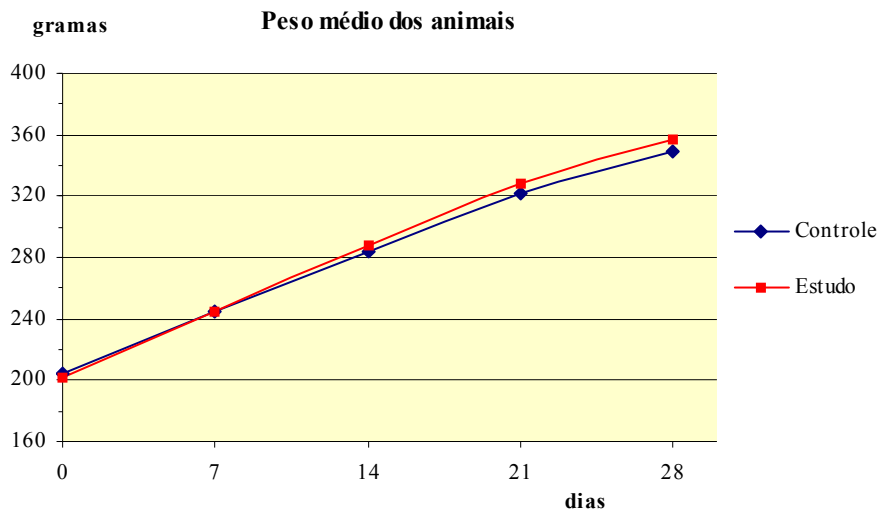
Figura 39 - Atividades antioxidantes totais médias (ORAC) com os desvios-padrão dos grupos controle e de estudo de doses repetidas (n=6).



Uma vez que o item 5.2.1 que avaliou a atividade enzimática e a capacidade antioxidante total em função do tempo após dose única de infusão de café indicou que estes efeitos tendem a desaparecer em horas cessada a administração da bebida (grupos 1 a 5), os valores basais do grupo controle deverão ser restabelecidos em curto espaço de tempo pela homeostasia redox, tão logo a intervenção nutricional seja descontinuada (“washout”).

Após 28 dias, os animais do grupo 9 apresentaram ganho médio de peso de 145,24 gramas (aumento de 71,2% em relação ao peso médio inicial) enquanto que no grupo 10, o ganho médio foi de 154,86 gramas (aumento de 76,7% em relação ao peso médio inicial). Estes dados foram avaliados através do teste de Kolmogorov-Smirnov, verificando-se que todas as distribuições apresentaram adesão à curva normal ($p=0,995$ controle inicial, $p=0,997$ controle final, $p=0,852$ estudo inicial, $p=0,764$ estudo final). As médias iniciais e finais foram comparadas entre si através do teste “t” para amostras independentes, verificando-se que as mesmas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,617$ inicial, $p=0,428$ final). Como todas as demais condições como linhagem dos animais, alojamento, fase de equalização, tipo de alimentação, horário da gavagem e período de jejum foram mantidas iguais para os dois grupos, há evidências estatísticas que a infusão de café não causou alteração no apetite ou na variação de peso dos animais no período avaliado (figura 40).

Figura 40 - Evolução do peso médio dos grupos 9 e 10 durante 28 dias (n=6).



Durante este período, os grupos 9 e 10 apresentaram ingestão média de 653,23 gramas e 657,19 gramas de ração por animal, respectivamente. Considerando-se estes valores e os ganhos de pesos já citados, foram calculados os quocientes de eficiência alimentar, chegando-se a 0,22 para o grupo 9 e 0,24 para o grupo 10, como visto no quadro 12.

Quadro 12 - Dados para o cálculo do quociente de eficiência alimentar (QEA) dos grupos controle e de estudo de doses repetidas (n=6, 28 dias).

Grupo	Fornecido (g)	Sobra (g)	Ingerido (g)	Ganho de peso (g)	QEA
9 (controle)	840,00	186,77	653,23	145,24	0,22
10 (estudo)	840,00	182,81	657,19	154,86	0,24

5.2.4 Análise histológica e biomarcadores hepáticos

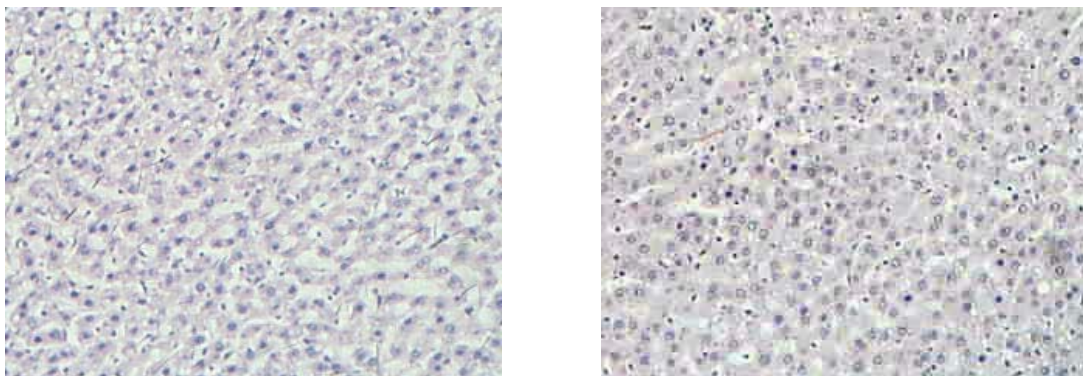
Como apresentado nos itens anteriores, a administração oral de infusão de café aumentou a atividade das enzimas SOD, Cat e GPx e, como consequência direta, melhorou a capacidade antioxidante total medida por ORAC. Todas estas informações indicaram que a administração de infusão de café causou alterações benéficas aos animais aumentando a condição antioxidante hepática, o que permitiu associar esta intervenção nutricional como poderosa auxiliar na contenção do estresse oxidativo e dos distúrbios a ele associados.

Entretanto, os benefícios citados teriam sua importância reduzida caso esta intervenção viesse a provocar danos estruturais ou funcionais em algum tecido do animal. Por este motivo, foi realizada a análise histológica do tecido hepático e a dosagem dos biomarcadores hepáticos AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) nos animais dos grupos de doses repetidas, a fim de se investigar a possível ocorrência destes danos.

Após a eutanásia dos animais e perfusão do fígado com soro fisiológico, foram coletados fragmentos deste tecido, imediatamente fixados com solução 10% de formaldeído e encaminhados ao setor de patologia do Hospital das Clínicas - SP para preparação das lâminas. O tecido já fixado passou pelo processo de inclusão com parafina líquida, sendo blocado e seccionado por microtomia em cortes de três micra de espessura. Os cortes foram colocados sobre lâmina de vidro, a parafina foi retirada em estufa e o tecido corado com HE (hematoxilina + eosina). A análise destas lâminas ao microscópio (aumento x400) revelou que os dois grupos apresentaram

tecidos com aparências normais, isentos de danos histopatológicos, infiltrações inflamatórias ou necroses, como visto na figura 41.

Figura 41 - Comparação dos tecidos hepáticos dos grupos 9 (esquerda) e 10 (direita).

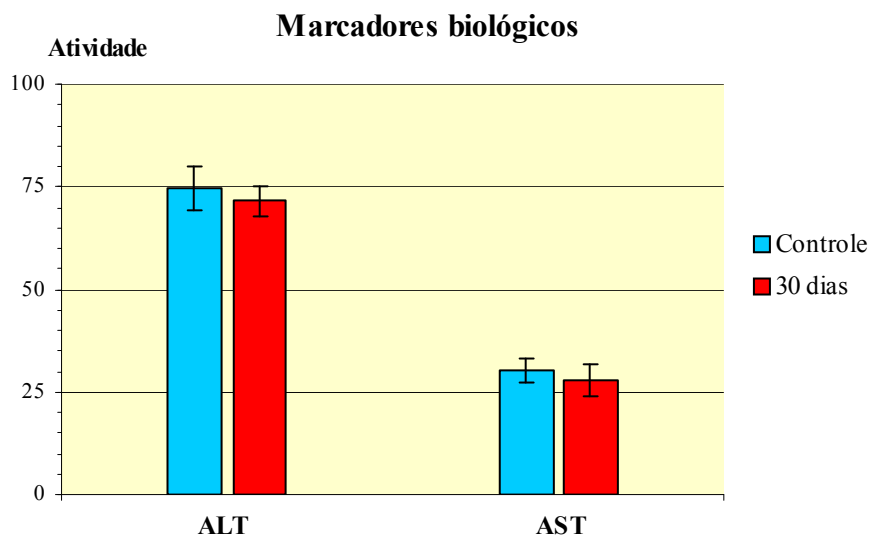


Também com o objetivo de detectar eventuais danos hepáticos, foram dosadas as enzimas AST e ALT no plasma. Conforme Pari et al. (2008) e Shanmugarajan et al. (2008), danos hepáticos são evidenciados pela alteração da atividades destas enzimas. Estes biomarcadores são extremamente sensíveis e de fácil detecção pois os danos causados às células hepáticas alteram o seu metabolismo, causando aumento destas enzimas no citoplasma e liberação no plasma após o dano hepático.

Para a dosagem destas enzimas, durante a eutanásia dos animais o sangue foi coletado em frasco Eppendorf contendo 10 μ L de heparina e imediatamente resfriado em gelo. No menor prazo possível, este material foi centrifugado a 1.500g sob 4°C durante 15 minutos para a obtenção do plasma que apresentou aspecto límpido e ligeiramente amarelado. O plasma foi analisado sem diluição utilizando-se os kits para AST e ALT já citados. Para a ALT obtiveram-se as médias \pm desvios-padrão de 30,2 \pm 2,9 e 27,9 \pm 4,0 U/L para os grupos 9 e 10 respectivamente, comparáveis aos valores 28,0 \pm 2,4 e 34,4 \pm 1,7 U/L encontrados respectivamente por Pari & Prasath (2008) e Kim et al. (2008). Para a AST obtiveram-se 74,5 \pm 5,3 e 71,5 \pm 3,8 U/L para os grupos 9 e 10 respectivamente, comparáveis ao valor de 74,34 \pm 5,64 U/L relatado por Shanmugarajan et al. (2008). Estes resultados, vistos na figura 42, foram avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, resultando em distribuições com aderência à curva normal (p=0,694 AST grupo 9, p=0,999 AST grupo 10, p=0,744

ALT grupo 9, $p=0,921$ ALT grupo 10). Estas médias foram comparadas entre si pelo teste “t” para amostras independentes, revelando não existir diferença estatisticamente significativa entre elas ($p=0,290$ AST, $p=0,284$ ALT).

Figura 42 - Atividades médias da AST e ALT com os desvios-padrão dos grupos controle e de estudo de doses repetidas ($n=6$).



Através do exame histopatológico e dosagem dos biomarcadores AST e ALT, ficou evidenciada a ausência de danos hepáticos aos animais do grupo de estudo após a administração de 2 mL diários de infusão de café por trinta dias. Como dado complementar, a dose diária administrada aos animais equivale a pouco mais de três xícaras de 150 mL de café ingeridas por um humano de 70 kg de massa corporal.

5.2.5 Discussão dos resultados *in vivo*

Completados os testes previstos para a etapa *in vivo*, foi possível verificar que a administração de infusão de café regular alterou várias condições hepáticas dos ratos. Os aspectos mais importantes estão sumarizados a seguir:

a) Tempo de resposta: a administração de dose única de 2,0 mL de infusão de café foi suficiente para aumentar a atividade das enzimas SOD (19,1%), Cat (22,1%) e GPx (25,1%) e a capacidade antioxidante total por ORAC (6,5%), em relação ao

grupo controle. A variação máxima destes parâmetros ocorreu 1 hora após a gavagem e o efeito decresceu após este tempo, sem retornar aos valores do grupo controle até 4 horas após a intervenção. Para todas as enzimas, a variação foi estatisticamente significativa e para o ORAC isto não ocorreu. Na publicação de Yeh & Yen (2006) com ratos, foram relatados aumentos da atividade enzimática de maior magnitude mas os ácidos cafêico, p-cumárico e ferúlico foram administrados individualmente, dissolvidos em tampão e em doses repetidas bastante superiores à esta série de testes. Nos estudos de Prior et al. (2003) e Prior et al. (2007) com dose única de frutas para humanos, o tempo de resposta máxima para o ORAC oscilou entre 1 e 3 horas e os aumentos observados (de 7,0 a 9,5% em relação ao grupo controle) foram da mesma ordem de grandeza que o obtido neste item.

b) Dose x resposta: foram administradas doses únicas de 0,0 mL (controle) até 2,0 mL de infusão de café e, baseado nas conclusões do item anterior, a eutanásia ocorreu uma hora após a gavagem. Para todas as enzimas antioxidantes, houve aumento proporcional da atividade em relação à dose administrada, obtendo-se correlações lineares, positivas e estatisticamente significativas iguais a 0,879 para a SOD ($p=0,050$), 0,909 para a Cat ($p=0,033$) e 0,965 para a GPx ($p=0,008$). Para o teste de ORAC, foi possível observar que a capacidade antioxidante total aumentou com a administração de doses maiores, mas nenhuma delas apresentou significância estatística. Ainda para o ORAC, obteve-se correlação linear, positiva mas não estatisticamente significativa igual a 0,788 ($p=0,113$). Não foram administradas doses maiores que 2,0 mL de infusão de café para evitar o desconforto ou distúrbios gastrintestinais aos animais.

c) Doses repetidas: a administração de dose diária de 2,0 mL de infusão de café por trinta dias consecutivos apresentou ótimos resultados experimentais, com aumentos das atividades enzimáticas em 74,8% para a SOD, 54,9% para a Cat e 135,2% para a GPx, estatisticamente significativos em relação ao grupo controle ($p<0,001$ para todas as enzimas). Também para a capacidade antioxidante total medida por ORAC, observou-se aumento de 25,1%, estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p<0,001$). A administração de uma dose diária de 2,0 mL de infusão de café

foi suficiente para manter estes parâmetros aumentados em relação ao grupo controle.

d) Análise histológica e biomarcadores hepáticos: a comparação do tecido hepático utilizando-se lâminas coradas com HE dos animais que receberam a infusão de café por trinta dias não apresentou qualquer diferença em relação ao grupo controle, quando avaliadas com aumento de x400. A dosagem plasmática dos biomarcadores AST e ALT no grupo de estudo apresentou resultados estatisticamente iguais aos do grupo controle ($p=0,290$ AST, $p=0,284$ ALT), indicando a ausência de alterações hepáticas relacionadas à administração de infusão de café durante o período de trinta dias.

e) Resultados gerais: a administração de infusão de café aumentou a atividade das enzimas antioxidantes fase II (SOD, Cat e GPx) e a capacidade antioxidante total medida por ORAC, constituindo-se um importante alimento funcional com relação à prevenção ou redução do estresse oxidativo e suas conseqüências. Sua ingestão moderada pode auxiliar no abatimento de espécies reativas perigosas, precursoras das doenças crônicas não-transmissíveis, mas seu uso intensivo pode causar vários distúrbios, como fartamente mencionado na literatura consultada no andamento deste trabalho.

Em sintonia com as conclusões deste estudo, a maioria das referências indica efeitos benéficos advindos da ingestão do café ou de seus componentes (cafeína, CGA, compostos polifenólicos etc.). A restrição mais importante refere-se a pessoas hipertensas ou cardiopatas, para as quais a cafeína pode ocasionar sérios efeitos indesejáveis. Outra restrição importante diz respeito a idosos, pois esta substância parece aumentar a calcinúria, agravando a osteoporose e a periodontite. Algumas destas referências estão comentadas a seguir.

Conforme Tao et al. (2008), estudos epidemiológicos têm encontrado taxas reduzidas de câncer do cólon e tumores hepáticos em pessoas que ingerem café, porém o mecanismo protetor ainda não está claro devido à complexa composição deste fruto. Algumas evidências indicam que este efeito quimiopreventivo advém da

ação do diterpenos (cafestol e kaveol), da cafeína ou dos CGA via indução das enzimas detoxificadoras fase II ou pela inibição da expressão e redução da atividade de enzimas ativadoras fase I. Várias teorias sugerem que o mecanismo envolve a liberação da Nrf2 do complexo citoplasmático Keap1-Nrf2, possibilitando sua translocação para o núcleo a fim de codificar enzimas antioxidante fase II e proteínas antioxidantes que exerceriam prevenção da carcinogênese.

Na revisão de Greenberg et al. (2006) são citados estudos epidemiológicos que concluíram que a ingestão de café regular e descafeinado pode reduzir o risco de diabetes. De 20 estudos publicados entre 2002 e 2006, os autores verificaram que 16 apresentaram conclusões com efeitos protetores à diabetes e nos restantes, não foi verificado nenhum efeito deletério à saúde. Possíveis causas para esta proteção seriam termogênese (aumento do consumo calórico), saciedade, lipólise e aumento da metabolização de gorduras, da atividade física e da sensibilidade à insulina, todas relacionadas à perda de peso. A ingestão de café foi considerada segura quando praticada com moderação. O governo do Canadá recomendou a ingestão diária máxima de cerca de 700 mL, o que equivale a 400 mg/dia de cafeína.

No trabalho de Pari & Prasath (2008), foi identificado que o ácido cafêico (principal ácido fenólico do café) protegeu o fígado de ratos de danos oxidativos causados pela ingestão simultânea de níquel. Estas conclusões foram baseadas em exames histopatológicos e dos biomarcadores hepáticos AST e ALT.

LaVecchia (2005) relatou que o consumo de café foi inversamente associado à concentração de GGT (gama-glutamiltransferase), biomarcador relacionado à cirrose hepática causada pelo consumo excessivo de bebidas alcoólicas, sendo esta uma das mais importantes causas de carcinoma hepatocelular. No mesmo trabalho, é citada correlação inversa entre o consumo de café e a ocorrência de câncer em humanos.

Após o consumo de 600 mL de café durante 5 dias, Bichler et al. (2007) verificaram forte redução da migração do DNA atribuída a formação de purinas e pirimidinas oxidadas, redução de danos ao DNA induzido por H₂O₂ e por Trp-P-2 (amina heterocíclica aromática) em humanos. Concluíram que a quimioproteção é relacionado ao abatimento de espécies reativas pelos constituintes do café.

Higgins et al. (2008) verificaram que a administração de café por 5 dias em ratos aumentou a expressão de mRNA hepático e gastrointestinal para várias enzimas

incluindo NQO1, GSTA1, UGT1A6, CYP1A2 e GCLC. Concluíram que o café é capaz de regular genes associados à quimioprevenção do câncer, que o mecanismo estaria ligado à atuação da Nrf2 e que esta bebida poderia estimular a indução de proteção contra acroleína Nrf2-dependente.

Yukawa et al. (2004) verificaram que o consumo de café por humanos reduziu significativamente as concentrações de colesterol, LDL-colesterol e MDA no plasma assim como a susceptibilidade à oxidação da LDL. Desta forma, esta bebida poderia proteger contra a aterosclerose, reduzindo lipídios no plasma e aumentando a proteção contra danos oxidativos.

Olcina et al. (2006) concluíram que a ingestão de 5 mg/kg de peso corporal de cafeína em indivíduos não acostumados a exercícios físicos aumentou o tempo até exaustão, a carga de trabalho e o consumo máximo de oxigênio e reduziu a razão de mudança respiratória. Apesar destas mudanças, o estresse oxidativo não foi alterado conforme medições de mudanças nos hematócritos e concentrações das vitaminas E, A e C além da dosagem de MDA no plasma.

Poucos efeitos deletérios advindos da ingestão de café foram verificados, quase todos associados à cafeína. Tsuang et al. (2006) verificaram a redução da viabilidade de osteoblastos, formação de colônias coradas por ALP e nódulos de mineralização em culturas de células de osteoblastos de ratos, na presença de 0,1 a 100 mM de cafeína. Entretanto, Sakamoto et al. (2001) trabalhando com ratos, administraram o equivalente a 9 e 20 xícaras por dia para humanos, não encontrando evidências desta ação, não sendo observado aumento das citocinas ósseo-absorvedoras como TNF- α ou IL-6 após 140 dias. Bezerra et al. (2008) trabalhando com ratos, verificaram que a ingestão de cafeína não causou perda óssea-alveolar em dentes não ligados mas esta perda foi observada em dentes ligados.

Em muitos trabalhos são administradas doses muito acima do consumo humano, a fim de maximizar os resultados. No presente trabalho, as conclusões já discutidas foram obtidas com a administração de dose equivalente a 450 mL de café para um humano de 70 kg. Conforme a ABIC (2008) o consumo médio de café no Brasil é de 210 mL por dia, mas por ser uma média populacional, este valor inclui pessoas sem o hábito de consumir café, o que aumentaria o volume diário consumido pelos apreciadores desta bebida.

6. CONCLUSÕES

a) O café regular apresentou capacidade antioxidante mais elevada que o descafeinado, de acordo com os parâmetros avaliados neste estudo.

b) Os parâmetros avaliados foram preservados por seis meses mantendo-se o produto na embalagem selada, sob vácuo e à temperatura ambiente. Embalagens abertas mantidas na geladeira (4°C) apresentaram menores perdas que embalagens abertas mantidas à temperatura ambiente (20°C), indicando que a primeira condição é preferível para a manutenção da qualidade antioxidante do café.

c) A infusão de café administrada em dose única de 2,0 mL causou aumento estatisticamente significativo na atividade das enzimas fase SOD, Cat e GPx, nas condições dos ensaios. O efeito foi máximo após 1 hora, tendendo a retornar aos valores do grupo controle após algumas horas. A capacidade antioxidante medida por ORAC também aumentou após esta dose, o aumento foi máximo após 1 hora mas o mesmo não foi estatisticamente significativo.

d) O aumento da atividade das enzimas SOD, Cat e GPx após dose única mostrou ser dose-dependente nas condições dos ensaios, com correlações positivas, lineares e estatisticamente significativas. A capacidade antioxidante por ORAC apresentou aumento discreto e estatisticamente não significativo nas mesmas condições.

e) A administração diária de 2,0 mL de infusão de café por trinta dias apresentou resultados bastante conclusivos, com grandes aumentos das atividades das enzimas SOD, Cat e GPx, todos estatisticamente significativos. O aumento da capacidade antioxidante por ORAC também foi conclusivo e estatisticamente significativo.

f) Além dos resultados positivos quanto ao aumento das defesas antioxidantes, a análise do tecido hepático e a dosagem dos biomarcadores AST e ALT após administração de infusão de café por trinta dias não indicaram qualquer dano à este tecido.

7. REFERÊNCIAS

1. ABIC – Associação Brasileira da Indústria do Café [homepage da internet]. Rio de Janeiro [atualizado em 18 de março de 2008; acesso em 09 de abril de 2008]. Disponível em: http://www.abic.com.br/scafe_dicas.html.
2. Adam A, Crespy V, Levrat-Verny MA, Leenhardt F, Leuilet M, Dermigné C, Rémésy C. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. **J Nutr** 2002; 132: 1962-8.
3. Aebi H. Catalase *in vitro*. In: Packer L, editor. **Methods in enzymology**. Orlando: Academic Press Inc. 1984; vol. 105. p.121-6.
4. Alayash AI, Patel RP, Cashon RE. Redox reactions of hemoglobin and myoglobin: biological and toxicological implications. **Antiox Redox Signal** 2001; 3(2): 313-27.
5. Alessenko AV, Bugrova AE, Dudnik LB. Connection of lipid peroxide oxidation with the sphingomyelin pathway in the development of Alzheimer's disease. **Biochem Soc Trans** 2004, 32: 144-6.
6. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nat Rev** 2004, 3: 205-14.
7. Baynes JW, Dominiczak MH. **Bioquímica médica**. 2^a edição. São Paulo: Editora Manole; 2007.
8. Berquó ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. **Bioestatística**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda; 2005.
9. Bichler J, Cavin C, Simic T, Chakraborty A, Ferk F, Hoelzl C, Schulte-Hermann R, Kundi M, Haidinger G, Angelis K, Knasmüller S. Coffee consumption protects human lymphocytes against oxidative and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate (Trp-P-2) induced DNA-damage: results of an experimental study with human volunteers. **Food Chem Toxicol** 2007; 45: 1428-36.
10. Bonini MG, Augusto O. Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxynitrite. **J Biol Chem** 2001; 276(13): 9749-54.

11. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976; 72: 248-54.
12. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm Wiss Technol** 1995; 28: 25-30.
13. Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and α -tocopherol (vitamin E). **Circ Res** 2000; 87: 349-54.
14. Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **Am J Clin Nutr** 2005; 81: 223S-9S.
15. Committee on Standards for Nutritional Studies. AIN standards for nutritional studies report. **J Nutr** 1977; 107: 1340-8.
16. Contestabile A. Oxidative stress in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic perspectives. **Curr Top Med Chem** 2001; 1(6): 553-68.
17. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochem Soc Trans** 2002; 30: 280-5.
18. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in humans disease. **Clin Chem** 2006; 52: 601-23.
19. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev** 2002; 82: 47-95.
20. Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **Brit J Nutr** 2001; 85(2): S67-74.
21. Farah A, Donangelo CM. Phenolic compounds in coffee. **Braz J Plant Physiol** 2006; 18(1): 26-36.
22. Farah A, de Paulis T, Moreira DP, Trugo LC, Martin PR. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated *Arabica* coffees. **J Agric Food Chem** 2006; 54: 374-81.
23. Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. **J Nut** 138: 2309-15.
24. Gale CR. Dietary antioxidants and dementia. **Int Psychogeriatr** 2001; 13(3): 259-62.
25. Genovese MI, Santos RJ, Hassimotto NMA, Lajolo FM. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Braz J Pharm Sci** 2003; 39: 167-9.

26. Ghafourifar P, Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide syntheses. **Trends Pharmacol Sci** 2005; 26: 190-5.
27. Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. **Biol Chem** 2002; 383: 375-88.
28. Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. **J Clin Invest** 2005; 115: 500-8.
29. Ghiselli A, Natella F, Guidi A, Montanari L, Fantozzi P, Scaccini C. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. **J Nutr Biochem** 2000; 11: 76-80.
30. Gonthier MP, Verny MA, Besson C, Rémésy C, Scalbert A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **J Nutr** 2003; 133: 1853-9.
31. Greenberg JA, Boozer CN, Geliebter A. Coffee, diabetes and weight control. **Am J Clin Nutr** 2006; 84: 682-93.
32. Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. **Am Assoc Pharm Sci J** 2006; 8(1): 101-11.
33. Guerrero G, Suárez M, Moreno G. Chlorogenic acids as a potential criterion in coffee genotype selections. **J Agric Food Chem** 2001; 49: 2454-8.
34. Higgins LG, Cavin C, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Induction of cancer chemopreventive enzymes by coffee is mediated by transcription factor Nrf2. Evidence that coffee-specific diterpenes cafestol and kahveol confer protection against acrolein. **Toxicol Appl Pharmacol** 2008; 226: 328-37.
35. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J Agric Food Chem** 2005; 53: 1841-56.
36. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3^a edição. São Paulo, 1985.
37. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovasc Diabetol** 2005; 4(5): 1-11.
38. Jonassen T, Clarke CF. Isolation and functional expression of human *COQ3*, a gene encoding a methyltransferase required for ubiquinone biosynthesis. **J Biol Chem** 2000; 275(17): 12381-7.

39. Kanazawa A, Sawa T, Akaike T, Maeda H. Dietary lipid peroxidation products and DNA damage in colon carcinogenesis. **Eur J Lipid Sci Technol** 2002; 104: 439-47.
40. Kakarla P, Vadluri G, Kesireddy SR. Response of hepatic antioxidant system to exercise training in aging female rat. **J Exp Zool** 2005; 303A: 203-8.
41. Kern SM, Bennett RN, Mellon FA, Kroon PA, García-Conesa MT. Absorption of hydroxycinnamates in humans after High-bran cereal consumption. **J Agric Food Chem** 2003; 51: 6050-5.
42. Kim HJ, Yu MH, Lee IS. Inhibitory effects of methanol extract of plum (*Prunus salicina* L., cv. 'Soldam') fruits against benzo(α)pyrene-induced toxicity in mice. **Food Chem Toxicol** 2008; 46: 3407-13.
43. Kirsch M, DeGroot H. NAD(P)H, a directly operating antioxidant? **Fed Am Soc Exp Biol J** 2001; 15: 1569-74.
44. Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle and neurodegeneration. **J Clin Invest** 2003; 111(6): 785-93.
45. Kowalski R, Wolski T. Evaluation of phenolic acid content in *Silphium perfoliatum* L. leaves, inflorescences and rhizomes. **Elect J Polish Agric Univ** 2003; 6(1): 9-17.
46. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. **Patologia – bases patológicas das doenças**. 7^a edição. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2005.
47. Kwak MK, Wakabayashi N, Kensler TW. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase II enzyme inducers. **Mutat Res** 2004; 555 (1/2): 133-48.
48. Ky CL, Dussert S, Guyot B, Hamon S, Noiro M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chem** 2001; 75: 223-30.
49. Lafay S, Gil-Izquierdo A, Manach C, Morand C, Besson C, Scalbert A. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. **J Nutr** 2006a; 136: 1192-7.
50. Lafay S, Morand C, Manach C, Besson C, Scalbert A. Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. **Brit J Nutr** 2006b; 96: 39-46.

51. LaVecchia C. Coffee, liver enzymes, cirrhosis and liver cancer. **J Hepatol** 2005; 42: 528-34.
52. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. **Curr Med Chem** 2001; 8: 829-38.
53. Leite F. Sensibilidade, seletividade e limites de detecção e quantificação. **Validação em análise química**. 3^a ed. Campinas: Editora Átomo; 1998.
54. Licht FO. Balanço mundial do café. **Banco de dados do Centro de Inteligência do Café – CIC** [homepage da internet]. Rio de Janeiro [atualizado em fevereiro de 2008; acesso em 02 de maio de 2008]. Disponível em: www.cicbr.org.br/pensa/index2.php.
55. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr** 2004, 79: 727-47.
56. Mateos R, Goya L, Bravo L. Uptake and metabolism of hydroxycinnamic acids (chlorogenic, caffeic and ferulic acids) by HepG2 cells as a model of the human liver. **J Agric Food Chem** 2006; 54: 8724-32.
57. Mattila P, Kumpulainen J. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. **J Agric Food Chem** 2002; 50: 3660-7.
58. Mattila P, Hellström J, Törrönen R. Phenolic acids in berries, fruits and beverages. **J Agric Food Chem** 2006; 54: 7193-9.
59. Maugeri D, Santangelo A, Bonanno MR, Testai M, Abbate S, Lo GF, Mamazza C, Puglisi N, Panebianco P. Oxidative stress and aging: studies on an East-Sicilian, ultraoctagenarian population living in institutes or at home. **Arch Gerontol Geriatr Suppl** 2004; 9: 271-7.
60. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. **Am J Med** 2000; 108(8): 652-9.
61. Morrison RT, Boyd RN. Quinonas. **Química orgânica**. 14^a ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2005.
62. Muik B, Lendl B, Molina-Díaz A, Ayora-Cañada MJ. Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy. **Chem Phys Lipids** 2005; 134: 173-82.
63. Nardini M, Cirillo E, Natella F, Scaccini C. Absorption of phenolic acids in

- human after coffee consumption. **J Agric Food Chem** 2002a; 50: 5735-41.
64. Nardini M, Cirillo E, Natella F, Mencarelli D, Comisso A, Scaccini C. Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and EDTA of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. **Food Chem** 2002b; 79: 119-24.
65. Nardini M, Natella F, Scaccini C, Ghiselli A. Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. **J Nutr Biochem** 2006; 17: 14-22.
66. Natella F, Nardini M, Giannetti C, Dattilo C, Scaccini C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. **J Agric Food Chem** 2002; 50: 6211-6.
67. Olcina GJ, Muñoz D, Timón R, Caballero MJ, Maynar JI, Córdova A, Maynar M. Effect of caffeine on oxidative stress during maximum incremental exercise. **J Sports Sci Med** 2006; 5: 621-8.
68. Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **J Nutr** 2001; 131: 66-71.
69. Olthof MR, Hollman PCH, Buijsman MNCP, van Amelsvoort JMM, Katan MB. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. **J Nutr** 2003; 133: 1806-14.
70. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **J Agric Food Chem** 2001; 49: 4619-26.
71. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J Lab Clin Med** 1967; 70(1): 158-69.
72. Pari L, Prasath A. Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. **Chem Biol Interac** 2008; 173: 77-83.
73. Parras P, Martínez-Tomé M, Jiménez AM, Murcia MA. Antioxidant capacity of coffees of several origins brewed following three different procedures. **Food Chem** 2007; 102: 582-92.
74. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, DelRio D, Salvatore S, Bianchi M. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. **J Nut** 2003; 133: 2812-9.

75. Pennycooke JC, Cox S, Stushnoff C. Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia. **Environ Exp Bot** 2005; 53: 225-32.
76. Pieta PG. Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod** 2000; 63: 1035-42.
77. Pignatelli P, DiSanto S, Buchetti B, Sanguigni V, Brunelli A, Violi F. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. **Fed Am Soc Exp Biol J** 2006; 20: 1082-9.
78. Pincemail J. **How to evaluate your oxidative stress** [homepage da internet]. Liège [atualizado em abril de 2006; acesso em 28 de março de 2008]. Disponível em: http://www.probiox.com/uk/html/body_stressoxydant.htm.
79. Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (ORAC_{FL}) of plasma and other biological and food samples. **J Agric Food Chem** 2003; 51: 3273-9.
80. Prior RL, Gu L, Wu X, Jacob RA, Sotoudeh G, Kader AA, Cook RA. Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter *in vivo* antioxidant status. **J Am Coll Nutr** 2007; 26(2): 170-81.
81. Pryor WA. Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. **Free Radic Biol Med** 2000; 28(1): 141-64.
82. Rechner AR, Spencer JPE, Kuhnle G, Hahn U, Rice-Evans CA. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. **Free Radic Biol Med** 2001; 30(11): 1213-22.
83. Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. **Free Radic Biol Med** 2002; 33: 220-35.
84. Reeder BJ, Wilson MT. The effects of pH on the mechanism of hydrogen peroxide and lipid hydroperoxide consumption by myoglobin: a role for the protonated ferryl species. **Free Radic Biol Med** 2001; 30(11): 1311-8.
85. Reitman S, Frankel S. Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **J Am Clin Path** 1957; 28: 56-63.

86. Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolocci N. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. **Biol Chem** 2004; 385: 1-10.
87. Ross CF, Pecka K, Weller K. Effect of storage conditions on the sensory quality of ground arabica coffee. **J Food Qual** 2006; 29: 596-606.
88. Sakamoto W, Nishihira J, Fujie K, Iizuka T, Handa H, Ozaki M, Yukawa S. Effect of coffee consumption on bone metabolism. **Bone** 2001; 28: 332-6.
89. Sánchez-González A, Jiménez-Escrig F, Saura C. *In vitro* antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chem** 2005; 90: 133-9.
90. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **Am J Clin Nutr** 2005a; 81: 215-7.
91. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. **Crit Rev Food Sci** 2005b; 45: 287-306.
92. Sentanin MA, Amaya DBR. Teores de carotenóides em mamão e pêssego determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciênc Tecnol Aliment** 2007; 27(1): 13-9.
93. Shanmugarajan TS, Krishnakumar E, Somasundaram I, Sivaraman D, Arunsundar M, Balaji R, Sivakumar SM. Salutary effect of ferulic acid against D-galactosamine challenged liver damage. **J Biol Sci** 2008; 8(8): 1271-9.
94. Silvarola MB, Mazzafera P, Fazioli LC. A naturally decaffeinated arabica coffee. **Nature** 2004; 249: 826.
95. Simonetti P, Gardana C, Pietta P. Plasma levels of caffeic acid and antioxidant status after red wine intake. **J Agric Food Chem** 2001; 49: 5964-8.
96. Singh RP, Sharad S, Kapur S. Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: relevance of dietary antioxidants. **J Indian Acad Clinic Med** 2004; 5(3): 218-25.
97. Stahl W, Ale-Agha N, Polidori MC. Non-antioxidant properties of carotenoids. **Biol Chem** 2002; 383: 553-8.
98. Tafazoli S, O'Brien PJ. Peroxidases: a role in the metabolism and side effects of drugs. **Drug Discov Today** 2005; 10(9): 617-25.
99. Tao KS, Wang W, Wang L, Cao DY, Li YQ, Wu SX, Dou KF. The multifaceted

- mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on liver. **Med Hyp** 2008; 71: 730-6.
100. Tsuang YH, Sun JS, Chen LT, Sun SCK, Chen SC. Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. **J Ortop Surg Res** 2006; 1: 7-17.
101. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interac** 2006; 160(1): 1-40.
102. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol** 2007; 39: 44-84.
103. Vicente SJV. Antioxidantes em alimentos: Legislação brasileira. In: Torres EAFS. **Alimentos do milênio**. São Paulo: Editora Signus; 2002.
104. Vina J, Gimeno A, Sastre J, Desco C, Asensi M, Pallardo FV, Cuesta A, Ferrero JA, Terada LS, Repine JE. Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats: role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. **Intern Union Biochem Mol Biol** 2000; 49(6): 539-44.
105. Voet D, Voet JG, Pratt CW. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul; 2008.
106. Waring WS. Uric acid: an important antioxidant in acute ischaemic stroke. **Q J Med** 2002; 95: 691-3.
107. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood of various breed crosses of sheep. **Res Vet Sci** 1983; 34: 253-6.
108. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. **J Nutr** 2004; 134: 489-92.
109. Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. HPLC method for evaluation of the radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Biosci Biotechnol Biochem** 1998; 62(6): 1201-4.
110. Yeh CT, Yen GC. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated

- protein 3 mRNA expression. **J Nutr** 2006; 136: 11-5.
111. Yukawa GS, Mune M, Otani Y, Tone Y, Liang XM, Iwahashi H, Sakamoto W. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. **Biokhimiya** 2004; 69(1): 89-94.
112. Zhao Z, Egashira Y, Sanada H. Digestion and absorption of ferulic acid sugar esters in rat gastrointestinal tract. **J Agric Food Chem** 2003; 51: 5534-9.
113. Zhao Z, Egashira Y, Sanada H. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. **J Nutr** 2004; 134: 3083-8.

Anexo I - Parecer do Comitê de Ética do IMT-USP

Anexo II - Quadros com os dados experimentais

Quadro I - Umidades iniciais e após seis meses dos três lotes de café regular armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.

Lote	Caixa	Umidade (% p/p)			
		inicial	2 meses	4 meses	6 meses
Regular lote 1 (ambiente)	1 e 2	(2,49)	(2,49)
	3	2,57	2,93	3,01	3,22
	4	2,48	3,06	3,28	3,06
	5	2,52	3,04	3,25	3,00
Regular lote 2 (ambiente)	1 e 2	(2,40)	(2,52)
	3	2,44	2,80	2,91	3,09
	4	2,40	2,69	2,90	3,02
	5	2,53	3,00	2,80	3,14
Regular lote 3 (ambiente)	1 e 2	(2,46)	(2,49)
	3	2,39	2,72	3,12	3,18
	4	2,44	2,81	3,04	3,14
	5	2,51	2,70	3,07	2,98
m±dp reg. amb. (caixas 1 e 2)	..	2,48±0,06	2,86±0,15 ...	3,04±0,16 (2,45±0,05)	3,09±0,08 (2,50±0,02)
Regular lote 1 (geladeira)	3	2,57	2,66	2,49	2,46
	4	2,48	2,53	2,41	2,42
	5	2,52	2,54	2,39	2,56
Regular lote 2 (geladeira)	3	2,44	2,71	2,32	2,38
	4	2,40	2,61	2,44	2,34
	5	2,53	2,67	2,14	2,45
Regular lote 3 (geladeira)	3	2,39	2,60	2,65	2,56
	4	2,44	2,67	2,69	2,44
	5	2,51	2,66	2,67	2,41
m±dp reg. gel.	..	2,48±0,06	2,63±0,06	2,47±0,18	2,45±0,07

Os valores de umidade representam a média de triplicatas. As caixas 1 e 2, assinaladas por (), permaneceram lacradas até o momento da análise e suas médias também estão assinaladas por ().

Quadro II - Umidades iniciais e após seis meses dos três lotes de café descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.

Lote	Caixa	Umidade (% p/p)			
		inicial	2 meses	4 meses	6 meses
Descafeinado lote 1 (ambiente)	1 e 2	(2,30)	(2,31)
	3	2,33	2,98	2,80	2,90
	4	2,38	2,87	2,79	3,01
	5	2,36	2,86	2,90	2,81
Descafeinado lote 2 (ambiente)	1 e 2	(2,38)	(2,26)
	3	2,24	2,73	3,06	3,07
	4	2,30	2,77	2,96	3,03
	5	2,35	2,69	3,10	3,00
Descafeinado lote 3 (ambiente)	1 e 2	(2,29)	(2,34)
	3	2,34	2,68	2,99	2,95
	4	2,27	2,64	2,80	2,81
	5	2,41	2,74	2,88	2,98
m±dp desc. amb. (caixas 1 e 2)	..	2,33±0,05	2,77±0,11 ...	2,92±0,12 (2,32±0,05)	2,95±0,09 (2,30±0,04)
Descafeinado lote 1 (geladeira)	3	2,33	2,46	2,21	2,09
	4	2,38	2,52	2,27	2,28
	5	2,36	2,56	2,30	2,28
Descafeinado lote 2 (geladeira)	3	2,24	2,58	2,34	2,32
	4	2,30	2,62	2,38	2,43
	5	2,35	2,51	2,38	2,35
Descafeinado lote 3 (geladeira)	3	2,34	2,44	2,45	2,12
	4	2,27	2,35	2,30	2,36
	5	2,41	2,50	2,33	2,30
m±dp desc. gel.	..	2,33±0,05	2,50±0,08	2,33±0,07	2,28±0,11

Os valores de umidade representam a média de triplicatas. As caixas 1 e 2, assinaladas por (), permaneceram lacradas até o momento da análise e suas médias também estão assinaladas por ().

Quadro III - Atividades de água iniciais e após seis meses dos três lotes de café regular armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.

Lote	Caixa	Atividade de água			
		inicial	2 meses	4 meses	6 meses
Regular lote 1 (ambiente)	1 e 2	(0,40)	(0,42)
	3	0,43	0,40	0,38	0,36
	4	0,43	0,40	0,38	0,38
	5	0,42	0,39	0,39	0,38
Regular lote 2 (ambiente)	1 e 2	(0,42)	(0,44)
	3	0,41	0,42	0,38	0,37
	4	0,43	0,39	0,38	0,37
	5	0,42	0,41	0,36	0,34
Regular lote 3 (ambiente)	1 e 2	(0,40)	(0,44)
	3	0,41	0,38	0,37	0,39
	4	0,41	0,42	0,38	0,38
	5	0,40	0,42	0,40	0,36
m±dp reg. amb. (caixas 1 e 2)	..	0,42±0,01	0,40±0,02 ...	0,38±0,01 (0,41±0,01)	0,37±0,02 (0,43±0,01)
Regular lote 1 (geladeira)	3	0,43	0,34	0,34	0,27
	4	0,43	0,36	0,35	0,32
	5	0,42	0,34	0,33	0,30
Regular lote 2 (geladeira)	3	0,41	0,32	0,35	0,31
	4	0,43	0,31	0,34	0,33
	5	0,42	0,35	0,32	0,33
Regular lote 3 (geladeira)	3	0,41	0,33	0,34	0,32
	4	0,41	0,35	0,34	0,29
	5	0,40	0,35	0,30	0,30
m±dp reg. gel.	..	0,42±0,01	0,34±0,02	0,33±0,02	0,31±0,02

Os valores de atividade de água (A_w) representam a média de triplicatas. As caixas 1 e 2, assinaladas por (), permaneceram lacradas até o momento da análise e suas médias também estão assinaladas por ().

Quadro IV - Atividades de água iniciais e após seis meses dos três lotes de café descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.

Lote	Caixa	Atividade de água			
		inicial	2 meses	4 meses	6 meses
Descafeinado lote 1 (ambiente)	1 e 2	(0,36)	(0,40)
	3	0,39	0,36	0,37	0,34
	4	0,38	0,39	0,38	0,36
	5	0,37	0,36	0,36	0,37
Descafeinado lote 2 (ambiente)	1 e 2	(0,38)	(0,39)
	3	0,36	0,35	0,36	0,35
	4	0,38	0,39	0,36	0,34
	5	0,37	0,37	0,37	0,36
Descafeinado lote 3 (ambiente)	1 e 2	(0,37)	(0,38)
	3	0,38	0,38	0,35	0,32
	4	0,39	0,38	0,35	0,34
	5	0,38	0,37	0,33	0,34
m±dp desc. amb. (caixas 1 e 2)	..	0,38±0,01	0,37±0,01 ...	0,36±0,01 (0,37±0,01)	0,35±0,02 (0,39±0,01)
Descafeinado lote 1 (geladeira)	3	0,39	0,34	0,36	0,28
	4	0,38	0,34	0,29	0,24
	5	0,37	0,33	0,30	0,30
Descafeinado lote 2 (geladeira)	3	0,36	0,30	0,32	0,30
	4	0,38	0,35	0,29	0,29
	5	0,37	0,31	0,35	0,27
Descafeinado lote 3 (geladeira)	3	0,38	0,33	0,32	0,31
	4	0,39	0,32	0,32	0,31
	5	0,38	0,32	0,32	0,28
m±dp desc. gel.	..	0,38±0,01	0,33±0,02	0,32±0,02	0,29±0,02

Os valores de atividade de água (A_w) representam a média de triplicatas. As caixas 1 e 2, assinaladas por (), permaneceram lacradas até o momento da análise e suas médias também estão assinaladas por ().

Quadro V - Compostos fenólicos totais iniciais e após seis meses dos três lotes de café regular armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.

Lote	Caixa	Compostos fenólicos totais (mg/mL ácido gálico equiv.)			
		inicial	2 meses	4 meses	6 meses
Regular lote 1 (ambiente)	1 e 2	(3,57)	(3,48)
	3	3,83	3,29	2,86	2,84
	4	3,74	3,17	2,77	2,93
	5	3,69	3,19	2,91	2,82
Regular lote 2 (ambiente)	1 e 2	(3,38)	(3,43)
	3	3,19	3,50	3,29	2,98
	4	3,34	3,43	3,08	2,77
	5	3,41	3,64	3,15	2,86
Regular lote 3 (ambiente)	1 e 2	(3,60)	(3,55)
	3	3,50	3,10	3,08	2,91
	4	3,41	3,29	2,84	2,72
	5	3,60	3,41	2,96	2,67
m±dp reg. amb. (caixas 1 e 2)	..	3,52±0,21	3,34±0,17 ...	2,99±0,17 (3,52±0,12)	2,83±0,10 (3,49±0,06)
Regular lote 1 (geladeira)	3	3,83	3,45	3,19	3,17
	4	3,74	3,55	3,31	3,38
	5	3,69	3,43	3,29	3,05
Regular lote 2 (geladeira)	3	3,19	3,60	3,05	3,01
	4	3,34	3,57	3,29	3,31
	5	3,41	3,55	3,17	3,10
Regular lote 3 (geladeira)	3	3,50	3,64	3,31	3,05
	4	3,41	3,71	3,53	3,36
	5	3,60	3,64	3,03	3,19
m±dp reg. gel.	..	3,52±0,21	3,57±0,09	3,24±0,15	3,18±0,14

Os valores de compostos fenólicos totais representam a média de triplicatas. As caixas 1 e 2, assinaladas por (), permaneceram lacradas até o momento da análise e suas médias também estão assinaladas por ().

Quadro VI - Compostos fenólicos totais iniciais e após seis meses dos três lotes de café descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.

Lote	Caixa	Compostos fenólicos totais (mg/mL ácido gálico equiv.)			
		inicial	2 meses	4 meses	6 meses
Descafeinado lote 1 (ambiente)	1 e 2	(3,60)	(3,50)
	3	3,55	3,31	3,31	3,03
	4	3,90	3,34	3,24	3,17
	5	3,57	3,71	3,17	3,22
Descafeinado lote 2 (ambiente)	1 e 2	(3,64)	(3,46)
	3	2,96	3,48	2,82	2,86
	4	3,34	3,38	2,98	2,98
	5	3,46	3,55	2,93	3,05
Descafeinado lote 3 (ambiente)	1 e 2	(3,48)	(3,55)
	3	3,79	3,34	3,36	3,08
	4	3,74	3,53	3,01	3,03
	5	3,62	3,31	3,08	2,84
m±dp desc. amb. (caixas 1 e 2)	..	3,55±0,28	3,44±0,14 ...	3,10±0,18 (3,57±0,08)	3,02±0,12 (3,50±0,05)
Descafeinado lote 1 (geladeira)	3	3,55	3,50	3,21	3,22
	4	3,90	3,43	3,29	3,31
	5	3,57	3,36	3,24	3,48
Descafeinado lote 2 (geladeira)	3	2,96	3,48	3,31	3,12
	4	3,34	3,46	3,48	3,08
	5	3,46	3,69	3,43	3,19
Descafeinado lote 3 (geladeira)	3	3,79	3,60	3,31	3,27
	4	3,74	3,64	3,17	2,93
	5	3,62	3,41	3,34	3,31
m±dp desc. gel.	..	3,55±0,28	3,51±0,11	3,30±0,11	3,21±0,16

Os valores de compostos fenólicos totais representam a média de triplicatas. As caixas 1 e 2, assinaladas por (), permaneceram lacradas até o momento da análise e suas médias também estão assinaladas por ().

Quadro VII - Capacidade antioxidante (DPPH) iniciais e após seis meses dos três lotes de café regular armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.

Lote	Caixa	DPPH			
		inicial	2 meses	4 meses	6 meses
Regular lote 1 (ambiente)	1 e 2	(93,04)	(92,36)
	3	93,15	92,27	92,61	92,36
	4	92,91	91,80	91,96	90,56
	5	93,40	92,74	91,52	90,11
Regular lote 2 (ambiente)	1 e 2	(92,61)	(93,48)
	3	93,64	92,97	92,17	92,58
	4	93,89	92,97	91,09	90,34
	5	94,14	93,21	90,87	90,11
Regular lote 3 (ambiente)	1 e 2	(93,04)	(93,03)
	3	92,91	92,74	91,96	90,34
	4	92,18	92,97	91,52	92,58
	5	92,18	92,51	91,09	92,13
m±dp reg. amb. (caixas 1 e 2)	..	93,16±0,69	92,69±0,43 ...	91,64±0,58 (92,90±0,25)	91,23±1,13 (92,96±0,56)
Regular lote 1 (geladeira)	3	93,15	91,65	90,87	90,56
	4	92,91	91,44	88,78	88,54
	5	93,40	91,86	90,43	90,56
Regular lote 2 (geladeira)	3	93,64	89,98	91,52	90,11
	4	93,89	90,40	90,43	90,79
	5	94,14	89,56	90,65	91,91
Regular lote 3 (geladeira)	3	92,91	92,07	91,30	90,79
	4	92,18	91,65	90,22	90,56
	5	92,18	91,44	92,17	91,01
m±dp reg. gel.	..	93,16±0,69	91,12±0,90	90,71±0,95	90,54±0,90

Os valores de DPPH representam a média de triplicatas. As caixas 1 e 2, assinaladas por (), permaneceram lacradas até o momento da análise e suas médias também estão assinaladas por ().

Quadro VIII - Capacidade antioxidante (DPPH) iniciais e após seis meses dos três lotes de café descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.

Lote	Caixa	DPPH			
		inicial	2 meses	4 meses	6 meses
Descafeinado lote 1 (ambiente)	1 e 2	(90,19)	(89,72)
	3	88,99	90,87	88,10	86,68
	4	88,76	90,63	87,68	84,81
	5	89,22	90,87	88,52	87,38
Descafeinado lote 2 (ambiente)	1 e 2	(89,35)	(89,02)
	3	91,97	91,10	89,35	85,75
	4	90,60	90,63	87,47	86,21
	5	90,60	90,40	88,52	86,45
Descafeinado lote 3 (ambiente)	1 e 2	(89,77)	(90,19)
	3	89,99	90,16	88,10	86,92
	4	88,30	90,16	87,47	86,21
	5	88,30	89,93	86,85	85,98
m±dp desc. amb. (caixas 1 e 2)	..	89,64±1,24	90,53±0,39 ...	88,01±0,74 (89,77±0,42)	86,27±0,74 (89,64±0,59)
Descafeinado lote 1 (geladeira)	3	88,99	88,73	87,89	86,92
	4	88,76	88,52	86,64	86,45
	5	89,22	88,73	87,47	87,62
Descafeinado lote 2 (geladeira)	3	91,97	89,14	86,85	87,15
	4	90,60	89,14	86,64	85,28
	5	90,60	88,73	87,27	87,62
Descafeinado lote 3 (geladeira)	3	89,99	89,56	86,01	87,38
	4	88,30	89,56	86,85	86,92
	5	88,30	89,14	87,06	85,98
m±dp desc. gel.	..	89,64±1,24	89,03±0,38	86,96±0,54	86,81±0,79

Os valores de DPPH representam a média de triplicatas. As caixas 1 e 2, assinaladas por (), permaneceram lacradas até o momento da análise e suas médias também estão assinaladas por ().

Quadro IX - Capacidade antioxidante (ORAC) iniciais e após seis meses dos três lotes de café regular armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.

Lote	Caixa	ORAC			
		inicial	2 meses	4 meses	6 meses
Regular lote 1 (ambiente)	1 e 2	(77546)	(81389)
	3	77122	54481	43851	41264
	4	75583	61410	34810	37663
	5	84284	58748	46197	35533
Regular lote 2 (ambiente)	1 e 2	(72264)	(75129)
	3	85581	60686	42803	45914
	4	76814	59156	43493	35866
	5	83818	69960	43227	34469
Regular lote 3 (ambiente)	1 e 2	(81929)	(69935)
	3	82462	65910	44700	39118
	4	77571	62874	39534	44067
	5	62533	65552	40591	39642
m±dp reg. amb. (caixas 1 e 2)	..	78419±7041	62086±4559 ...	42134±3397 (77246±4839)	39282±3913 (75484±5735)
Regular lote 1 (geladeira)	3	77122	77471	67815	63165
	4	75583	73637	86455	78544
	5	84284	75591	65361	61759
Regular lote 2 (geladeira)	3	85581	73620	62616	56153
	4	76814	68888	61393	56469
	5	83818	73512	74652	54406
Regular lote 3 (geladeira)	3	82462	76773	71707	61576
	4	77571	68164	73337	63697
	5	62533	66376	70834	57301
m±dp reg. gel.	..	78419±7041	72670±3956	70463±7584	61452±7246

Os valores de ORAC representam a média de triplicatas. As caixas 1 e 2, assinaladas por (), permaneceram lacradas até o momento da análise e suas médias também estão assinaladas por ().

Quadro X - Capacidade antioxidante (ORAC) iniciais e após seis meses dos três lotes de café descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.

Lote	Caixa	ORAC			
		inicial	2 meses	4 meses	6 meses
Descafeinado lote 1 (ambiente)	1 e 2	(52360)	(60744)
	3	65669	47436	45606	43261
	4	60370	52942	49441	34727
	5	72572	54573	43211	36673
Descafeinado lote 2 (ambiente)	1 e 2	(59788)	(59968)
	3	63198	51287	40857	46047
	4	61110	43568	42204	34028
	5	65361	51661	43760	40408
Descafeinado lote 3 (ambiente)	1 e 2	(62050)	(62524)
	3	59480	58241	41988	42620
	4	70460	45947	42587	39576
	5	66026	51545	35483	40216
m \pm dp desc. amb. (caixas 1 e 2)	..	64916 \pm 4458	50800 \pm 4512 ...	42793 \pm 3732 (58066 \pm 5069)	39728 \pm 4005 (61079 \pm 1310)
Descafeinado lote 1 (geladeira)	3	65669	59322	56403	50655
	4	60370	60595	47769	46920
	5	72572	50688	50572	60262
Descafeinado lote 2 (geladeira)	3	63198	56070	52427	52876
	4	61110	53891	53466	42246
	5	65361	52635	42329	47794
Descafeinado lote 3 (geladeira)	3	59480	57517	49923	52169
	4	70460	46912	51429	52102
	5	66026	54822	47877	54797
m \pm dp desc. gel.	..	64916 \pm 4458	54717 \pm 4295	50244 \pm 4017	51091 \pm 5122

Os valores de ORAC representam a média de triplicatas. As caixas 1 e 2, assinaladas por (), permaneceram lacradas até o momento da análise e suas médias também estão assinaladas por ().

Quadro XI - Padrões de ácido cafêico analisados por HPLC (n = 3).

Massa (μg)	6,8480	3,4240	1,7120	0,8560	0,4280
Injeção 1	65393603	34049525	17169689	8524047	4386622
Injeção 2	65882868	35209402	17174623	8566335	4306495
Injeção 3	64946619	35154715	17284514	8691444	4294116
Área média	65407697	34804547	17209609	8593942	4329078
Desvio padrão	468284	654440	64917	87046	50218
Coef. var. (%)	0,72	1,88	0,38	1,01	1,16

Quadro XII: padrões de ácido p-cumárico analisados por HPLC (n = 3).

Massa (μg)	0,4320	0,2160	0,1080	0,0540	0,0270
Injeção 1	8147963	3846361	1937657	968882	484583
Injeção 2	8238489	3934311	1935274	960674	478798
Injeção 3	7969626	3932241	1950797	973714	481738
Área média	8118693	3904304	1941243	967757	481706
Desvio padrão	136801	50191	8360	6592	2893
Coef. var. (%)	1,69	1,29	0,43	0,68	0,60

Quadro XIII: padrões de ácido ferúlico analisados por HPLC (n = 3).

Massa (μg)	1,4560	0,7280	0,3640	0,1820	0,0910
Injeção 1	17564463	8358897	4181297	2045904	1032580
Injeção 2	17705059	8576486	4177521	2040762	1003927
Injeção 3	17214629	8566462	4204496	2100413	1032778
Área média	17494717	8500615	4187771	2062360	1023095
Desvio padrão	252545	122834	14606	33055	16600
Coef. var. (%)	1,44	1,45	0,35	1,60	1,62

Quadro XIV - Ácido cafêico inicial e após seis meses dos três lotes de café regular e descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.

Lote	Caixa	ácido cafêico ($\mu\text{g/mL}$)		
		inicial	6 meses ambiente	6 meses geladeira
Regular lote 1	1 e 2	...	(729,7)	...
	3	680,3	593,6	641,9
	4	661,0	608,5	703,2
	5	724,9	539,9	655,7
Regular lote 2	1 e 2	...	(654,9)	...
	3	722,2	507,7	624,1
	4	692,3	468,1	594,3
	5	668,3	592,2	679,8
Regular lote 3	1 e 2	...	(712,5)	...
	3	710,8	546,1	670,5
	4	631,0	584,3	598,0
	5	675,4	540,6	610,9
Média \pm dp	..	685,1 \pm 30,8	553,4 \pm 45,9 (699,0 \pm 39,2)	642,0 \pm 38,2
Descafeinado lote 1	1 e 2	...	(612,3)	...
	3	637,8	540,1	534,1
	4	566,0	506,7	571,8
	5	600,2	528,8	512,4
Descafeinado lote 2	1 e 2	...	(570,5)	...
	3	603,5	511,3	557,1
	4	582,3	510,9	528,0
	5	548,9	552,8	601,9
Descafeinado lote 3	1 e 2	...	(542,1)	...
	3	578,0	507,1	610,2
	4	600,5	523,3	573,9
	5	631,1	528,0	525,8
Média \pm dp	..	594,3 \pm 28,9	523,2 \pm 16,0 (575,0 \pm 35,3)	557,2 \pm 34,8

Os valores de ácido cafêico representam a média de triplicatas. As caixas 1 e 2, indicadas por (), permaneceram lacradas até o momento da análise e suas médias também estão indicadas por ().

Quadro XV - Ácido p-cumárico inicial e após seis meses dos três lotes de café regular e descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.

Lote	Caixa	ácido p-cumárico ($\mu\text{g/mL}$)		
		inicial	6 meses ambiente	6 meses geladeira
Regular lote 1	1 e 2	...	(9,1)	...
	3	10,3	7,3	8,8
	4	9,7	10,4	10,2
	5	10,0	9,1	10,4
Regular lote 2	1 e 2	...	(10,4)	...
	3	11,4	8,8	8,5
	4	9,4	7,9	9,8
	5	8,7	9,2	8,3
Regular lote 3	1 e 2	...	(10,9)	...
	3	11,2	9,1	10,2
	4	12,5	9,6	10,4
	5	9,5	8,6	9,0
Média \pm dp	..	10,3 \pm 1,2	8,9 \pm 0,9 (10,1 \pm 0,9)	9,5 \pm 0,9
Descafeinado lote 1	1 e 2	...	(8,1)	...
	3	9,8	7,2	8,5
	4	7,7	8,9	8,9
	5	7,2	6,5	7,3
Descafeinado lote 2	1 e 2	...	(9,0)	...
	3	11,0	6,2	9,3
	4	7,6	7,4	8,0
	5	8,8	7,4	8,7
Descafeinado lote 3	1 e 2	...	(9,5)	...
	3	8,9	8,2	7,9
	4	9,0	9,1	8,2
	5	9,3	6,2	8,5
Média \pm dp	..	8,8 \pm 1,2	7,5 \pm 1,1 (8,9 \pm 0,7)	8,4 \pm 0,6

Os valores de ácido p-cumárico representam a média de triplicatas. As caixas 1 e 2, indicadas por (), permaneceram lacradas até o momento da análise e suas médias também estão indicadas por ().

Quadro XVI - Ácido ferúlico inicial e após seis meses dos três lotes de café regular e descafeinado armazenados à temperatura ambiente e em geladeira.

Lote	Caixa	ácido ferúlico ($\mu\text{g/mL}$)		
		inicial	6 meses ambiente	6 meses geladeira
Regular lote 1	1 e 2	...	(110,3)	...
	3	100,6	59,4	89,7
	4	91,0	79,1	103,6
	5	89,4	80,3	79,2
Regular lote 2	1 e 2	...	(90,4)	...
	3	94,4	90,2	100,2
	4	99,7	82,0	87,7
	5	113,2	85,9	92,5
Regular lote 3	1 e 2	...	(89,5)	...
	3	92,5	70,2	71,0
	4	93,4	80,1	94,9
	5	107,1	91,7	90,1
Média \pm dp	..	97,9 \pm 8,0	79,9 \pm 10,0 (96,7 \pm 11,8)	89,9 \pm 10,0
Descafeinado lote 1	1 e 2	...	(78,0)	...
	3	68,3	54,4	74,7
	4	75,2	60,8	69,0
	5	88,1	50,2	72,4
Descafeinado lote 2	1 e 2	...	(68,1)	...
	3	60,0	41,3	60,3
	4	73,9	51,9	64,7
	5	71,2	60,5	51,6
Descafeinado lote 3	1 e 2	...	(70,5)	...
	3	65,8	75,8	60,1
	4	71,7	60,7	69,2
	5	63,5	57,0	70,7
Média \pm dp	..	70,9 \pm 8,1	57,0 \pm 9,5 (72,2 \pm 5,2)	65,9 \pm 7,4

Os valores de ácido ferúlico representam a média de triplicatas. As caixas 1 e 2, indicadas por (), permaneceram lacradas até o momento da análise e suas médias também estão indicadas por ().

Quadro XVII - Variação da atividade enzimática e capacidade antioxidante hepática de ratos em função do tempo para a eutanásia após a gavagem (dose única de 2,0 mL, n=6).

Grupo	SOD U/mg prot.	Cat μmol/min.mg prot.	GPx μmol/min.mg prot.	ORAC
1 (controle)	13,6±1,6	8,6±1,2	18,3±2,4	604±52
2 (1 hora)	16,2±1,5*	10,5±0,9*	22,9±2,3*	643±97
3 (2 horas)	14,5±0,9	9,5±0,9	19,5±2,0	612±23
4 (3 horas)	13,6±1,3	9,6±0,8	20,7±2,4	573±67
5 (4 horas)	14,2±1,6	9,0±0,8	21,1±2,7	583±54

Os valores representam a média±desvio-padrão de 6 animais. Médias com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (teste t, amostras independentes, $p < 0,005$) estão assinalados com *.

Quadro XVIII - Variação da atividade enzimática e capacidade antioxidante hepática de ratos após o tempo de resposta máxima (1 hora após gavagem), em função da dose administrada (dose única variável, n=6).

Grupo	SOD U/mg prot.	Cat μmol/min.mg prot.	GPx μmol/min.mg prot.	ORAC
1 (controle)	13,6±1,6	8,6±1,2	18,3±2,4	604±52
6 (0,5 mL)	13,3±1,3	8,3±1,2	19,8±1,9	610±52
7 (1,0 mL)	13,5±1,8	9,1±0,8	20,4±4,2	595±65
8 (1,5 mL)	15,8±0,8*	9,4±1,1	20,8±2,2	630±31
2 (2,0 mL)	16,2±1,5*	10,5±0,9*	22,9±2,3*	643±97

Os valores representam a média±desvio-padrão de 6 animais. Médias com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (teste t, amostras independentes, $p < 0,005$) estão assinalados com *.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)