

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

LAYANE MILLENA SOARES CRISÓSTOMO

Efeitos de extratos de café na proteção contra oxidantes em *Saccharomyces cerevisiae*

BRASÍLIA-DF
2014

LAYANE MILLENA SOARES CRISÓSTOMO

Efeitos de extratos de café na proteção contra oxidantes em *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Área de concentração: Bioquímica Nutricional

Orientadora: Profa. Dra. Élide Geralda Campos

Co-orientador: Prof. Dr. Túlio César Ferreira

**BRASÍLIA-DF
2014**

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana

Comunicamos a aprovação da dissertação de mestrado da aluna **Layane Millena Soares Crisóstomo**, intitulada “**Efeitos de extratos de café na proteção contra oxidantes em *Saccharomyces cerevisiae***”, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana do Departamento de Nutrição da Universidade de Brasília.

Dra. Élide Geralda Campos
Orientadora – Departamento de Biologia Celular/ Instituto de Ciências Biológicas (UnB)

Dra. Alessandra da Silva Dantas
Membro - Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Dra. Nathália Marcoline Pelucio Pizato Valério
Membro – Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília (UnB)

Dra. Viviane Castelo Branco Reis
Suplente – Departamento de Biologia Celular (UnB)

Este trabalho é dedicado aos meus pais,
Edson Inácio Crisóstomo e Ivete Soares
Crisóstomo.

AGRADECIMENTOS

Inicio os meus agradecimentos a Deus pelo dom da vida, pela força que me conduziu até aqui.

À minha família. À minha avó Dalila, pela grande sabedoria, pelas conversas, pelo exemplo de vida. Aos meus pais, Edson e Ivete, pelo amor incondicional, pela preocupação, por apoiarem as minhas decisões, por me incentivarem nos estudos, no crescimento pessoal e profissional e pelo suporte diário. À minha irmã Luana, que tem seguido os passos da pesquisa, peço desculpas pela ausência.

Ao Rômulo, pela paciência na minha ausência, pela compreensão, por me acompanhar no laboratório nos fins de semanas, mesmo no cansaço e mesmo sem entender, pelo companheirismo. Nos momentos mais difíceis me confortou e me fez acreditar que tudo ficaria bem. Pelos momentos maravilhosos, pelas risadas, conforto, por tudo.

À Professora Dra. Élide, pela paciência, pelos ensinamentos, pela dedicação no ensino e por ter acreditado e me proporcionado o conhecimento da ciência.

Ao Professor Dr. Túlio, sempre disposto a esclarecer todas as dúvidas, pelos ensinamentos de bancada, pelo apoio e preocupação com o nosso grupo de pesquisa.

À Dra. Alessandra Dantas, que me ajudou muito (não sei como agradecer) no final da pesquisa, nos últimos momentos. O mundo precisa de pesquisadores como ela, que com humildade ensina e recebe as pessoas com o coração aberto.

Aos amigos do nosso grupo de pesquisa sobre Estresse Oxidativo, pela convivência diária, pelas risadas, pelos estudos, enfim, por tudo (Viviane, Diana, Mariângela, Carlos, Walyson, Raphael, Nestor, Artur, Samantha e Lucas).

Aos amigos da Biologia Molecular, a Patrícia, a Tayná, pelas horas de descontração. A todos os outros colegas de todos os outros laboratórios.

Ao grupo de Radicais Livres do Professor Dr. Marcelo Hermes, por ter concedido a utilização de seu laboratório para realização de alguns experimentos, especialmente a Luana e Daniel.

Às professoras Dra. Alessandra da Silva Dantas, Dra. Nathália M. P. Pizato Valério e Dra. Viviane Castelo Branco Reis por aceitarem participar da minha banca de defesa.

Aos funcionários da Biologia Molecular de fundamental importância, Dona Ivonildes, Dona Fátima e Thompson.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da UnB (DPP-UnB) pela concessão da bolsa de estudos e fomento à pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para que esse projeto fosse concluído, meus agradecimentos.

“Deus me conceda falar com propriedade e pensar de forma correspondente aos dons que me foram dados, porque Ele é o guia da sabedoria e o orientador dos sábios. Em seu poder estamos nós, as nossas palavras, a nossa inteligência e as nossas habilidades. Ele me concedeu o conhecimento exato de tudo o que existe, para eu compreender a estrutura do mundo e a propriedade dos elementos...”

(Sabedoria 7, 15-17)

RESUMO

O aumento da população idosa traz preocupações importantes para as políticas públicas de saúde, devido à prevalência de doenças crônicas não transmissíveis e ao aumento dos gastos com saúde pública. Grande parte dessas doenças tem sido associada com o estresse oxidativo, que é causado pelo desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes. Os antioxidantes estão presentes na dieta e, portanto, surgem como alternativa para prevenir ou reduzir os danos oxidativos. Nesse contexto, o café, uma bebida consumida mundialmente, contribui para a ingestão de antioxidantes, devido a compostos que ocorrem naturalmente nos seus grãos. Vários estudos publicados investigaram *in vitro* as propriedades antioxidantes do café, no entanto, não tem sido descrito na literatura ensaios que avaliam o efeito da pré-exposição de extratos de café em *Saccharomyces cerevisiae*. O uso de células vivas representa um modelo adequado para avaliar o efeito antioxidante na capacidade de sobrevivência da célula em estado de estresse oxidativo. Considerando os danos que as espécies reativas de oxigênio (EROs) podem causar nas biomoléculas e que antioxidantes naturais podem diminuir ou prevenir estes danos, este trabalho teve como objetivo principal avaliar a capacidade do café orgânico, em comparação com o café convencional, em proteger as células de *Saccharomyces cerevisiae* contra o dano oxidativo na exposição ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Para isso foram testados extratos aquosos e etanólicos de três diferentes cafés (café acaiaí cerrado torrado, café acaiaí cerrado verde e café convencional torrado) no ensaio de viabilidade celular pelo teste de “spot” usando a linhagem S288c de levedura. Os extratos dos três cafés testados conferiram uma proteção antioxidante em todas as concentrações testadas (0,18 mg/mL a 10 mg/mL). Especificamente, as menores concentrações tornaram as células menos susceptíveis à ação do H_2O_2 5 mM. Aparentemente, o extrato aquoso apresentou maior proteção em relação ao extrato etanólico. Não houve diferença significativa na proteção das células pelos diferentes extratos de café torrado. Portanto, o extrato do café acaiaí cerrado torrado foi escolhido para avaliar a capacidade do café (na presença de H_2O_2 1mM) em reestabelecer o crescimento de *S. cerevisiae* em placa de 96 poços. Foram testadas oito concentrações (0,0009 mg/mL a 0,2 mg/mL) de extrato de café em quatro linhagens celulares (S288c, EG 103, EG 110 e EG 118). Nessas condições, nenhuma concentração de café foi capaz de reverter o dano causado pelo H_2O_2 . Contudo, os resultados de teste de “spot” indicam que o café apresenta um significativo potencial antioxidante em células de leveduras pré-expostas a seus extratos, podendo servir como um importante alimento funcional com ação protetora. Como perspectivas, são necessários outros testes para avaliar diferentes solventes de extração e determinar quais as concentrações ideais para a prevenção do dano celular.

Palavras-chave: antioxidantes, café, peróxido de hidrogênio, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

The increasing elderly population brings important concerns to the public health policies, due to the prevalence of non-transmissible chronic diseases and increased expenditure with public health. Many of these diseases have been associated with oxidative stress, which is caused by an imbalance between oxidants and antioxidants. Antioxidants are present in the diet, and thus appear as an alternative to prevent or reduce oxidative damage. In this context, coffee, a beverage consumed worldwide, contributes to the intake of antioxidants, due to naturally occurring compounds in its grains. Several published studies have investigated the in vitro antioxidant properties of coffee, however, assays that evaluate the effect of pre-exposure of coffee extracts in *Saccharomyces cerevisiae* have not been described. The use of living cells is an adequate model to evaluate the antioxidant effect on the survival ability of the cell in a state of oxidative stress. Considering the damage that reactive oxygen species (ROS) can cause to biomolecules and that natural antioxidants can reduce or prevent this damage, this study aimed to evaluate the ability of organic coffee, compared to conventional coffee, in protecting *S. cerevisiae* cells against oxidative damage on exposure to hydrogen peroxide (H_2O_2). Aqueous and ethanol extracts of three different coffees (roasted and green organic coffee and roasted non-organic coffee) were tested in the cell viability spot test using the S288C yeast strain. Extracts of the three coffees conferred an antioxidant protection at all concentrations tested (0.18 mg/mL to 10 mg/mL). Specifically, the lower coffee extract concentrations made the cells less susceptible to the action of 5 mM H_2O_2 . Apparently, the aqueous extract showed higher protection compared to the ethanolic extract. There was no significant difference in the protection by the two roasted coffee extracts. Therefore, the roasted organic coffee extract was chosen to assess the ability of coffee (in the presence of 1 mM H_2O_2) to restore the growth of *S. cerevisiae* on a 96 well plate assay. Eight coffee extract concentrations (0.0009 mg / ml to 0.2 mg / ml) were tested in four yeast cell strains (S288c, EG 103, EG 110 and EG 118). Under these conditions, no concentration of coffee was able to reverse the damage caused by H_2O_2 and restore growth. However, the results of the spot test indicate that coffee has a significant antioxidant activity in yeast cells pre-exposed to its components, and may serve as an important functional food with protective action. As perspectives, other tests for evaluating different extraction solvents and determine the optimal concentrations for the prevention of cellular damage are needed.

Keywords: antioxidants, coffee, hydrogen peroxide, *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sequência da redução do O ₂ a H ₂ O.....	19
Figura 2. Ilustração do metabolismo mitocondrial de EROs. Formação do ânion radical superóxido (O ₂ ^{•-}) pela redução monoelétrica do O ₂	20
Figura 3. Orbitais moleculares de algumas EROs	21
Figura 4. Evolução do consumo interno de café.....	27
Figura 5. Classificação dos polifenóis.....	30
Figura 6. Café Serrazul.....	33
Figura 7. Efeitos da pré-exposição (durante a noite) aos extratos aquosos dos cafés orgânicos Acaiá torrado e Acaiá verde e do café convencional no crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c.....	54
Figura 8. Efeitos da pré-exposição (durante a noite) aos extratos etanólicos dos cafés orgânicos Acaiá torrado e Acaiá verde e do café Convencional no crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c.....	57
Figura 9. Efeitos da pré-exposição (período de seis horas) aos extratos aquosos do café orgânico Acaiá torrado no crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c.....	60
Figura 10. Determinação da concentração de H ₂ O ₂ que provoca parada de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> (a) S288c, (b) EG 103, (c) EG 110 e (d) EG 118.....	61
Figura 11. Crescimento de leveduras <i>S. cerevisiae</i> expostas a H ₂ O ₂ 1 mM.....	63
Figura 12. Determinação da concentração de extrato aquoso do café Acaiá torrado que exerce efeito de retorno ao crescimento quando incubado juntamente com H ₂ O ₂ 1 mM nas culturas de <i>S. cerevisiae</i> (a) S288c, (b) EG 103, (c) EG 110 e (d) EG 118.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do café torrado (arábica).....	28
Tabela 2. Teor de fenóis totais em vegetais e bebidas.....	31

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

•OH:	Radical hidroxil
µg:	Microgramas
µL:	Microlitros
ABTS:	Azino-etilbenzotiazilina-6-sulfonato
ATP:	Adenosina-5-trifosfato
CAT:	Catalase
CGA:	Ácidos clorogênicos
CTE:	Cadeia transportadora de elétrons
CuZn-SOD:	Superóxido dismutase que contém cobre e zinco
DNA:	Ácido desoxiribonucleotídeo
DPPH:	Difenilpicril-hidrazil
EROs:	Espécies reativas de oxigênio
GPx:	Glutaciona peroxidase
GSH:	Glutaciona (forma reduzida)
GSR:	Glutaciona redutase
GSSG:	Glutaciona oxidada
GST:	Glutaciona S-transferase
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrogênio
KPi:	Tampão fosfato de potássio
L•:	Radical lipídico
LOO•:	Radical lipoperoxil
LOOH:	Hidroperóxido lipídico
MDA:	Malonaldeído
mg:	Miligrama
mL:	Mililitro
Mn-SOD:	Superóxido dismutase que contém manganês
NMP:	N-metilpiridínio
O ₂ • ⁻ :	Radical superóxido
O ₂ :	Oxigênio molecular
OD:	Densidade ótica (do inglês, <i>optical density</i>)
OH ⁻ :	Ânion hidroxila
SOD:	Superóxido dismutase

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS	xii
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Radicais livres	18
2.2 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	18
2.3 Estresse oxidativo.....	22
2.3.1 Oxidação do DNA, proteínas, lipídios	23
2.4 Defesas antioxidantes	23
2.4.1 Defesa antioxidante enzimática.....	24
2.4.2 Defesa antioxidante não-enzimática.....	26
2.5 O café.....	26
2.5.1 História e importância econômica do café	26
2.5.2 Compostos fenólicos	29
2.5.3 Café orgânico.....	32
2.5.4 Café e qualidade de vida.....	34
2.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo.....	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Amostras de café	38
4.2 Linhagens de leveduras	38
4.3 Meios de cultura	38
4.4 Tampões	39
4.5 Reagentes e Soluções.....	39
4.6 Preparos dos extratos etanólicos de café	40
4.7 Preparo dos extratos aquosos de café	40
4.8 Ensaio <i>in vivo</i> (placas de 96 poços) utilizando leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para avaliação da atividade antioxidante das amostras de café orgânico torrado	41

4.8.1 Determinação da concentração de H ₂ O ₂ que causa parada de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i>	41
4.8.2 Exposição imediata da levedura <i>S. cerevisiae</i> ao H ₂ O ₂ e tratamento com o café ...	42
4.9 Avaliação de taxas de sobrevivência de leveduras após estresse oxidativo (Spot test) .	42
4.10 Análise estatística	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
CAPÍTULO I.....	45
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

Radicais livres são espécies que contêm um ou mais elétrons desemparelhados as quais apresentam alta reatividade. Em sistemas biológicos os radicais livres de oxigênio ou nitrogênio são os mais relevantes (Burton and Jauniaux, 2011). As espécies reativas de oxigênio (EROs), formadas por radicais livres e espécies não-radicalares, são produzidas no metabolismo celular aeróbico normal ou por células do sistema imune durante a resposta a patógenos (Migdal and Serres, 2011; Kalyanaraman, 2013). Para combater as EROs, as células possuem defesas antioxidantes. Antioxidantes são substâncias que, em baixas concentrações, impedem, atrasam, removem ou protegem contra a oxidação de uma molécula alvo (Pamplona and Costantini, 2011).

A deficiência de antioxidantes presentes na dieta (como, por exemplo, as vitaminas E, C, D, flavonóides e carotenóides) causa acúmulo de pró-oxidantes, o que pode resultar no estresse oxidativo, uma condição de desequilíbrio entre os níveis de oxidantes e antioxidantes. Além da falta de nutrientes, a produção de EROs pode aumentar nas doenças inflamatórias crônicas (Kalyanaraman, 2013). Como resultado do acúmulo de EROs pode ocorrer extenso dano oxidativo nas biomoléculas (DNA, proteínas e lipídios) com perda de função e integridade das membranas, inibição de enzimas e mutações no DNA. As consequências desses danos podem ser disfunções celulares e danos nos tecidos, o que pode contribuir para a carcinogênese (Pamplona and Costantini, 2011; Veskokis *et al.*, 2012; Kalyanaraman, 2013; Saeidnia and Abdollahi, 2013).

Com o aumento da população idosa há uma preocupação por parte dos governantes que elaboram as políticas públicas de saúde, no que diz respeito à prevalência de doenças relacionadas à idade e aos custos de saúde que essa população pode ocasionar (Martorell *et al.*, 2011). Estudos epidemiológicos observacionais têm verificado que o consumo de alimentos ricos em componentes bioativos (como frutas e legumes) está relacionado à prevenção do desenvolvimento de diversas doenças (Butnariu and Caunii, 2013; Forbes-Hernandez *et al.*, 2014). A busca pela alimentação equilibrada motiva as pesquisas que visam buscar alimentos que desempenham funções benéficas para o organismo. Uma das estratégias é a melhoria da capacidade antioxidante por meio da ingestão de antioxidantes para prevenir ou reduzir os danos oxidativos (Butnariu and Caunii, 2013). Dessa forma, alimentos com propriedades antioxidantes podem surgir como intervenção nutricional para promoção da qualidade de vida da população (Martorell *et al.*, 2011).

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo, e contribui para a ingestão de antioxidantes pelas populações de muitos países (Ranheim and Halvorsen, 2005; Cruz *et al.*, 2012). Ele possui compostos que ocorrem naturalmente no grão verde (ácido clorogênicos, trigonelina ou cafeína) e/ou moléculas formadas durante a torrefação (melanoidinas – produtos da reação de Maillard) (Verzelloni *et al.*, 2011). Devido ao alto consumo do café, estudos relacionados à atividade biológica de seus componentes têm sido desenvolvidos indicando uma boa capacidade antioxidante de compostos do café, como os ácidos clorogênicos, melanoidinas e a cafeína (Lima *et al.*, 2010; Ludwig *et al.*, 2014).

Considerando os danos que as EROs podem causar nas biomoléculas e que antioxidantes naturais podem diminuir ou prevenir estes danos, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade do café orgânico, comparando o verde e o torrado e, ainda, o convencional torrado, em proteger as células de *Saccharomyces cerevisiae* contra o dano oxidativo na exposição ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Testamos a hipótese de que o café orgânico teria uma maior capacidade antioxidante quando comparado com um café convencional. Isto seria devido ao fato de que o café orgânico talvez tenha que induzir as defesas antioxidantes em um maior grau para combater agressores externos.

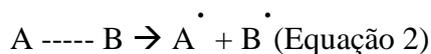
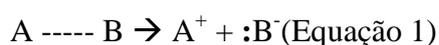
O presente trabalho possui os resultados e discussão em formato de artigo (Capítulo 1). O artigo é apresentado com introdução, materiais e métodos, resultados e discussão e referências bibliográficas (referentes ao artigo). A numeração das figuras do artigo segue a ordem do trabalho como um todo, com o objetivo de orientar o leitor quanto à lista de figuras.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radicais livres

Radical livre refere-se a qualquer espécie, seja átomo ou molécula, capaz de ter uma existência independente, contendo um ou mais elétrons desemparelhados. A presença de elétrons desemparelhados torna os radicais livres altamente reativos. Essa reatividade ocorre devido à reação com outras moléculas, com o objetivo de adquirir estabilidade (Ferreira and Matsubara, 1997; Halliwell and Whiteman, 2004; Halliwell, 2006).

Os elétrons, nos átomos e moléculas, estão associados em pares. Cada um dos elétrons se movimenta em volta do núcleo, o denominado orbital atômico (Halliwell, 2006). Portanto, as ligações químicas podem ser rompidas de duas formas: os dois elétrons podem ficar presos a um dos fragmentos, processo denominado de heterólise (**Equação 1**), onde os dois fragmentos têm cargas diferentes e opostas e são chamados íons; ou, na quebra da ligação os dois elétrons são divididos de forma simétrica, processo denominado de homólise, cujos fragmentos são radicais, conforme mostrado na **Equação 2** (Pryor, 1970; Ferreira and Matsubara, 1997). As reações de radicais são divididas em três fases: iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação ocorre a formação dos radicais, na propagação o número destes radicais não é modificado e na fase de terminação ocorre a destruição dos radicais, fechando a cadeia (Pryor, 1970).



2.2 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são metabólitos de oxigênio altamente reativos e são produtos do metabolismo celular normal. Essas espécies são reconhecidas por desempenhar um papel paradoxal, porque podem ter efeito benéfico ou prejudicial, nos sistemas vivos (Valko *et al.*, 2006; Migdal and Serres, 2011). Os níveis moderados de EROs são úteis na defesa imunológica contra patógenos e na sinalização celular, por exemplo (Bae *et al.*, 2011; Kalyanaraman, 2013). Em concentrações baixas, o peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) e o radical superóxido (O₂^{·-}) estimulam a proliferação e a sobrevivência celular (Valko *et al.*, 2006; Bae *et al.*, 2011). Além disso, durante a invasão de patógenos, as células fagocitárias defendem o organismo por meio da geração de oxidantes antimicrobianos, como o radical superóxido. Um dos efeitos prejudiciais ocorre, por exemplo, na formação de EROs no restabelecimento do oxigênio ao tecido que sofre isquemia (privação de oxigênio), provocando danos aos tecidos durante a reoxigenação (Kalyanaraman, 2013).

O termo EROs refere-se tanto aos radicais de oxigênio quanto a espécies oxidantes não radicalares (Halliwell and Whiteman, 2004; Kennedy *et al.*, 2012). As principais EROs radicalares incluem o radical superóxido (O₂^{·-}) e o radical hidroxil (·OH) e as espécies não radicalares, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), por exemplo (Kennedy *et al.*, 2012).

Na respiração celular as células utilizam o oxigênio para a geração de energia na mitocôndria. Durante este processo de produção de adenosina-5-trifosfato (ATP) o oxigênio pode ser parcialmente reduzido (**Figura 1**) e produzir radicais livres. Isto pode ocorrer naturalmente ou em maior grau devido a uma disfunção mitocondrial, o que leva ao comprometimento do transporte de elétrons (**Figura 2**) (Pham-Huy *et al.*, 2008; Alzoghaibi, 2013). A mitocôndria é uma importante fonte de EROs, os quais se formam devido ao escape de uma pequena quantidade de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons (CTE), principalmente a nível dos complexos I e III, levando à geração do radical superóxido (**Figura 2**) (Kowaltowski *et al.*, 2009). Um aumento na produção de EROS na mitocôndria pode ocorrer em condições patofisiológicas (Kalyanaraman, 2013).

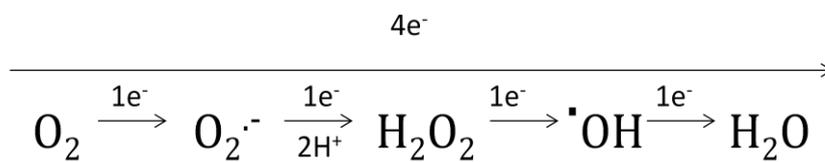


Figura 1. Sequência da redução do O₂ a H₂O. Adaptado de Kalyanaraman, 2013.

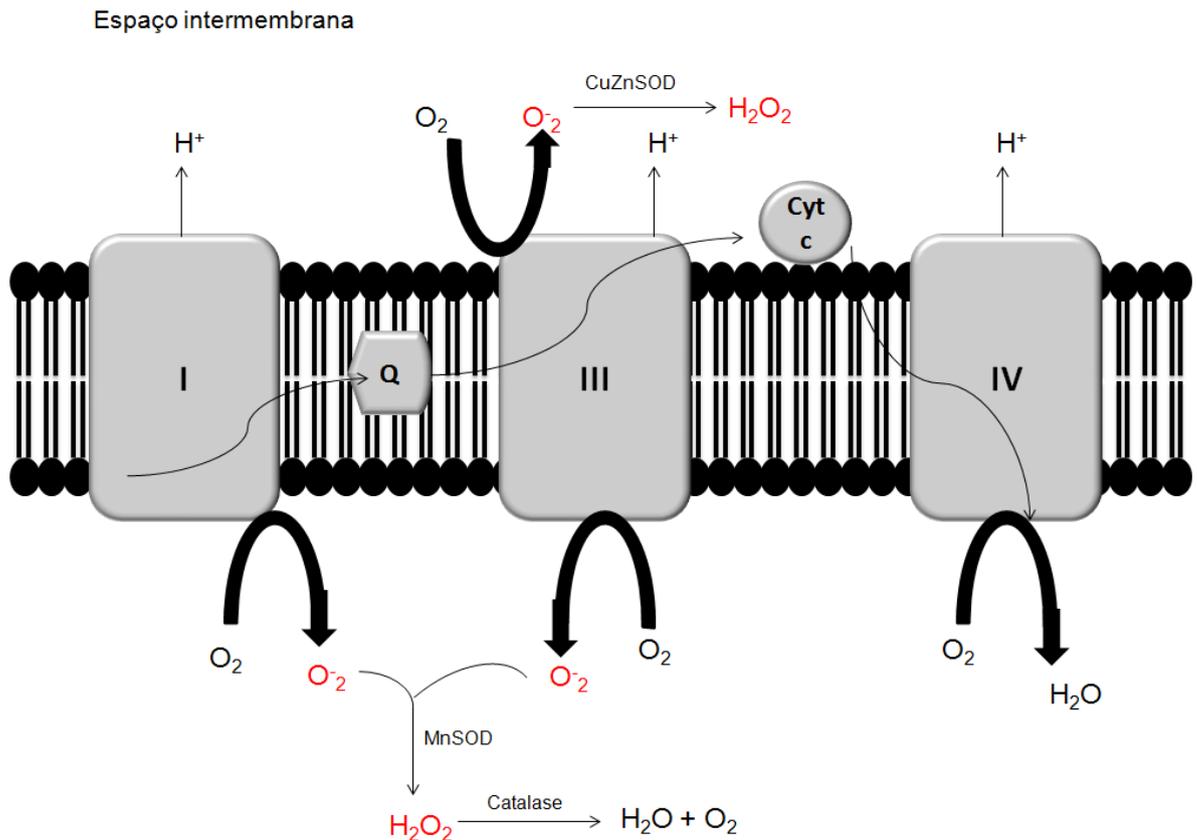


Figura 2. Ilustração do metabolismo mitocondrial de EROs. Formação do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) pela redução monoelétrica do O_2 . Adaptado de Kowaltowski *et al.*, 2009.

O gás oxigênio (O_2), em seu estado fundamental, possui dois elétrons desemparelhados com spins paralelos, o que o impede de receber um par de elétrons de outra molécula, podendo receber somente um elétron (Hermes-Lima, 2005; Halliwell, 2006). Na **Figura 3** há a ilustração dos orbitais moleculares das formas do oxigênio (O_2), do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Ao ocorrer a redução monoelétrica do oxigênio molecular (O_2) forma-se o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Grande parte deste radical é produzido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Em condições normais, aproximadamente 2% do oxigênio consumido na mitocôndria é convertido em $O_2^{\cdot-}$ (Ferreira and Matsubara, 1997; Raha and Robinson, 2001; Kowaltowski *et al.*, 2009; Burton and Jauniaux, 2011; Migdal and Serres, 2011). Estes radicais são dismutados por meio de enzimas superóxido dismutases (SOD), gerando o H_2O_2 , que é uma espécie não radicalar e por isso é menos reativo que o $O_2^{\cdot-}$ (Kohen and Nyska, 2002; Kowaltowski *et al.*, 2009; Kanta, 2011). A redução do H_2O_2 por íons Cu^{+1} ou Fe^{2+} leva à formação do radical hidroxil ($\cdot OH$) e do ânion hidroxila (OH^-) (Hermes-Lima, 2005).

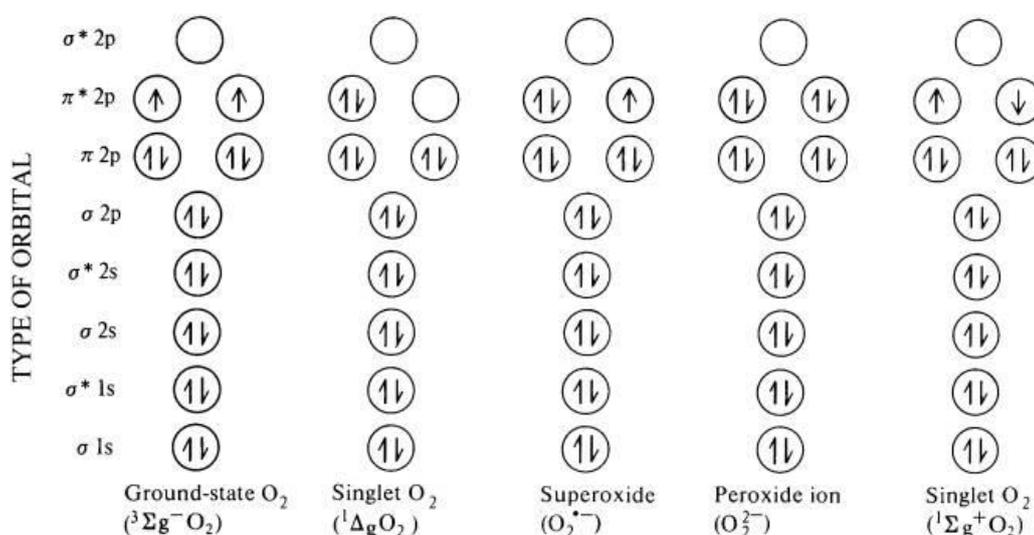


Figura 3. Orbitais moleculares de algumas EROs (Halliwell, 2006).

O H_2O_2 pode ser reduzido à água ou gerar o radical hidroxil ($\cdot OH$) via reação de Fenton (**Equação 3**). A reação de Haber-Weiss (**Equação 4**) representa o somatório da reação de Fenton com a reação de redução do ferro pelo superóxido. A reação de Fenton é catalisada por metais de transição como ferro e cobre (Burton and Jauniaux, 2011). Nesta, os íons de ferro Fe^{2+} são oxidados a íons de Fe^{3+} pelo H_2O_2 produzindo $\cdot OH$ (**Equação 3**) (Farrugia and Balzan, 2012). O radical hidroxil reage com a maioria dos compostos biológicos, danificando lipídios, DNA, proteínas e carboidratos, e assim promove o dano oxidativo e inibe as funções celulares normais (Droge, 2002; Halliwell and Whiteman, 2004).



Os radicais livres são extremamente estudados, pois são de suma importância no processo de várias patologias como, por exemplo, nas doenças neurodegenerativas. Na doença de Alzheimer as EROs provocam danos graves levando a perda neuronal, pois o cérebro é vulnerável ao estresse oxidativo devido ao aumento da demanda de oxigênio. Por isso, a mitocôndria, principal fonte de EROs, desempenha um papel importante para a manutenção e sobrevivência dos neurônios. No entanto, o alto consumo de oxigênio e, por consequência, a produção de radicais livres em excesso pode ocasionar alterações da integridade da membrana

mitocondrial, visto que sua estrutura pode ser susceptível à peroxidação lipídica (explicada no próximo tópico) (Padurariu *et al.*, 2013). Um dos alvos das EROs são os lipídios insaturados, que podem ser danificados por meio da peroxidação lipídica (Nam, 2011; Yan *et al.*, 2013). Além disso, o cérebro possui uma alta concentração de ácido graxos poliinsaturados e fatalmente é um alvo para a peroxidação lipídica (Nam, 2011; Padurariu *et al.*, 2013).

2.3 Estresse oxidativo

Os organismos são capazes de lidar com a geração de EROs e manter o equilíbrio entre sua quantidade e os sistemas de defesa antioxidante. Entretanto, quando há uma produção excessiva de EROs, os mecanismos de defesa podem não ser suficientes e os efeitos destas espécies acabam prevalecendo. O aumento de EROs ou a diminuição das defesas antioxidantes causa um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, conhecido como estresse oxidativo, condição onde ocorrem modificações funcionais e estruturais a diversas biomoléculas (Hermes-Lima, 2005; Burton and Jauniaux, 2011; Pamplona and Costantini, 2011; Kalyanaraman, 2013).

O estresse oxidativo pode ser causado por vários fatores de origem exógena ou endógena. Dentre os fatores de origem exógena podemos citar a intoxicação por metais pesados, a radiação e a falta de minerais provenientes da dieta (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Se). Dentre os fatores endógenos podemos citar as anormalidades genéticas (Halliwell and Whiteman, 2004; Valko *et al.*, 2007; Migdal and Serres, 2011; Gandhi and Abramov, 2012).

O estresse oxidativo tem implicações relevantes em processos de envelhecimento e na patofisiologia de várias doenças humanas como aterosclerose, diabetes, insuficiência renal crônica, transtornos neurodegenerativos e câncer (Young and Woodside, 2001; Droge, 2002; Green *et al.*, 2004). Foi proposto que, durante a hiperglicemia, o aumento de EROs mitocondrial pode ter um papel importante para a patologia da diabetes mellitus do tipo I e II, pois as células β pancreáticas são susceptíveis a danos oxidativos. Assim, são sugeridas estratégias terapêuticas, complementando as terapias convencionais, para diminuir ou impedir a produção de radicais durante a hiperglicemia e neutralizar os seus efeitos danosos (Brownlee, 2001; Green *et al.*, 2004).

2.3.1 Oxidação do DNA, proteínas, lipídios

A peroxidação lipídica é dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação. A peroxidação lipídica se inicia quando o radical hidroxil reage com os fosfolipídios na membrana das células, por meio da abstração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado, formando um radical lipídico (L[·]). Este radical, por conseguinte, forma um dieno conjugado com o O₂ formando o radical lipoperoxil (LOO[·]). A fase de propagação é iniciada com o radical lipoperoxil abstraindo um hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados e formando o hidroperóxido lipídico (LOOH). A terceira e última fase culmina com a decomposição de LOOH, LO[·] e LOO[·] formando bioprodutos, entre eles o malonaldeído (MDA), cetonas, aldeídos e hidrocarbonetos (Hermes-Lima, 2005). O MDA é um produto altamente mutagênico em células de mamíferos e cancerígeno em ratos (Valko *et al.*, 2007). Portanto a peroxidação lipídica pode alterar as propriedades físico-químicas das membranas lipídicas, resultando em disfunção celular grave (Catala, 2009).

O radical hidroxil pode reagir com as bases purínicas (adenina e guanina) e pirimidínicas (citosina e timina) e com o açúcar 2-desoxirribose, formando produtos específicos e resultando em processos mutagênicos e carcinogênicos (Hermes-Lima, 2005; Valko *et al.*, 2007; Kalyanaraman, 2013). O ataque do [·]OH ao carbono C-8 da guanina forma o produto 8-hidroxi-guanina, que é uma modificação do material genético mais estudado (Valko *et al.*, 2007).

Resíduos de cisteínas e metioninas em proteínas possuem um papel importante na defesa contra oxidantes e são constantemente alvos de oxidação pelas EROs. Os resíduos de metionina servem como proteção a outros resíduos da proteína que possuem funções críticas (Kim *et al.*, 2014). Estudos mostram que após a exposição ao radical superóxido e ao H₂O₂ as proteínas são mais suscetíveis à proteólise, com um aumento estimado de 10 vezes (Valko *et al.*, 2007).

2.4 Defesas antioxidantes

Para neutralizar os efeitos das EROs as células possuem mecanismos de defesa que envolvem mecanismos de prevenção, de reparo e as defesas antioxidantes. Antioxidantes são definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, impede ou atrasa os danos oxidativos a uma biomolécula alvo, e atuam por meio de mecanismo

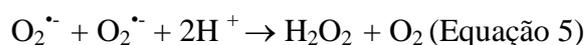
seqüestrador de EROs ou como quelantes de metais, os quais favorecem a formação de EROs (Valko *et al.*, 2007). A defesa antioxidante primária inclui os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os antioxidantes enzimáticos encontram-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona-peroxidase (GPx), glutaciona s-transferase (GST) e tioredoxinas peroxidases (TPx). Os antioxidantes de origem não enzimática são, por exemplo, o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutaciona (GSH), carotenoides, flavonoides e outros (Valko *et al.*, 2007; Gutteridge and Halliwell, 2010; Lu and Holmgren, 2014).

Existem vários métodos *in vitro* utilizados para avaliar o potencial antioxidante de diferentes compostos, tais como o ensaio de TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), DPPH (difenilpicril-hidrazil) e ABTS (azino etilbenzotiazilina-6-sulfonato). No ensaio de TBARS prepara-se uma reação contendo Fe^{2+} e H_2O_2 que gera radical hidroxil na presença de uma molécula alvo (lipídios ou desoxirribose, por exemplo). A reação é então estudada na ausência e presença dos componentes cuja atividade antioxidante está sendo investigada (Dalvi, 2008). O método DPPH investiga a capacidade de antioxidantes naturais em sequestrar o radical estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, utilizando espectrofotometria (Roesler *et al.*, 2007) e o chamado ensaio de ABTS é um método colorimétrico amplamente utilizado e baseado na captura do radical 2,2-azinobis, que é gerado através de uma reação enzimática (Erel, 2004).

2.4.1 Defesa antioxidante enzimática

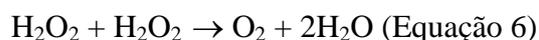
Em *Saccharomyces cerevisiae* a enzima SOD está presente sob duas formas nas células. Uma isoforma contém manganês (Mn-SOD) no sítio ativo e está presente normalmente na mitocôndria e a outra contém cobre e zinco (CuZn-SOD), e está localizada no citoplasma. A SOD catalisa a dismutação de $\text{O}_2^{\bullet -}$ em O_2 e H_2O_2 (**Equação 5**) (Kowaltowski *et al.*, 2009; Burton and Jauniaux, 2011).

SOD



A principal função da catalase é catalisar a dismutação do H_2O_2 , gerado nos peroxissomas, em água e oxigênio (**Equação 6**). A CAT tem sido encontrada em mitocôndrias do coração e do fígado (Cardoso *et al.*, 2012).

CAT



A GPx (selênio-dependente) tem a função de catalisar a decomposição de peróxidos, como o H_2O_2 , utilizando glutathiona (um tripeptídeo, Gly-Cys-Glu) na forma reduzida (GSH) como substrato doador de hidrogênio. Na catálise, duas moléculas de GSH formam a glutathiona oxidada (GSSG) (**Equação 7**) (Hermes-Lima, 2005; Kowaltowski *et al.*, 2009; Burton and Jauniaux, 2011).

GPx



A glutathiona S-transferase (GST) catalisa a conjugação de glutathiona (GSH) a eletrófilos, eliminando os produtos tóxicos provenientes da ação de radicais livres (Winyard *et al.*, 2005). O metabolismo celular e detoxificação de xenobióticos (substâncias carcinogênicas, toxinas, poluentes ambientais e fármacos) ocorre em 3 estágios. No estágio I, as toxinas são ativadas por oxidação, redução, ou hidrólise para introduzir um grupo funcional. No estágio II, o grupo funcional é conjugado com glutathiona (GSH), ácido glucurônico ou glicose. A conjugação com GSH é catalisada pelas enzimas glutathiona S-transferases (GSTs). No estágio III, os conjugados de GSH são eliminados do citoplasma por bombeadores específicos (Choi *et al.*, 1998). Além de atuarem como enzimas de detoxificação da fase II, as GSTs atuam também na defesa das células contra produtos do estresse oxidativo. Essas enzimas podem metabolizar aldeídos citotóxicos produzidos durante a peroxidação lipídica. O processo de detoxificação ocorre principalmente no fígado (Halliwell, 1999). As atividades das GSTs podem influenciar o crescimento celular e proteger contra moléculas indutoras de tumores (Raza, 2011).

As enzimas da família GST estão envolvidas na detoxificação de substâncias cancerígenas. Um estudo desenvolvido por Huber *et al.* (2004), verificou que o tratamento com os componentes Kahweol e cafestol, do café, aumentou a atividade das enzimas de detoxificação da fase II (glutathiona S-transferase), reduzindo a taxa de câncer de cólon em camundongos (Huber *et al.*, 2004). Nesse contexto, o café tem sido amplamente investigado por apresentar efeitos quimiopreventivos.

2.4.2 Defesa antioxidante não-enzimática

A defesa antioxidante não-enzimática, constituída por moléculas de baixa massa molecular, é subdividida em antioxidantes endógenos e exógenos. Esses antioxidantes têm a capacidade de “sequestrar” (do inglês “scavenge”) os radicais livres, por meio de seu potencial redutor, doando um elétron ou um hidrogênio à espécie reativa (Frei and Higdon, 2003). Os antioxidantes exógenos são provenientes da dieta como, por exemplo, a vitamina C, os carotenóides, os polifenóis e o alfa-tocoferol. Como exemplo de antioxidantes endógenos, podemos citar a glutathiona reduzida (GSH), o ácido úrico, a melatonina, a melanina e a coenzima Q (Hermes-Lima, 2005; Veskoukis *et al.*, 2012).

2.5 O café

2.5.1 História e importância econômica do café

Os primeiros cultivos de café tiveram origem na Etiópia, centro da África, mas foi a Arábia a responsável pela propagação cultural do café. Na cultura Árabe a fruta era consumida fresca e foi somente no século XVI, na Pérsia, que os primeiros grãos de café foram torrados, tornando-se a bebida que hoje nós conhecemos. Em 1727, o Sargento-Mor Francisco de Mello Palheta, a pedido do governador do Maranhão e Grão Pará, trouxe o café da Guiana Francesa (clandestinamente) para Belém, no Brasil. Graças às condições climáticas favoráveis da região, o cultivo do café foi espalhado com grande velocidade, e culminou com o Brasil sendo hoje o maior produtor mundial de café, responsável por 30% do mercado internacional. O Brasil acelerou o desenvolvimento e se inseriu nas relações internacionais de comércio graças ao café. O café da variedade arábica é plantado em São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia e Espírito Santo, e o café da variedade robusta é plantado no Espírito Santo e Rondônia (ABIC, 2009).

O consumo de café vem aumentando no Brasil a cada ano. Dados da Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) indicam que houve um acréscimo de 3,11% entre Novembro/2009 – Outubro/2010 e Novembro/2010 – Outubro/2011. Entre Maio/2011 e Abril/2012 o consumo registrado foi de 19,975 milhões de sacas. No período anterior (Maio/10 a Abril/11) o consumo foi de 19,383 milhões de sacas (ABIC, 2011). A expectativa para 2013 era de um crescimento entre 2,5% e 3,0% em volume, elevando o consumo interno

anual para 20,9 milhões de sacas. Esse crescimento deve-se ao poder de compra das classes B, C e D e retomada da economia brasileira. Além disso, havia a previsão do aumento do consumo fora do lar, como consequência de um aumento no número de cafeterias e restaurantes. O consumo interno do café no Brasil, observando anos anteriores, tinha a tendência de aumentar. Devido aos grandes eventos esportivos esperavam-se oportunidades para as empresas de café intensificar esse crescimento (**Figura 4**) (ABIC, 2012). No entanto, segundo a ABIC (2013), houve uma retração em consequência de inúmeras opções para o café da manhã como, por exemplo, as bebidas prontas (sucos, bebidas a base de soja e achocolatados). A estimativa para 2014 é um aumento do consumo interno de 3% a 4%, elevando a procura por cafés de melhor qualidade (ABIC, 2013).



Figura 4 – Evolução do consumo interno de café (ABIC, 2013).

As espécies de café de relevância comercial são o *Coffea arabica* e *Coffea robusta*. A diferença entre estas espécies está na composição química do grão verde, sendo que a arábica contém mais lipídios e a robusta contém um maior teor de cafeína, sacarose, ácido clorogênico e seus derivados. A variedade arábica tem um sabor e aroma mais agradável, por isso constitui 80% do comércio mundial de café (Bonita *et al.*, 2007). Os grãos de café torrado

possuem diversos compostos, tais como ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina, entre outros (Tabela 1).

Tabela 1. Composição do café torrado (Arábica)

Constituintes	Teor (%)
Umidade	2,5
Proteína	9,0
Polissacarídeos, insolúveis em água	24,0
Polissacarídeos, solúveis em água	6,0
Sacarose	0,2
Glicose, frutose, arabinose	0,1
Lipídios	13,0
Ác. Clorogênico	3,7
Ácido fórmico	0,1
Ácido acético	0,25
Ác. Lático, pirúvico, oxálico, tartárico, cítrico	0,4
Cafeína	1,2
Trigonelina	0,4
Ácido nicotínico	0,02
Aromas voláteis	0,1
Minerais	4,0
Outros	35,0

Fonte: (Araújo, 2011)

O que torna o café desejável é o processo de torrefação (os grãos são aquecidos a 200-240 °C durante 10-15 minutos), o que causa alterações tanto em sua composição química quanto em suas propriedades biológicas (Daglia *et al.*, 2000). De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC) a bebida de café deve ser preparada pela adição de água quente ao café torrado e moído, um processo chamado de infusão. A temperatura ideal da água deve ser próxima de 90 °C, pois se a água ferver haverá a perda de oxigênio, o que altera a acidez da bebida. O grande interesse dos pesquisadores pelo café é devido à grande variedade de substâncias antioxidantes como, por exemplo, os compostos fenólicos (Farah and Donangelo, 2006).

A busca por antioxidantes naturais têm motivado muitos pesquisadores a estudar o café. No estudo de Jeong e colaboradores (2013), o pré-tratamento com extrato de café

torrado protegeu a cultura de células neuronais da linhagem PC12, contra a neurotoxicidade induzida por H₂O₂, analisado pelo ensaio de viabilidade celular com brometo de 3-(4,5-dimetil)difenil tetrazólio (MTT). Compostos antioxidantes presentes no café talvez possam prevenir a doença de Alzheimer uma vez que o estresse oxidativo está envolvido no aumento da degeneração dos neurônios (Jeong *et al.*, 2013). Outro estudo demonstrou que o café reduz os danos ao DNA no tecido hepático, impedindo a indução de lesões pré-neoplásicas no fígado de ratos (Ferk *et al.*, 2014).

2.5.2 Compostos fenólicos

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes os compostos fenólicos têm recebido uma atenção considerável devido a sua alta capacidade antioxidante e por serem obtidos através da dieta humana (Xu and Chang, 2007; Leopoldini *et al.*, 2011). O consumo diário de alimentos naturais que contêm compostos fenólicos pode ter efeito protetor contra metástases (Weng and Yen, 2012). Além disso, os polifenóis têm sido descritos como protetores contra a peroxidação lipídica, atuando como quelantes de metais ou impedindo a participação de metais na formação de $\cdot\text{OH}$ (Hermes-Lima, 2005).

Os compostos fenólicos não participam do crescimento e desenvolvimento do vegetal e, por isso são considerados metabólitos secundários. Estes compostos podem ser classificados de acordo com o grupo funcional e com o número de anéis aromáticos hidroxilados. Eles possuem estruturas bem diversificadas, desde moléculas simples até substâncias altamente complexas, sendo genericamente classificados como fenóis simples e polifenóis, com base no número de subunidades de fenóis. Neste caso, compreendem o termo fenol: os fenóis simples, os fenóis ácidos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos e lignanas (Araújo, 2011). Os ácidos fenólicos são divididos em 2 classes: 1- derivados do ácido benzóico; 2- derivados do ácido cinâmico. Os flavonóides contêm dois anéis benzenos ligados ao anel heterocíclico pirano e são divididos em 6 classes: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanóis (**Figura 5**) (Manach *et al.*, 2004; Dai and Mumper, 2010a; Araújo, 2011; Weng and Yen, 2012).

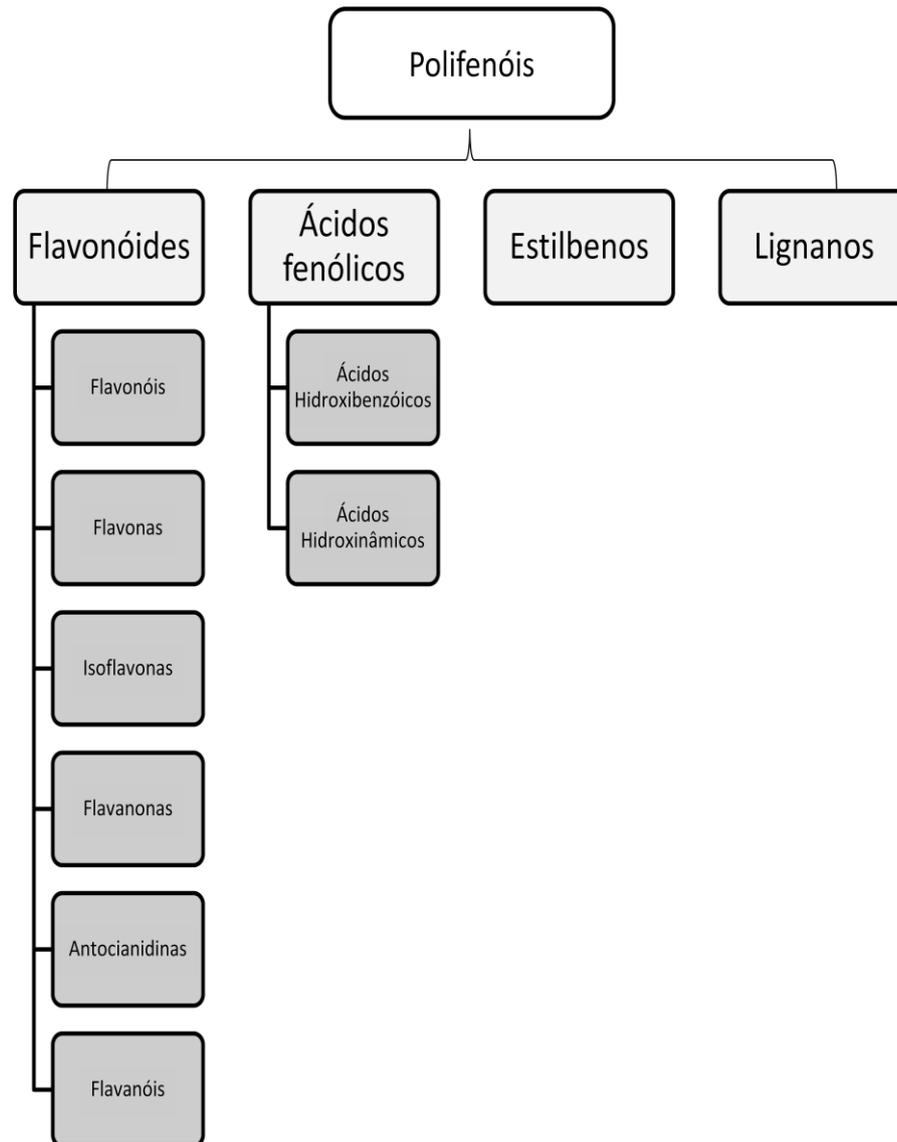


Figura 5 - Classificação dos polifenóis. Adaptado de Forbes-Hernandez *et al.*, 2014.

Os compostos fenólicos são encontrados em alimentos de origem vegetal (frutas, legumes, azeite) e em bebidas (chá, café, vinho, e outros) (**Tabela 2**). No café o ácido 5-cafeoilquínico, formado pelo ácido cafeico, na forma de éster, (representante dos ácidos hidroxinâmicos) com o ácido quínico, está presente em elevada concentração (Araújo, 2011). Nas plantas, esses compostos estão envolvidos na proteção contra agressões mediadas por patógenos, parasitas, contra a radiação ultravioleta, absorção de luz, remoção de radicais livres formados durante a fotossíntese, entre outros (Dai and Mumper, 2010a; Araújo, 2011; Weng and Yen, 2012).

Tabela 2 – Teor de fenóis totais em vegetais e bebidas.

Alimento	Fenóis totais (mg/100 g matéria seca)	Alimentos/bebidas	Fenóis totais (mg/100 g peso fresco)
Cereais		Frutas frescas	
Arroz	8	Maçã	27-298
Cevada	1.200-1.500	Uva	50-490
Milho	31	Laranja	50-100
Sorgo	170-10.260	Pera	2-25
Trigo	22-40	Abacaxi	67-72
Aveia	8	Morango	38-218
		Acerola	861-888
		Tomate	85-130
Vegetais		Suco de frutas	(mg/100 mL)
Ervilha	78-230	Maçã	2-16
Cebola	100 – 2.000	Laranja	370-7100
Repolho verm.	178		
Alface verm.	170		
Couve-de-bruxelas	6 – 15		
Salsa	55 – 180	Bebidas	
Aipo	95	Chá (mg/200 mL)	150-210
Feijão-preto	970	Café (mg/150 mL)	200-550
		Vinho branco (mg/100 mL)	20 – 30
		Vinho tinto (mg/ 100 mL)	100-400
		Cerveja (mg/100 mL)	6-10
		Mel (mg/100 g)	35

Fonte: (Araújo, 2011)

O café é considerado a bebida que possui a principal fonte de compostos fenólicos. A fração fenólica dos cafés verdes é composta pelo ácido caféico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico e ácidos clorogênicos (CGA), sendo o CGA o mais frequente. Durante o

processamento dos grãos verdes, esses compostos sofrem modificações afetando a composição dos compostos fenólicos, ou seja, à medida que aumenta a intensidade de torra, diminui os teores totais de CGA (Farah and Donangelo, 2006; Araújo, 2011).

2.5.3 Café orgânico

A busca por alimentação saudável, alimentos naturais e conservação do meio ambiente é uma realidade em todo o mundo. De acordo com o Ministério da Agricultura (Brasil, 2014a), a sustentabilidade envolve desenvolvimento econômico, social e respeito aos recursos naturais e suas limitações. Ou seja, deve-se pensar nas gerações futuras, não comprometendo as suas necessidades. Assim, o Ministério da Agricultura desenvolve projetos que estimulam as boas práticas agropecuárias, com assistência técnica e financiamento.

Neste contexto surge a produção orgânica que objetiva promover a qualidade de vida com proteção ao meio ambiente. Para atingir este objetivo propõe-se a não utilização de agrotóxicos, adubos químicos ou substâncias sintéticas que agredam o meio ambiente. Existe uma fiscalização por parte do governo para avaliar o controle de qualidade e a não utilização das substâncias agressivas. Os alimentos orgânicos passam por essa avaliação e adquirem o selo SisOrg, por meio da Certificação por Auditoria ou por um sistema Participativo de Garantia (Brasil, 2014b).

O Brasil tem ganhado destaque na produção mundial de orgânicos e a comercialização dos produtos orgânicos foi aprovada pela lei 10.381, de dezembro de 2003, com regulamentação pelo Decreto N° 6.323, de dezembro de 2007. A lei 10.831/2003 (Brasil, 2003) define o que é considerado sistema orgânico de produção agropecuária, estabelece a finalidade desse sistema e determina que este processo deve ser certificado por auditoria ou através de certificação participativa.

Os produtos orgânicos têm ganhado ênfase devido à preocupação da sociedade em melhorar a qualidade de vida e a saúde humana e em diminuir a agressão ao meio ambiente. Nesse contexto, o cultivo e produção do café orgânico representam atividades com enorme potencial, desempenhando um papel na economia de países produtores (Ricci, 2006; Brasil, 2014a).

A temperatura ideal para o cultivo do café arábica fica entre 19 e 22 °C e para o café robusta fica entre 22 e 26 °C. Um ponto importante diz respeito à matéria orgânica que é fundamental para a manutenção das características físicas, químicas e biológicas do solo. Uma forma eficiente e relativamente barata de se elevar o teor de matéria orgânica dos solos é

por meio da adubação verde (plantas cultivadas no local ou trazidas de fora e incorporadas ao solo), tendo como finalidade a preservação de sua fertilidade e adubos orgânicos (Ricci, 2006).

No DF (Distrito Federal) o café Serrazul (**Figura 6**) (variedades catuaí-rubi e acaiaí-cerrado) é plantado a uma altitude de 1250 metros acima do nível do mar na chapada da Contagem, em Brasília, sendo cultivado dentro das rígidas normas da agricultura orgânica. Após a colheita o café é armazenado na forma de grão de côco por um ano, onde o grão absorve açúcares e outras substâncias contidas na casca. O café obtido dessa forma chama-se café descansado e a sua torra é leve. As quantidades solicitadas do produto são descascadas e torradas somente sob encomenda (Serrazul, 2014).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado a capacidade antioxidante de cafés orgânicos em sistema in vitro. Nossos resultados iniciais mostraram que as amostras de café orgânico foram eficazes na proteção contra a peroxidação lipídica, indicando a presença de antioxidantes e/ou quelantes de ferro, e que o café Serrazul apresentou maior capacidade antioxidante quando comparado a um café produzido pelo método convencional e de alta qualidade (tipo exportação) (resultados não mostrados). Consideramos que o processo de cultivo do café é importante e pode afetar o conteúdo de antioxidantes e criar compostos com propriedades relevantes (anti-cancerígenas, por exemplo) e únicas do café.



Figura 6 – Café Serrazul. Fonte: (Serrazul, 2014).

2.5.4 Café e qualidade de vida

Em um estudo de intervenção humana Bakuradze *et al.* (2011) verificaram que o consumo do café tem eficácia na redução do peso e gordura corporal. A intervenção foi feita analisando amostras de sangue de voluntários saudáveis, que ingeriram um café rico em constituintes do grão de café verde e em produtos da torrefação. Como resultado houve redução de dano ao DNA, aumento de GSH e da atividade de glutathione redutase (GSR). Os efeitos mais significativos, em relação ao aumento de GSH, foram em participantes cujo índice de massa corpórea (IMC) era < 25, ou seja, com o peso normal, quando comparado com participantes com excesso de peso. Esse resultado sobre os níveis de GSH pode ser atribuído à presença de constituintes fenólicos como ácidos cafeoilquínicos. A atividade antioxidante *in vivo* deve-se aos produtos torrados (N-metilpiridínio - NMP) (Bakuradze *et al.*, 2011).

Choi *et al.* (2011) investigaram o efeito do café sobre o estado antioxidante e o perfil lipídico de camundongos durante o exercício. Segundo os autores, a ingestão de 0,12g de café/100 g de peso corporal por dia pode fortalecer o sistema antioxidante sob estresse oxidativo induzido por exercícios *in vivo*. Foi verificado neste estudo que as atividades de SOD, catalase e a razão GSH/GSSG aumentaram nos grupos que ingeriram café (Choi *et al.*, 2011).

Um estudo de 2011 avaliou o efeito de uma dose única e pequena de bebida de café em camundongos. Foram investigadas as alterações hepáticas das enzimas SOD, CAT e GPx, a extensão e características das respostas ao consumo de café e determinadas possíveis alterações na capacidade antioxidante total do tecido hepático. Foi verificado que uma dose de 2 mL (correspondendo a 4 copos médios de café para uma pessoa de 70 kg) da bebida de café foi suficiente para aumentar a atividade das enzimas acima descritas. Estes resultados indicam que o café pode induzir fatores de transcrição que modulam enzimas antioxidantes, ou que componentes do café podem aumentar diretamente a atividade enzimática de tais enzimas (Vicente *et al.*, 2011).

A maioria dos estudos com o café está relacionada ao café convencional, evidenciando uma carência de estudos com cafés orgânicos. Portanto, a pesquisa comparando os efeitos antioxidantes de cafés orgânicos e convencional é importante para determinar possíveis diferenças entre esses cafés. Além do mais, segundo Wu e colaboradores (2011), a utilização

de células de leveduras propicia a descoberta de novos antioxidantes para aplicações terapêuticas e/ou industriais.

2.6 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo

Existem vários métodos *in vitro* para investigar a atividade antioxidante de compostos vegetais. Tais métodos, em sua maioria, fornecem uma indicação da capacidade de um composto em sequestrar metais ou reagir com EROs. Uma deficiência destes métodos é que eles não medem o efeito de um antioxidante sobre a sobrevivência da célula. Dessa forma o uso de *Saccharomyces cerevisiae* pode resolver esta deficiência. A levedura *S. cerevisiae* é um eucarioto unicelular que tem semelhanças com células de mamíferos em níveis de macromoléculas e organelas (Costa and Moradas-Ferreira, 2001). É um organismo de fácil cultivo sendo, portanto, amplamente utilizado como sistema modelo para muitas pesquisas, devido aos mecanismos celulares básicos e ao metabolismo. As leveduras são um objeto oportuno para estudar a resposta de adaptação ao estresse oxidativo, mecanismos moleculares e no desenvolvimento de abordagens terapêuticas e profiláticas (Lushchak, 2010).

As leveduras regulam a síntese de antioxidantes de acordo com a sua fase de crescimento. As fases conhecidas são: fase lag, onde as células estão em adaptação às condições de cultivo e estão se preparando para dividir; fase logarítmica ou exponencial, onde as células se dividem; fase estacionária, onde o número de células novas corresponde às que morrem; fase de morte da cultura, onde o número de células mortas é maior do que as que são novas. A maioria dos estudos utiliza as culturas de células nas fases exponencial ou estacionária. Na fase exponencial a *S. cerevisiae* utiliza a glicose como fonte de energia e carbono, onde a maior parte da energia é produzida pela glicólise ou fermentação. Nesta fase, a participação da mitocôndria é irrelevante, assim como o consumo de oxigênio é baixo. Desta forma, nesta fase, a produção de EROs é reduzida e a atividade de enzimas antioxidantes é baixa (Drakulic *et al.*, 2005; Lushchak, 2010).

Durante a mudança da fase exponencial para a estacionária há um aumento da utilização de etanol, formado na fase anterior, pela cultura de *S. cerevisiae*, como fonte de carbono e energia. Para oxidação completa do etanol é necessário o funcionamento da mitocôndria acentuando a geração de EROs, o que eleva a atividade de enzimas antioxidantes para manter os níveis de EROs dentro dos limites seguros. Portanto, essa mudança de fase pode potencializar a geração de EROs causando estresse oxidativo (Lushchak, 2010).

A levedura *S. cerevisiae*, ao entrar em contato com uma dose não-letal de um oxidante exógeno, promove a parada temporária do ciclo celular para se adaptar ao estresse oxidativo (Alic *et al.*, 2001). Esta é uma característica importante, pois propicia o desenvolvimento de ensaios antioxidantes eficientes para facilitar a descoberta de antioxidantes com aplicação terapêutica e industrial (Wu *et al.*, 2011).

O estudo de Wu e colaboradores (2011) descreve um sistema de análise biológica para medir a capacidade antioxidante de diferentes compostos usando a resposta de parada do crescimento induzida por oxidante apresentada por *S. cerevisiae*. O método pode medir a capacidade de um componente de proteger as células contra um oxidante evitando a parada do crescimento celular, medida por meio da absorbância a 600 nm, utilizando microplacas de 96 poços. Pode também medir a capacidade de um componente de induzir uma resistência celular aos efeitos danosos de diferentes oxidantes. Neste método de indução as células são incubadas com o composto antioxidante por determinado período e são lavadas para, em seguida, serem expostas ao oxidante. Por meio deste método os autores mostraram que o ascorbato e o ácido gálico possuem atividade sequestradora de EROs e induzem uma resistência de *S. cerevisiae* a vários oxidantes.

Visto que a levedura é um modelo de fácil cultivo e que possui semelhança com os organismos multicelulares, neste trabalho foram selecionadas as linhagens de *S. cerevisiae* do tipo selvagem (S288c e EG103) e, ainda, linhagens deficientes nas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) contendo cobre/zinco (CuZnSOD, gene SOD1) e superóxido dismutase contendo manganês (MnSOD, gene SOD2). As linhagens selvagens e EG110 (não expressa a enzima SOD2) e EG 118 (não expressa a enzima SOD1) foram incubadas na presença de extrato de café e H₂O₂ para avaliar a capacidade do extrato em proteger as células deficientes em SOD.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antioxidante de extratos de café orgânico e convencional em ensaios de crescimento da levedura *S. cerevisiae*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da pré-exposição das leveduras S288C aos extratos de café na proteção contra o estresse oxidativo induzido por H₂O₂.
- Avaliar se há diferença nos efeitos promovidos pelos extratos de cafés orgânico e convencional, e pelos extratos aquosos e etanólicos do café, na levedura S288C.
- Determinar o potencial antioxidante do extrato aquoso do café orgânico torrado, em leveduras selvagens (S288C e EG103) e mutantes SOD (EG110 e EG118), verificando o efeito do extrato, em diferentes concentrações, no crescimento das leveduras na presença de H₂O₂.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras de café

Foram utilizadas neste experimento as amostras de café descritas abaixo:

A) Foram usadas amostras de café orgânico Serrazul (verde e torrado), safra de 2011 – Acaiá-Cerrado. O Café Serrazul, da espécie *Coffea arabica*, variedades catuaí-rubi e acaiá-cerrado, é plantado a uma altitude de 1250 metros acima do nível do mar na chapada contagem de Brasília (Núcleo Rural Lago Oeste, Rua 18 chácara 35), além de ser cultivado dentro das rígidas normas da agricultura orgânica, o processamento é feito de forma artesanal. Seus grãos são colhidos um a um, somente no estágio cereja, secados ao sol em solo cimentado, obtendo-se dessa forma um café natural 100% puro. As amostras de café Serrazul foram doadas pelo produtor Márcio Jório Veiga de Lima.

B) Café convencional Prima Qualitá Cooxupé. É um café gourmet torrado em grão da espécie *C. arabica*. Este café foi adquirido em supermercado (Lot.394/ Fab. 16-09-2013/ Val. 15-03-2014).

4.2 Linhagens de leveduras

- S288c (*MATa SUC2 mal gal2*)
- EG 103 (*MAT α, leu2-3, 11 his3Δ1 trp-289a, ura3-52*)
- EG 110 (como EG103 exceto *sod2Δ::TRP1*)
- EG 118 (como EG103 exceto *sod1Δ::URA3*)

As linhagens EG103, EG110 e EG118 foram doadas pela Dra. Edith Gralla da Universidade da Califórnia em Los Angeles (UCLA). São linhagens mutantes de *S. cerevisiae* que não codificam a enzima CuZnSOD (EG 118) ou a enzima MnSOD (EG110).

4.3 Meios de cultura

YPD

Extrato de levedura 1 % (p/v)

Peptona	2 % (p/v)
Glicose	2 % (p/v)

YPD ágar

Para o meio sólido foi acrescentado ágar bacteriológico na concentração de 2 % (p/v) ao meio YPD líquido.

4.4 Tampões

Tampão PBS 1X

NaCl	136,9 mM
Na ₂ HPO ₄	8,09 mM
NaH ₂ PO ₄	1,76 mM
KCl	2,69 mM

Tampão KPi (fosfato de potássio) 50 mM pH 7,2

Solução estoque KPi 1M:

Fosfato de potássio dibásico	17,41 g/100 mL
Fosfato de potássio monobásico	13,6 g/ 100 mL

Para o preparo da solução estoque de KPi 1 M, foram misturados aproximadamente 71,1 mL de solução de fosfato de potássio dibásico 1M com aproximadamente 28,3 mL de solução de fosfato de potássio monobásico 1M, medindo-se o pH no pHmetro até que atingisse 7,2.

4.5 Reagentes e Soluções

Etanol 95%

H₂O₂

Solução estoque H₂O₂ 100 mM

H ₂ O ₂ 8,8 M	114 uL
Água	Completar para 10 mL

A partir da solução estoque foi preparado H₂O₂ 10 mM para conferir a absorvância a 240 nm no espectrofotômetro (Shimadzu). Essa solução deve ter uma OD de 0,44, que corresponde ao coeficiente de extinção molar do H₂O₂.

4.6 Preparos dos extratos etanólicos de café

Os grãos de cafés orgânicos e convencional foram macerados em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido para facilitar a sua pulverização. O pó obtido foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL e foi então adicionado etanol puro (95%) na razão de 1:10 (1 g de pó e 10 mL de etanol). Os tubos foram incubados sob agitação em uma plataforma agitadora (200 rpm) em temperatura ambiente durante 1 hora. Em seguida as amostras foram filtradas em papel de filtro e centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Posteriormente as amostras foram secadas à vácuo (SpeedVac Savant – B446). Foi realizada a pesagem desses extratos secos e para ressuspender com etanol 95% foi feito o cálculo para que a concentração do etanol no meio de cultura não ultrapassasse 2%. Metodologia adaptada de (Souza *et al.*, 2008).

4.7 Preparo dos extratos aquosos de café

Os grãos de cafés orgânicos e convencional foram triturados em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido para facilitar a sua pulverização. Inicialmente foram adicionados 10 mL de água milli-Q a 1 g (razão 1:10, pó/água) de pó e fervidas as amostras por cinco minutos. A seguir as amostras foram transferidas para o gelo e, após resfriarem, foram filtradas em papel de filtro, agitadas no vortex por 15 segundos e centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o extrato foi esterilizado utilizando-se um filtro de 0,45 µM, com auxílio de uma seringa. O extrato foi imediatamente utilizado nas culturas de leveduras crescidas na ausência ou presença do H₂O₂. Todo o processo de preparo das amostras foi repetido três vezes em dias diferentes.

4.8 Ensaio *in vivo* (placas de 96 poços) utilizando leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para avaliação da atividade antioxidante das amostras de café orgânico torrado

Foram utilizadas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* das linhagens S288c, EG 103, EG 110 e EG 118 as quais foram semeadas, a partir de um estoque de células congeladas na presença de glicerol, em uma placa de ágar YPD contendo 1% p/v extrato de levedura, 2% p/v de peptona, 2% p/v de glicose e 2% p/v de ágar, e cultivadas a 28° C por 48 horas. A cultura de levedura foi iniciada pela inoculação de uma única colônia em meio YPD líquido, incubando em seguida durante a noite com agitação a 200 rpm a 28° C. Posteriormente a pré-cultura foi diluída para uma OD_{600 nm} inicial de 0,2 (em placa de 96 poços com volume final de 150 uL). As placas foram incubadas a 28°C sob agitação constante em um leitor de placa de 96 poços (Versamax Microplate Reader) e o crescimento das leveduras foi acompanhado por meio da medida de absorbância a 600 nm.

4.8.1 Determinação da concentração de H₂O₂ que causa parada de crescimento da levedura *S. cerevisiae*

Foram obtidas curvas de crescimento das diferentes linhagens de levedura na presença ou ausência de H₂O₂ (0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM e 4 mM). A concentração de H₂O₂ a ser usada nos experimentos com os extratos de cafés foi então determinada como sendo 1 mM. Os experimentos foram realizados como se segue.

Foi inoculada uma colônia de cada linhagem celular (S288c, EG 103, EG 110 e EG 118), separadamente, em meio YPD incubada sob agitação a 200 rpm a 28°C durante a noite. O pré-inóculo foi diluído em meio YPD para a absorbância (600nm) de 1,1. A absorbância final na placa de 96 poços foi de 0,2 em um volume final de 150 µL. Para exposição ao peróxido de hidrogênio foram adicionados 10µL para as concentrações finais de 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 mM. A placa foi incubada a 28 °C e o crescimento da levedura foi monitorado através da leitura da OD_{600 nm} no início de incubação e, em seguida, em intervalos de uma hora, durante cinco horas, utilizando um leitor de placa Versamax. O experimento foi repetido 3 vezes em duplicata e foi calculado a média e erro padrão do crescimento para cada condição (Wu et al, 2011 – com adaptações).

4.8.2 Exposição imediata da levedura *S. cerevisiae* ao H₂O₂ e tratamento com o café

Após a escolha da concentração de parada do H₂O₂ foi realizado o tratamento de *S. cerevisiae* com oito concentrações de extrato do café orgânico torrado. Como controle do experimento foi usado a cultura tratada com 1mM H₂O₂. Foi inoculada uma colônia de cada linhagem celular (S288c, EG 103, EG 110 e EG 118), separadamente, em meio YPD incubada sob agitação a 200 rpm a 28°C durante a noite. O pré-inóculo foi diluído em meio YPD para a absorbância (600nm) de 1,1. A absorbância final na placa de 96 poços foi de 0,2 em um volume final de 150 µL. As células foram diretamente expostas a 10 µL de H₂O₂ 1 mM e 10 µL de extrato de café Acaiá torrado em oito concentrações (0,0009; 0,001719; 0,0034; 0,0138; 0,0275; 0,05; 0,1 e 0,2 mg/mL). A placa foi incubada a 28 °C e o crescimento da levedura foi monitorado através da leitura da OD_{600 nm} no início de incubação e, em seguida, em intervalos de uma hora, durante cinco horas, utilizando um leitor de placa Versamax. O experimento foi repetido três vezes em duplicata e foi calculado a média e o erro padrão do crescimento para cada condição.

4.9 Avaliação de taxas de sobrevivência de leveduras após estresse oxidativo (Spot test)

Para este experimento foram utilizadas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* S288C. Para avaliar a sobrevivência celular, inicialmente foram feitos testes onde as células foram inoculadas em meio de cultura YPD e incubadas durante 16 horas a 28° C/200 rpm. As células foram diluídas para OD_{600nm} 0,3 e expostas a diferentes concentrações de extratos de café Acaiá Torrado, Acaiá Verde e Prima Qualitá. As células crescidas durante a noite na presença dos extratos de café foram coletadas por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, e lavadas 2 vezes com tampão KPi 50 mM pH 7,2. Em seguida as células foram ressuspensas em 2 mL de YPD e diluídas para OD 600nm 0,2. Foram realizadas diluições seriadas (10; 10⁻²; 10⁻³; 10⁻⁴) em meio YPD. As células foram plaqueadas (5 uL) em meio YPD-ágar contendo 5 mM de H₂O₂ e as placas foram incubadas a 28°C durante 24 – 48 horas e foi avaliada a viabilidade das colônias. O Trolox (antioxidante convencional) foi usado como controle.

Foi utilizado um segundo protocolo para avaliar o efeito da exposição prévia ao extrato aquoso de café Acaiá Torrado seguido do tratamento com H₂O₂. Isto foi feito para verificar se alterações no tempo de exposição ao extrato, e na forma de exposição ao peróxido (na placa contendo meio YPD-ágar ou no meio líquido) poderiam modificar o efeito protetor do café. Uma colônia de S288c foi inoculada em meio de cultura YPD. O inóculo foi

incubado durante 16 horas a 28°C/ 200 rpm. No dia seguinte as células foram coletadas por centrifugação a 3000 rpm por 2 minutos, lavadas duas vezes com tampão PBS 1X e diluídas para uma OD₆₀₀ inicial de 0,1 em meio YPD. Para que as células pudessem duplicar, a cultura foi incubada a 28°C sob agitação constante de 200 rpm, onde permaneceu por 2 horas. Imediatamente após o tratamento adaptativo as culturas foram monitoradas por meio da OD₆₀₀, cujo resultado foi de uma OD inicial de 0,2. Em seguida, a cultura foi incubada a 28°C durante 6 horas na presença ou ausência dos extratos dos cafés, ou o Trolox 1 mM (como controle), ou etanol (controle para o Trolox, o qual foi dissolvido em etanol). Passadas seis horas, as células foram submetidas ao estresse oxidativo por meio do tratamento com H₂O₂ 2 mM ou 4 mM e a cultura tratada foi incubada a 28°C/200 rpm durante a noite. No dia seguinte, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes com PBS 1X e ressuspendidas em 1 mL de YPD. As culturas foram plaqueadas (5 uL) sem diluir, após serem diluídas 10X e também após todas as amostras serem diluídas para uma mesma OD (a OD escolhida neste caso foi a menor OD registrada dentre todas amostras). O Trolox (vitamina E) foi usado como controle de antioxidante. As placas foram incubadas a 28°C durante 48 horas e foi avaliada a viabilidade das colônias.

4.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software MYNOVA, com aplicação do teste de Dunnett para comparação entre controle e testes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados em formato de artigo (Capítulo 1) com introdução, materiais e métodos, resultados e discussão e referências bibliográficas. A numeração das figuras do artigo segue a ordem do trabalho como um todo, com o objetivo de orientar o leitor quanto à lista de figuras.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Baseado nos resultados podemos concluir que o H_2O_2 induziu estresse oxidativo nas células de *S. cerevisiae*, tanto nos ensaios em placa (5 mM), quanto nos ensaios em meio líquido (1 mM). Além disso, verificamos que os diferentes extratos de café (orgânico verde, orgânico torrado e convencional) obtiveram a mesma resposta ao H_2O_2 , não havendo diferença de proteção entre eles. O H_2O_2 1 mM não é letal para as leveduras *S. cerevisiae*, por outro lado induziu mecanismos que causaram a parada do crescimento como forma de adaptação ao insulto oxidativo exógeno. Ao testar os extratos dos cafés verificamos que estes exerceram função antioxidante protegendo as células de levedura contra o dano oxidativo, causado pelo H_2O_2 5 mM nos ensaios em placa com meio sólido. Já nos ensaios em meio líquido com exposição direta das células com H_2O_2 e diversas concentrações de café Acaia torrado, verificou-se que o extrato agiu como pró-oxidante não sendo capaz de reverter os danos causados pelo H_2O_2 , quando adicionados juntos. Portanto, podemos sugerir que em longo prazo, quando pré-exposto às células, o café é capaz de prevenir os danos causados por oxidantes (neste caso o H_2O_2).

Pode-se concluir pelo estudo realizado, que o café torrado é um importante alimento funcional com ação protetora das células de *S. cerevisiae*, por meio de seus diversos componentes. Como foi citado anteriormente, um composto antioxidante pode apresentar diferentes comportamentos dependendo das condições de ensaio. Essa afirmação foi observada neste estudo, cujas condições experimentais resultaram em uma resistência de S288c maior no teste em placa, quando comparado com o teste em meio líquido (5 mM foi letal em meio líquido). Portanto, são necessários outros testes para avaliar diferentes solventes para extração do café, isolar os seus componentes e testá-los separadamente.

Fundamentado na hipótese de que o café tem um grande potencial antioxidante, como perspectivas desse projeto estão: 1) o teste de novas concentrações dos extratos de café; 2) dosagem de polifenóis; 3) determinação da atividade de glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) e 4) avaliação da expressão gênica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC, 2009. A história do café, origem e trajetória. <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38> (accessed 30 de abril 2012).
- ABIC, 2011. Indicadores da indústria de café no Brasil. Indicadores da indústria de café no Brasil. <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#aumento2011> (accessed 02 de maio 2012).
- ABIC, 2012. Estatísticas. <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#1910> (accessed 18 de maio 2013).
- ABIC, 2013. Evolução do consumo interno de café. <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=61#evocons2013.2> (accessed 12 de junho 2014).
- Abrahão, S.A., 2007. Qualidade da bebida e atividade antioxidante do café *in vivo* e *in vitro*., Ciência dos Alimentos. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, p. 82.
- Abrahão, S.A., Pereira, R.G.F.A., Duarte, S.M.d.S., Lima, A.R., Alvarenga, D.J., Ferreira, E.B., 2010. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). Ciência e Agrotecnologia 34, 414-420.
- Alic, N., Higgins, V.J., Dawes, I.W., 2001. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* gene that is required for G1 arrest in response to the lipid oxidation product linoleic acid hydroperoxide. *Molecular biology of the cell* 12, 1801-1810.
- Alzoghaibi, M.A., 2013. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. *World journal of gastroenterology* : WJG 19, 6540-6547.
- Anese, M., Nicoli, M.C., 2003. Antioxidant Properties of Ready-to-Drink Coffee Brews. *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 942-946.
- Araujo, F.A., 2007. Café (*Coffea arabica*, L.) submetido a diferentes condições de torrefação: caracterização química e avaliação da atividade antioxidante e sensorial. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 130.
- Araújo, J.M.A., 2011. Química de alimentos: Teoria e prática. UFV, Viçosa, MG, p. 601.
- Bae, Y.S., Oh, H., Rhee, S.G., Yoo, Y.D., 2011. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecules and cells* 32, 491-509.
- Bakuradze, T., Boehm, N., Janzowski, C., Lang, R., Hofmann, T., Stockis, J.P., Albert, F.W., Stiebitz, H., Bytof, G., Lantz, I., Baum, M., Eisenbrand, G., 2011. Antioxidant-rich coffee reduces DNA damage, elevates glutathione status and contributes to weight control: results from an intervention study. *Mol Nutr Food Res* 55, 793-797.
- Boettler, U., Sommerfeld, K., Volz, N., Pahlke, G., Teller, N., Somoza, V., Lang, R., Hofmann, T., Marko, D., 2011a. Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear

translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 22, 426-440.

Boettler, U., Volz, N., Pahlke, G., Teller, N., Kotyczka, C., Somoza, V., Stiebitz, H., Bytof, G., Lantz, I., Lang, R., Hofmann, T., Marko, D., 2011b. Coffees rich in chlorogenic acid or N-methylpyridinium induce chemopreventive phase II-enzymes via the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. *Molecular Nutrition & Food Research* 55, 798-802.

Bonita, J.S., Mandarano, M., Shuta, D., Vinson, J., 2007. Coffee and cardiovascular disease: in vitro, cellular, animal, and human studies. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 55, 187-198.

Brasil, 2003. Lei N° 10.831, de 23 de dezembro de 2003. In: Jurídicos, P.d.R.C.c.S.p.A. (Ed.). http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/110.831.htm (accessed 08 de maio 2014).

Brasil, 2014a. Desenvolvimento sustentável. Orgânicos. In: agricultura, M.d. (Ed.). <http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/organicos> (accessed 8 de maio 2014).

Brasil, 2014b. Desenvolvimento sustentável. Orgânicos. Regularização da Produção Orgânica. In: agricultura, M.d. (Ed.). <http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/organicos/regularizacao-producao-organica> (accessed 08 de maio 2014).

Bravo, J., Arbillaga, L., de Pena, M.P., Cid, C., 2013. Antioxidant and genoprotective effects of spent coffee extracts in human cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 60, 397-403.

Bravo, J., Juárez, I., Monente, C., Caemmerer, B., Kroh, L.W., De Peña, M.P., Cid, C., 2012. Evaluation of Spent Coffee Obtained from the Most Common Coffeemakers as a Source of Hydrophilic Bioactive Compounds. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 12565-12573.

Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820.

Burton, G.J., Jauniaux, E., 2011. Oxidative stress. Best practice & research. *Clinical obstetrics & gynaecology* 25, 287-299.

Butnariu, M., Caunii, A., 2013. Design management of functional foods for quality of life improvement. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM* 20, 736-741.

Cardoso, A.R., Chausse, B., da Cunha, F.M., Luevano-Martinez, L.A., Marazzi, T.B., Pessoa, P.S., Queliconi, B.B., Kowaltowski, A.J., 2012. Mitochondrial compartmentalization of redox processes. *Free radical biology & medicine* 52, 2201-2208.

Catala, A., 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and physics of lipids* 157, 1-11.

Chiu, J., Tactacan, C.M., Tan, S.X., Lin, R.C., Wouters, M.A., Dawes, I.W., 2011. Cell cycle sensing of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidation of a specific cysteine residue in the transcription factor Swi6p. *The Journal of biological chemistry* 286, 5204-5214.

Choi, E.Y., Park, S.Y., Cho, Y.O., 2011. Freeze-dried instant coffee can promote the activities of antioxidant enzymes and induce weight loss but also aggravate the plasma cholesterol profile in rats. *Nutrition* 27, 1202-1205.

Choi, J.H., Lou, W., Vancura, A., 1998. A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 273, 29915-29922.

Clifford, M.N., 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1033-1043.

Cooxupé, C., 2014. Produtos. <http://cafescooxupe.com.br/index.html> (accessed 10 de julho 2014).

Costa, V., Moradas-Ferreira, P., 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular aspects of medicine* 22, 217-246.

Cruz, R., Cardoso, M.M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P., Morais, S., Casal, S., 2012. Espresso coffee residues: a valuable source of unextracted compounds. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 7777-7784.

Daglia, M., Papetti, A., Gregotti, C., Berte, F., Gazzani, G., 2000. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *Journal of agricultural and food chemistry* 48, 1449-1454.

Dai, J., Mumper, R.J., 2010a. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15, 7313-7352.

Dai, J., Mumper, R.J., 2010b. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15, 7313-7352.

Dalvi, L.T., 2008. Mecanismos de ação antioxidante de origem vegetal: estudo do polifenol ácido elágico e do extrato de caqui (*Diospyros kaki*). Departamento de Nutrição Humana. Universidade de Brasília, Brasil, p. 143.

de Sa, R.A., de Castro, F.A., Eleutherio, E.C., de Souza, R.M., da Silva, J.F., Pereira, M.D., 2013. Brazilian propolis protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology] 44, 993-1000.

Doris, K.S., Rumsby, E.L., Morgan, B.A., 2012. Oxidative stress responses involve oxidation of a conserved ubiquitin pathway enzyme. *Molecular and cellular biology* 32, 4472-4481.

Drakulic, T., Temple, M.D., Guido, R., Jarolim, S., Breitenbach, M., Attfeld, P.V., Dawes, I.W., 2005. Involvement of oxidative stress response genes in redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 5, 1215-1228.

Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* 82, 47-95.

Erel, O., 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry* 37, 277-285.

Farah, A., Donangelo, C.M., 2006. Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18, 23-36.

Farrugia, G., Balzan, R., 2012. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Frontiers in oncology* 2, 64.

Ferk, F., Huber, W.W., Grasl-Kraupp, B., Speer, K., Buchmann, S., Bohacek, R., Mišik, M., Edelbauer, L., Knasmüller, S., 2014. Protective effects of coffee against induction of DNA damage and pre-neoplastic foci by aflatoxin B1. *Molecular Nutrition & Food Research* 58, 229-238.

Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* 43, 61-68.

Flattery-O'Brien, J.A., Dawes, I.W., 1998. Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function. *The Journal of biological chemistry* 273, 8564-8571.

Fong, C.S., Temple, M.D., Alic, N., Chiu, J., Durchdewald, M., Thorpe, G.W., Higgins, V.J., Dawes, I.W., 2008. Oxidant-induced cell-cycle delay in *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of the SWI6 transcription factor. *FEMS yeast research* 8, 386-399.

Forbes-Hernandez, T.Y., Giampieri, F., Gasparri, M., Mazzoni, L., Quiles, J.L., Alvarez-Suarez, J.M., Battino, M., 2014. The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 68C, 154-182.

Frei, B., Higdon, J.V., 2003. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *The Journal of nutrition* 133, 3275S-3284S.

Gandhi, S., Abramov, A.Y., 2012. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012, 428010.

Green, K., Brand, M.D., Murphy, M.P., 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1, S110-118.

Gutteridge, J.M., Halliwell, B., 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and biophysical research communications* 393, 561-564.

Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* 141, 312-322.

Halliwell, B., Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology* 142, 231-255.

Halliwell, B.G., M. C., 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University press, Londres.

Hermes-Lima, M., 2005. *Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. Functional Metabolism*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 319-368.

Huber, W.W., Teitel, C.H., Coles, B.F., King, R.S., Wiese, F.W., Kaderlik, K.R., Casciano, D.A., Shaddock, J.G., Mulder, G.J., Ilett, K.F., Kadlubar, F.F., 2004. Potential chemoprotective effects of the coffee components kahweol and cafestol palmitates via modification of hepatic N-acetyltransferase and glutathione S-transferase activities. *Environmental and molecular mutagenesis* 44, 265-276.

Jeong, J.H., Jeong, H.R., Jo, Y.N., Kim, H.J., Lee, U., Heo, H.J., 2013. Antioxidant and neuronal cell protective effects of columbia arabica coffee with different roasting conditions. *Preventive nutrition and food science* 18, 30-37.

Kalyanaraman, B., 2013. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox biology* 1, 244-257.

Kanta, J., 2011. The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *Acta medica* 54, 97-101.

Kennedy, K.A., Sandiford, S.D., Skerjanc, I.S., Li, S.S., 2012. Reactive oxygen species and the neuronal fate. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 215-221.

Kim, G., Weiss, S.J., Levine, R.L., 2014. Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1840, 901-905.

Kohen, R., Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology* 30, 620-650.

Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* 47, 333-343.

Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M., 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* 125, 288-306.

Lima, A.R., Pereira, R.G.F.A., Abrahão, S.A., Duarte, S.M.d.S., Paula, F.B.d.A., 2010. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. *Química Nova* 33, 20-24.

- Longo, V.D., Gralla, E.B., Valentine, J.S., 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *The Journal of biological chemistry* 271, 12275-12280.
- Lu, J., Holmgren, A., 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine* 66, 75-87.
- Ludwig, I.A., Clifford, M.N., Lean, M.E., Ashihara, H., Crozier, A., 2014. Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food & function*.
- Lushchak, V.I., 2010. Oxidative stress in yeast. *Biochemistry Moscow* 75, 281-296.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79, 727-747.
- Martorell, P., Forment, J.V., de Llanos, R., Monton, F., Llopis, S., Gonzalez, N., Genoves, S., Cienfuegos, E., Monzo, H., Ramon, D., 2011. Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 2077-2085.
- Migdal, C., Serres, M., 2011. [Reactive oxygen species and oxidative stress]. *Medecine sciences : M/S* 27, 405-412.
- Mills, C.E., Oruna-Concha, M.J., Mottram, D.S., Gibson, G.R., Spencer, J.P., 2013. The effect of processing on chlorogenic acid content of commercially available coffee. *Food Chem* 141, 3335-3340.
- Monteiro, M.C., Trugo, L.C., 2005. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Química Nova* 28, 637-641.
- Moreira, I., Scheel, G.L., Hatumura, P.H., Scarminio, I.S., 2014. Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *Coffea arabica*. *Química Nova* 37, 39-43.
- Mussatto, S.I., Ballesteros, L.F., Martins, S., Teixeira, J.A., 2011. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology* 83, 173-179.
- Nam, T.G., 2011. Lipid peroxidation and its toxicological implications. *Toxicological research* 27, 1-6.
- Padurariu, M., Ciobica, A., Lefter, R., Serban, I.L., Stefanescu, C., Chirita, R., 2013. The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Psychiatria Danubina* 25, 401-409.
- Pamplona, R., Costantini, D., 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 301, R843-863.

- Perrone, D., Farah, A., Donangelo, C.M., 2012. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 4265-4275.
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science : IJBS* 4, 89-96.
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513-523.
- Pryor, W.A., 1970. *Introdução ao estudo dos radicais livres*. Edgard Blucher LTDA, São Paulo.
- Raha, S., Robinson, B.H., 2001. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *American journal of medical genetics* 106, 62-70.
- Ranheim, T., Halvorsen, B., 2005. Coffee consumption and human health--beneficial or detrimental?--Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Mol Nutr Food Res* 49, 274-284.
- Raza, H., 2011. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *The FEBS journal* 278, 4243-4251.
- Ricci, M.S.F.N., M. C. P.; Nannetti, A. N.; Moreira, C. F.; Aguiar-Menezes, E. L.; Silva, E.; Caixeta, I. F.; Araújo, J. B. S.; Leal, M. A. A.; Fernandes, M. C.; Almeida, P. S.; Pedini, S., 2006. *Cultivo do café orgânico*. Embrapa Agrobiologia, Brasil, p. Sistemas de Produção.
- Roesler, R., Malta, L.G., Carrasco, L.C., Holanda, R.B., Sousa, C.A.S., Pastore, G.M., 2007. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Food Science and Technology (Campinas)* 27, 53-60.
- Saeidnia, S., Abdollahi, M., 2013. Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer: the debate of the century. *Toxicology and applied pharmacology* 271, 49-63.
- Serrazul, C., 2014. Processo produtivo. <http://www.cafeserrazul.com.br/processo-produtivo/> (accessed 19 de abril 2014).
- Souza, J.N.S., Silva, E.M., Loir, A., Rees, J.-F., Rogez, H., Larondelle, Y., 2008. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. *Food Chemistry* 106, 331-339.
- Tapas, A., Sakarkar, D., Kakde, R., 2008. Flavonoids as nutraceuticals: A review. *Trop J Pharm Res.* 7, 1089-1099.
- Tavares, L., Figueira, I., McDougall, G.J., Vieira, H.L., Stewart, D., Alves, P.M., Ferreira, R.B., Santos, C.N., 2013. Neuroprotective effects of digested polyphenols from wild blackberry species. *European journal of nutrition* 52, 225-236.

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* 160, 1-40.
- Verzelloni, E., Tagliazucchi, D., Del Rio, D., Calani, L., Conte, A., 2011. Antiglycative and antioxidative properties of coffee fractions. *Food Chemistry* 124, 1430-1435.
- Veskoukis, A.S., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D., 2012. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell stress & chaperones* 17, 11-21.
- Vicente, S.J., Ishimoto, E.Y., Cruz, R.J., Pereira, C.D., Torres, E.A., 2011. Increase of the activity of phase II antioxidant enzymes in rats after a single dose of coffee. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 10887-10892.
- Vicente, S.J.V., Ishimoto, E.Y., Torres, E.A.F.S., 2013. Coffee Modulates Transcription Factor Nrf2 and Highly Increases the Activity of Antioxidant Enzymes in Rats. *Journal of agricultural and food chemistry* 62, 116-122.
- Volz, N., Boettler, U., Winkler, S., Teller, N., Schwarz, C., Bakuradze, T., Eisenbrand, G., Haupt, L., Griffiths, L.R., Stiebitz, H., Bytof, G., Lantz, I., Lang, R., Hofmann, T., Somoza, V., Marko, D., 2012. Effect of Coffee Combining Green Coffee Bean Constituents with Typical Roasting Products on the Nrf2/ARE Pathway in Vitro and in Vivo. *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 9631-9641.
- Weng, C.J., Yen, G.C., 2012. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer treatment reviews* 38, 76-87.
- Winyard, P.G., Moody, C.J., Jacob, C., 2005. Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends in biochemical sciences* 30, 453-461.
- Wu, M.J., O'Doherty, P.J., Fernandez, H.R., Lyons, V., Rogers, P.J., Dawes, I.W., Higgins, V.J., 2011. An antioxidant screening assay based on oxidant-induced growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 11, 379-387.
- Xu, B.J., Chang, S.K., 2007. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci* 72, S159-166.
- Yan, M.H., Wang, X., Zhu, X., 2013. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine* 62, 90-101.
- Young, I.S., Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology* 54, 176-186.