

# 1 INTRODUÇÃO

Originário da Abssínia (atual Etiópia), ao longo de centenas de anos, o café conquistou o paladar de inúmeros povos, de diversas regiões do planeta. Hoje, é considerada uma bebida universal, fazendo parte da cultura, dos costumes e do dia-a-dia, principalmente do povo brasileiro.

O Brasil, por ser um país privilegiado, de terras férteis e clima ameno é o único país do mundo a produzir diversificados grãos de café que, combinados em proporções precisas, propiciam infinitas variedades de sabor e aroma. Além do prazer proporcionado por sua degustação, o café possui importantes componentes para o ser humano.

Após anos de pesquisas sobre o café, diversos trabalhos publicados mostraram que a humanidade adotou o café como bebida matinal porque seu consumo diário torna o cérebro mais atento e capaz para suas atividades intelectuais. Além disso, diminui a incidência de apatia e depressão, estimula a memória, a atenção e a concentração e pode ajudar a prevenir o consumo de drogas e do álcool (Lima, 2002).

O componente mais conhecido e valorizado do café é a cafeína, responsável pelo estímulo do sistema nervoso central. Entretanto, outros compostos presentes no café têm despertado o interesse de diversos pesquisadores devido às suas funções biológicas. Nesses casos, os polifenóis, como os ácidos clorogênicos ou seus derivados, parecem desempenhar papel relevante. Todos apresentam intensa atividade antioxidante, *in vitro*, com possível papel na neutralização de radicais livres.

O interesse pela descoberta de novos e seguros antioxidantes de fontes naturais tem aumentado, principalmente para prevenir o dano oxidativo às células vivas. Os usos de antioxidantes sintéticos tem diminuído devido à

suspeita de atividade como promotores de carcinogênese. O papel de antioxidantes dietéticos e seus benefícios para a saúde têm atraído grande atenção nos últimos anos, especialmente aqueles extraídos de plantas e este assunto coloca-se como um dos mais significativos em termos de prioridade de pesquisa. Este interesse não tem sido somente na descoberta de novas moléculas biologicamente ativas para a indústria farmacêutica, mas também para incentivar a comercialização destes produtos no país e no exterior.

Estudos têm demonstrado que o café apresenta atividade antioxidante e anti-mutagênica. Porém, há ainda controvérsias. Parte desta controvérsia pode ser atribuída à falta de padronização de técnicas experimentais e dos diversos componentes do café estudados, bem como dos diferentes tipos de processamento, torração e preparo da bebida. Além disso, a maioria dos estudos foi realizada *in vitro* e estes são de natureza simplificada para verificação de sua ação e a extrapolação para o organismo humano, com toda a sua complexidade e com numerosos processos ocorrendo simultaneamente, deve ser feita com muito cuidado. Sem dúvida, estudos *in vivo* são de grande interesse para ajudar na elucidação da ação da bebida do café.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo geral verificar a existência de atividade antioxidante e antimutagênica na bebida do café *in vitro* e *in vivo*. Este estudo trará contribuição significativa para o esclarecimento do potencial benéfico ou tóxico do café para mamíferos. Isto é muito importante para a segurança do consumo humano já que o café é amplamente consumido por todas as classes sociais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Produção e consumo do café no mundo

Os maiores produtores mundiais de café são Brasil, Colômbia, México e Guatemala com plantações de café arábica (*Coffea arabica* L.), e Indonésia, Vietnã, Costa do Marfim, Índia, Uganda e Etiópia, onde predomina o plantio do café robusta (*Coffea canephora* Pierre). No final da década de 1970, a área cultivada com café no mundo era de 10 milhões de hectares, evoluindo para 13,5 milhões de hectares no final dos anos 1980, quando começou a diminuir. Hoje, situa-se em torno de 11,5 milhões de hectares. A produção mundial de café, em 2003/04, foi de 102.477 milhões de sacas de 60 kg e o Brasil, o maior produtor, contribuiu com 28.460 milhões de sacas (28% da produção mundial) (Silva, 2004).

O consumo mundial de café em 2003 foi de 111.543 milhões de sacas/ano, das quais cerca de 83.885 milhões de sacas/ano correspondem aos países importadores e 27.658 milhões de sacas/ano ao consumo doméstico dos países produtores (Silva, 2004). De acordo com o ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Roberto Rodrigues, pela primeira vez, em muitos anos, a produção de café no mundo foi inferior à demanda (Netcomex, 2004).

Os países ricos consomem mais café do que aqueles com renda menor. Ocorre também um maior consumo naqueles países com baixas temperaturas, como as do norte da Europa. Os EUA, com uma demanda anual de 18 milhões de sacas de 60 kg, destacam-se como o maior consumidor, contudo, o consumo per capita é de apenas 4,01 kg/hab/ano. Na Alemanha e na França, grandes consumidores, o consumo *per capita* é de 7,6 e 5,7 kg/hab/ano, respectivamente (IAPAR, 2002).

O Brasil, cuja produção chega a representar aproximadamente 30% do

que é produzido no mundo, o consumo *per capita* está em torno de 3,7 kg/hab/ano, pequeno quando comparado com o de alguns países europeus, porém em volume anual, algo perto de 11,4 milhões de sacas, ficando apenas atrás dos EUA e Alemanha (IAPAR, 2002). Porém, de acordo com Vilmondes Olegário da Silva, Diretor do Departamento do Café/Secretaria de Produção e Comercialização, nos últimos dez anos, o consumo interno de café no Brasil aumentou e hoje é a segunda bebida mais consumida no país (Silva, 2004).

## **2.2 O café no Brasil**

As primeiras mudas e sementes de café chegaram ao Brasil no século XVIII, por volta de 1730, vindas da América Central e Guiana. Mas, só a partir do início do século XIX a cultura despertou o interesse dos grandes proprietários. Tornou-se rapidamente a principal atividade agrícola do país, responsável por mais da metade das divisas oriundas das exportações brasileiras. Essa importância econômica fez dos "Barões do Café" de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais o centro da elite do Império e da República, até quase a metade do século XX (IAPAR, 2002).

Nas décadas de 1960, 70 e 80, o Brasil exportou entre 15 e 18 milhões de sacas de café por ano, com uma participação de 27% do volume exportado mundialmente. Na década de 1990, as exportações brasileiras ficaram no mesmo patamar, porém, a participação no mercado mundial caiu, situando-se em 20% das exportações mundiais de café, as quais representam cerca de 78 milhões de sacas/ano (IAPAR, 2002).

Nos últimos dez anos, o Brasil colheu, em média, cerca de 27 milhões de sacas de 60 kg por ano. Minas Gerais é o maior estado produtor do país, produzindo cerca de 43% do café brasileiro. Esta produção está concentrada principalmente no sul do estado, mas, nos últimos anos, também o cerrado mineiro vem se destacando, com a cafeicultura irrigada. Em segundo lugar, vem

o Espírito Santo, com 17% (maior produtor de café robusta), seguido por São Paulo (16%), com destaque para a região mogiana e oeste. Juntos, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Paraná, produzem 83% do café brasileiro. Bahia e Rondônia também vêm se destacando na produção de café (Silva, 2004).

### **2.3 Descrição e classificação botânica do café**

A planta de café pertence à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*. As espécies de maior importância econômica são *Coffea arabica* L., responsável por cerca de 70% da produção mundial de café e *Coffea canephora* Pierre (robusta) (Smith, 1985).

O cafeeiro é uma planta perene, dicotiledônea, de porte arbustivo ou arbóreo, de caule lenhoso, folhas persistentes e flores hermafroditas. O café arábica tem a altura média de 3 a 5 metros, podendo chegar a 10 metros. Seu tronco tem de 8 a 10 centímetros de diâmetro e suas raízes podem chegar a até 1,5m de profundidade. As flores têm fragância de jasmim e seus frutos vão do verde ao vermelho, passando pelo amarelo (Smith, 1985).

O café arábica é de grande significado econômico para as regiões que a cultivam, especialmente nas Américas, uma vez que seu produto é de qualidade superior (aroma e sabor mais apreciados no mundo inteiro) e de maior aceitação em todos os mercados consumidores do que o robusta (Martín et al., 1998).

### **2.4 Composição química**

O café cru, o café torrado e a bebida dele preparada possuem uma composição muito complexa, com centenas de substâncias químicas que ocorrem naturalmente ou induzidas pelo processo de torração (Belitz & Grosh, 1999).

A composição do café depende da espécie e variedade, das condições ambientais do cultivo e dos métodos de processamento e armazenamento. Os

procedimentos tecnológicos para o preparo e tratamento industrial dos grãos crus, assim como o modo de preparar a bebida podem modificar o tipo e a concentração dos seus componentes. Além disso, não existe um consenso sobre a exata composição do café, devido a diferentes procedimentos analíticos utilizados (Nehlig & Debry, 1994).

Observa-se uma variação da composição química entre as espécies arábica e robusta, conforme indicado na Tabela 1. A maioria dos cafés disponíveis comercialmente consiste de grãos de café arábica, robusta ou uma mistura destes em concentrações variáveis (blends). Embora não esteja totalmente comprovado do ponto de vista químico, atribui-se melhor qualidade sensorial ao café arábica, em comparação ao robusta (Clarke & Macrae, 1985).

Além dos vários constituintes listados na Tabela 1, o café pode conter contaminantes de origem exógena ou endógena. Contaminantes exógenos são, principalmente pesticidas e micotoxinas. Pesticidas são usados para proteger o cafeeiro contra parasitas, são destruídos pela torração e são totalmente ausentes no café. Micotoxinas podem aparecer durante o processamento e ou armazenamento do café em condições impróprias, porém ainda não foi confirmada sua destruição durante a torração (Hasan, 1999). A parafina também pode contaminar o café durante a estocagem em sacos de juta (Nehlig & Debry, 1994).

Contaminantes endógenos são formados durante os vários procedimentos de preparação e torração de café. Entre eles, estão os hidrocarbonetos policíclicos, as aminas heterocíclicas, as nitrosaminas e outras poucas substâncias. Radicais livres têm sido encontrados em cafés e peróxido de hidrogênio pode ser gerado pela oxigenação do café durante a preparação (Nehlig & Debry, 1994).

Durante o processamento tecnológico do café cru, diversas transformações químicas ocorrem, principalmente devido às altas temperaturas

utilizadas na torração. Os componentes presentes no café cru são precursores dos componentes integrantes do sabor e aroma da bebida. A trigonelina, presente em torno de 1% no grão cru, sofre desmetilação na torração para formar a niacina, uma vitamina do complexo B, em quantidades que podem aproximar-se de 20mg%, dependendo do grau de torração. Por outro lado, diversos componentes voláteis, como piridinas e pirróis são também formados (Viani & Horman 1974).

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

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

Fonte: (Raghavan & Ramalakshmi, 1998; Illy & Viani, 1995).

\* Valores relativos devido à perda de outros compostos.

Os açúcares livres sofrem transformações drásticas durante o processo de torração. A sacarose, que é o principal açúcar livre do café cru, pode ser totalmente degradada se o grau de torração for intenso. O processo de caramelização, que envolve a degradação da sacarose é responsável pela formação de diversos furanos e ciclotenos que participarão ativamente na formação do *flavor* (Clarke & Macrae, 1985; Trugo & Macrae, 1982).

Entre os macroconstituintes presentes no café cru, como proteínas, polissacarídeos e lipídeos, as proteínas são as mais suscetíveis ao processamento tecnológico, exercendo papel importante na geração de pigmentos, durante a torração, pela reação de Maillard e originando também compostos voláteis importantes para o *flavor*, como os pirróis, alquil-furanos, pirazinas e alquil-pirazinas, principalmente a partir de hidróxi-aminoácidos. Os polissacarídeos também contribuem em menor intensidade, participando da reação de Maillard através de seus resíduos de monossacarídeos, como também na formação de alquil-furanos (Trugo, 2001).

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é uma substância presente em uma ampla variedade de bebidas, das quais se destaca o café. Ela é desmetilada por enzimas do citocromo hepático P-4501A2 a 1,7-dimetilxantina e, em menor extensão, a 3,7-dimetilxantina e 1,3-dimetilxantina em humanos. Após esta fase, as moléculas formadas de 1,7-dimetilxantina sofrem nova desmetilação, resultando em 1-metilxantina e 1-ácido metilúrico, que são os principais metabólitos da cafeína (Trugo, 2001). A cafeína é a principal purina na composição do café e se encontra na polpa e no endosperma, no citoplasma do grão e ligada à parede celular. É o componente mais conhecido, tanto científica como popularmente, devido às suas propriedades fisiológicas e farmacológicas.

Nehlig (1999) demonstrou que a concentração de cafeína em um copo de café varia de acordo com os diferentes tipos de preparo da bebida. O hábito de ferver o pó junto com a água aumenta o teor de cafeína, para a mesma



quantidade de café consumida (Bell et al., 1996; Camargo & Toledo, 1998). Uma xícara, normalmente preparada, do café torrado e moído, contém entre 60 a 80 mg de cafeína. Considerando que a dose farmacológica está em torno de 200 mg seriam necessárias três xícaras para se observar algum efeito fisiológico notável, como estimulante (Graham, 1978). Dos diversos efeitos atribuídos à cafeína, alguns já apresentam comprovação científica, como o efeito estimulante do sistema nervoso central, na diminuição do sono e como estimulante do músculo cardíaco (Nehlig, 1999). A cafeína é um dos compostos mais estáveis durante a torração, apresentando pequenas perdas percentuais que geralmente não ultrapassam 5%. O café robusta apresenta teores mais elevados de cafeína em relação ao arábica (Trugo, 2001).

Os polifenóis do café compreendem um grupo heterogêneo de substâncias, umas com estruturas químicas relativamente simples e outras complexas, como taninos e ligninas, contribuindo de maneira significativa para o sabor e o aroma da bebida. Existem indícios da ocorrência da maior concentração de polifenóis em cafés de pior qualidade, no entanto, não existem valores fixos para esta variável que permitam considerar um café como de pior ou melhor qualidade (Pimenta, 1995). Os polifenóis presentes no café exercem ação protetora e antioxidante, que podem ser perdidas quando os grãos são expostos a condições adversas, como colheita inadequada, problemas no processamento e armazenamento (Pimenta & Vilela, 2001). Segundo Meneses (1994) os polifenóis são gradualmente decompostos durante a torração, com formação de voláteis do aroma, materiais poliméricos (melanoidinas) e liberação de CO<sub>2</sub>.

Dos polifenóis, os chamados ácidos clorogênicos são considerados os mais importantes e são os que se apresentam em maior quantidade. O termo ácido clorogênico (CQA) foi originalmente atribuído ao éster do ácido caféico com ácido quínico. Posteriormente, verificou-se que existiam três isômeros

relevantes, nas posições 3, 4 e 5, sendo o 5-cafeoilquínico o mais abundante. Além dos ácidos cafeoilquínicos, estão presentes, em quantidades consideráveis, os isômeros do ácido feruloilquínico e do di-cafeoilquínico. Todos estes ácidos apresentam um importante papel na formação de pigmentos, aroma e sabor da bebida de café (Clifford & Wight, 1976; Moreira et al., 2001).

Alguns estudos têm indicado uma relação entre a composição da fração CQA e a qualidade do grão de café ou da bebida (Trugo, 2001). O café é a principal origem de ácido clorogênico na dieta humana (Clifford, 1999), mas o conteúdo de ácidos clorogênicos na bebida de café é dependente da espécie, da variedade e das condições de processamento do grão (Clifford & Wight, 1976). O café robusta, por exemplo, apresenta maiores concentrações de ácido clorogênico que o café arábica.

Existem alguns estudos relacionando, inversamente, o nível de CQA com a qualidade da bebida e atributos sensoriais específicos, como adstringência (Trugo & Macrae, 1984a; Clifford & Ohiokpehai, 1983). Do total de ácido clorogênico no café, o ácido cafeoilquínico total representa cerca de 80% e o 5-cafeoilquínico, 60%. Durante o processo de torração, esses compostos fenólicos são intensamente degradados, originando pigmentos e componentes voláteis do aroma, como fenol, catecol, vinil-catecol, entre outros (Dart & Nursten, 1985). O processo de torração provoca um declínio gradual dos ácidos clorogênicos, de modo que em uma torração muito intensa, pode ocorrer perda superior a 90% das quantidades originais (Trugo et al., 1983). Em café arábica, a concentração do 5-CQA reduziu continuamente após a torração, enquanto 3-CQA, aumentou, segundo Trugo & Macrae (1984b).

O conteúdo de sólidos solúveis é de grande importância para a qualidade da bebida e para o rendimento industrial, havendo uma variação no teor de sólidos entre diferentes espécies e cultivares, o grau de torração e o tipo de moagem (Lopes, 2000). Pimenta (2001) verificou baixos teores de sólidos

solúveis totais em cafés colhidos no estágio verde, enquanto Garruti et al. (1962) não encontraram diferenças significativas no teor de sólidos solúveis em amostras de diferentes bebidas. Utilizando café para consumo, Castano et al. (2000) verificaram que, à medida que o grau de torração se eleva, o rendimento e o teor de sólidos solúveis são também aumentados, enquanto Sabbagh & Yokomizo (1976), estudando o teor de sólidos solúveis em café torrado, verificaram uma diminuição nestes teores com a torração. Trugo et al. (2004) não encontraram alterações no conteúdo de sólidos solúveis em bebidas de café, com diferentes graus de torração, preparadas usando filtro de papel, mas, quando analisaram a bebida extraída em filtro de pano, constataram uma redução na concentração de sólidos solúveis com a torração.

Recentemente, os compostos presentes no café têm despertado interesse de diversos pesquisadores, devido às suas funções biológicas. Nesses casos, polifenóis, classificáveis no grupo dos chamados ácidos clorogênicos, ou seus derivados, parecem desempenhar papel relevante. Todos apresentam intensa atividade antioxidante que, por si só, já desfruta de relevância na neutralização de radicais livres. A potente atividade de ligação a centros opióides do cérebro, verificada no café solúvel, pode ser devido à ação de uma lactona do ácido fenililquinico (Boublik et al., 1983; Wynne et al., 1987). Esta atividade causa bloqueio do desejo de autogratificação, que leva o indivíduo insatisfeito a se deprimir e a consumir drogas, como o álcool (Lima, 2002).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado fortes correlações entre o consumo de café e a diminuição de incidência de cálculo vesicular (Leitzmann et al., 1999), níveis plasmáticos de ácido úrico (Kiyohara et al., 1999) e decréscimo na incidência de suicídio (Kawachi et al., 1996). Tendo em vista que, há alguns anos, o café era considerado por alguns como prejudicial à saúde, verifica-se atualmente a existência de embasamento científico suficiente para a discussão da sua potencialidade funcional. Talvez esse fato demonstre, na verdade, que todo

alimento é potencialmente funcional, dependendo somente de novas descobertas científicas e que, talvez, mais relevante do que a classificação de alimentos como "funcionais", seja o claro estabelecimento das propriedades funcionais de seus componentes (Trugo, 2001).

## 2.5 Vias de preparo

Existem duas vias de preparo do café cru, a via úmida e a via seca que usa ou não água, respectivamente (Clarke & Macrae, 1985).

Os cafés naturais são obtidos por meio do processo via seca. Este é o processo mais antigo e mais simples para separar o grão de café das suas camadas protetoras, sendo o mais usado no Brasil. Na via seca os frutos inteiros são postos para secar ao sol e ou em secadores a até 11%-13% de umidade. Antes da secagem, o café deve ser submetido à lavagem visando eliminar impurezas e separará-lo, segundo sua densidade, em bóias, com densidade menor e verdes e cerejas, com densidade maior, conseguindo-se um café com secagem mais uniforme (Clarke, 1987).

A via úmida é um processo mais sofisticado e que, normalmente, produz um café de melhor qualidade, por permitir a utilização de frutos cereja, além de reduzir o tempo de secagem pela retirada da polpa o que, provavelmente, evita a ocorrência de fermentações indesejáveis se o processo for bem conduzido.

O processamento por via úmida envolve a obtenção de três tipos de café: o despulpado, o desmucilado e o descascado. O despulpamento consiste na retirada da casca do fruto maduro por meio de um descascador mecânico, a retirada da mucilagem por fermentação seguida da lavagem dos grãos.

Na obtenção do café desmucilado, a polpa e a mucilagem são totalmente removidas por meio de desmuciladores mecânicos. A presença de corpo e aroma é menos pronunciada, nestes cafés (Brando, 1999).

O café descascado constitui-se em um tipo de preparo por via úmida,

embora Illy & Viani (1995) o considerem como resultado de um processo intermediário entre a via seca e úmida. O café é despulpado, mas não desmucilado e omite-se a etapa de fermentação. Com a manutenção da mucilagem, permite-se que sejam transmitidas características desejáveis dessas para os grãos, sendo um método de preparo que atende às exigências de alguns compradores e consumidores. Para a obtenção do café cereja descascado, após lavagem, a porção formada pelos frutos verdes e cerejas é conduzida a um descascador para remoção da casca e parte da polpa do fruto cereja, separando-o, assim, do fruto verde. A secagem inicial do cereja descascado deve ser feita ao sol, em camadas removidas com frequência, até que a mucilagem seque e a secagem continue de maneira convencional, ao sol ou em secadores. Com a exigência inicial de secagem ao sol, este sistema é indicado somente para regiões onde o clima é seco durante a colheita, pois a umidade excessiva poderá ocasionar uma fermentação incontrolável (Illy & Viani, 1995).

Entre os produtores observa-se uma opção recente pelo cereja descascado, o que se deve tanto à redução do seu volume, diminuindo assim a área ocupada no terreiro e aumentando a capacidade do secador, como também à redução dos custos de processamento e de secagem. Além disso, preserva melhor a qualidade e mantém as características típicas de corpo, de aroma e de doçura dos cafés brasileiros (Brando, 1999).

## **2.6 Torração e alterações do café**

O café, para ser consumido, necessita obrigatoriamente ser torrado. Esta fase é determinante da característica final da bebida, pois o grau de torração evidencia e ou esconde inúmeras propriedades do grão. Durante a torração, os grãos são aquecidos a 200-240°C por 10-25 minutos, dependendo do tipo de torrador e do grau de torração requerido, o que causa mudanças químicas e físicas marcantes no grão do café (Illy & Viani, 1995 ).

A mudança física mais evidente que ocorre durante a torração é a mudança de cor verde-cana no grão cru para, geralmente, marrom ou mesmo preto no grão torrado. Mudanças na cor durante a torração ocorrem ao mesmo tempo em que há diminuição de peso e inchamento dos grãos de café. Um dos parâmetros usados para a determinação da cor do café torrado, para efeito de comparação, é a análise de cor pelos parâmetros  $L^*a^*b^*$ . Os parâmetros  $L^*a^*b^*$  são atualmente os mais utilizados para localizar um espaço bem definido de cor. Neste espaço de cor,  $L^*$  indica luminosidade e  $a^*$  e  $b^*$  indicam direções de cor:  $+a^*$  corresponde à direção vermelha,  $-a^*$  é a direção verde,  $+b^*$  é a direção amarela e  $-b^*$  é a direção azul.

Além disso, o grau de torração também provoca importantes mudanças químicas que afetam as propriedades organolépticas da mistura torrada. Como o nível da torração aumenta do claro para o escuro, a bebida mostra um notável aumento no pH (Da Porto et al., 1991). Pequenas mudanças no pH alteram o grau de ionização de compostos ácidos com consideráveis mudanças no aroma e sabor da bebida. Além disso, a acidez do café pode ser afetada por muitos fatores incluindo espécie, tipo de processamento, idade do grão verde, grau de torração e o tempo de armazenamento do café (Illy & Viani, 1995). De acordo com Woodman et al. (1967), durante a torração há um decréscimo no conteúdo de ácidos voláteis.

As mudanças citadas acima ocorrem, principalmente, devido às reações pirólíticas, entre elas, a reação de Maillard, que ocorre durante o processo de torração (Illy & Viani, 1995). Estudos demonstraram que, além da influência sobre a cor, aroma e sabor, os produtos da reação de Maillard conferem a habilidade de afetar a estabilidade oxidativa de muitos alimentos processados e de desempenhar um importante papel como fator protetor da saúde, parecendo suprir o corpo humano com proteção antioxidante exógena (O'Brien & Morrissey, 1989).

A reação de Maillard envolve aminoácidos livres, peptídeos e proteínas com grupos de aminoácidos livres, os quais reagem com açúcares para formar glicosilaminas, aminoaldoses e ou aminocetoses por condensação. As glicosilaminas rapidamente se rearranjam em aminoaldoses e ou aminocetoses por meio dos rearranjos de Amadori e Heyns. Após reação com outros constituintes do café contendo grupos hidróxi, muitos constituintes do aroma e pigmentos coloridos são formados (Sgarbieri, 1996).

Várias são as fases da Reação de Maillard, passando pelo rearranjo de Amadori, pela degradação de Strecker, finalizando com a conversão de precursores de baixo peso molecular em pigmentos de cor marrom, de alto peso molecular, denominados melanoidinas (Cheftel, 1988).

Segundo Sgarbieri (1996), nutricionalmente, a reação pode acarretar perda de biodisponibilidade de lisina e outros aminoácidos, uma vez que a ligação deste aminoácido com o grupamento carbonila torna as ligações peptídicas, adjacentes ao composto de adição, resistentes à hidrólise pelas enzimas digestivas. Se o tratamento térmico for enérgico, outras reações ocorrerão, com a conseqüente degradação de carboidratos e de outros aminoácidos da proteína. O resultado final é o escurecimento do produto por reação não-enzimática e o acúmulo de certos compostos de degradação, que podem ser tóxicos.

Portanto, as principais implicações da reação de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos são muito diversas e influenciam aspectos químicos, organolépticos, nutricionais, toxicológicos e manifestações *in vivo*. Os aspectos químicos estão relacionados com o mecanismo da reação, com o isolamento e identificação dos produtos intermediários e com a estrutura e propriedades dos produtos finais (melanoidinas). Os aspectos organolépticos dizem respeito ao desenvolvimento de aromas e sabores, à modificação de propriedades físico-químicas e ao fenômeno de escurecimento. Os aspectos nutricionais consideram,

essencialmente, a perda de aminoácidos (lisina, arginina, entre outros) e de valor nutritivo das fontes de proteína. Os aspectos toxicológicos estão estreitamente relacionados com a formação de mutagênicos e de antimutagênicos. Finalmente, as manifestações dos produtos da reação de Maillard *in vivo* estão diretamente relacionadas com o envelhecimento (Sgarbieri, 1996).

## 2.7 Moagem

A moagem é uma etapa crítica na preparação do café para a obtenção da bebida. O principal objetivo deste processo é aumentar a superfície de extração ou, melhor, aumentar a extensão da interface entre água e café, para facilitar a transferência de substâncias solúveis e emulsificáveis para a bebida (Andueza et al., 2003). A granulometria também pode ser relevante para extração de sólidos totais, relacionando-se também com a composição química e definindo de forma direta o rendimento do produto (Trugo et al., 2004).

Andueza et al. (2003) verificaram que a extração de sólidos e compostos solúveis, como trigonelina, lipídios e ácido clorogênico, aumentou inversamente com o tamanho da partícula. O conteúdo de cafeína aumentou significativamente com a diminuição do tamanho da partícula.

O processo de moagem é influenciado por fatores como a espécie do grão de café, umidade e grau de torração. Espécies e variedades de cafés de diferentes países e de diferentes tipos de processamento levam a uma heterogeneidade na dureza do grão (Illy & Viani, 1995). Se grande quantidade de calor é gerada durante o processo de moagem, ocorrerá perda de compostos voláteis imprescindíveis na composição do aroma da bebida e outros produtos, podendo influenciar na qualidade dos produtos finais. É provável que a extratividade e a velocidade de fluxo durante o preparo da bebida estejam conjugadas ao tamanho médio das partículas produzidas no processo de moagem (Cappuccio et al., 1999). Clarke et al. (1987) relataram que, na bebida de café,



quando o grau de moagem é mais fino, a extração de solúveis e compostos voláteis é mais alta.

## 2.8 Preparo da bebida

Após o processo de moagem, o café passa pela etapa do preparo para consumo. O preparo correto vem ganhando importância no mundo inteiro, pois é aqui que todo esforço de produzir um café de boa qualidade culmina.

Existem diferentes formas de se preparar o café. Os métodos e o tamanho dos copos variam conforme a tradição de cada país e o café pode ser filtrado, percolado, fervido, preparado como expresso, tipo turco e solúvel (Nehlig & Debry, 1994). Geralmente, o tamanho dos copos varia entre 30 a 190 mL, sendo o conteúdo médio de café de 150mL por copo (Nehlig, 1999).

Estudos têm demonstrado que as diferentes etapas e técnicas utilizadas no preparo de um café podem produzir variação no teor de algumas substâncias, tais como os ácidos clorogênicos, cafeol, cafestol, melanoidinas e cafeína contidas no mesmo, assim como conferir maior ou menor atividade antioxidante e antimutagênica, atuando diretamente na proteção de estruturas biológicas (O'Brien & Morrissey, 1989).

## 2.9 Oxidações biológicas

O oxigênio é reduzido a água na cadeia respiratória. Porém, a redução parcial forma produtos altamente reativos, responsáveis por sua toxicidade (Gouvêa, 2004). → plausível no contexto

O termo “espécies reativas de oxigênio” (EROs) é um termo que abrange todas as moléculas contendo oxigênio, altamente reativas e são caracterizadas como radicais livres como: ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peroxila ( $RO_2^{\cdot}$ ), alcóxila ( $RO^{\cdot}$ ), radicais alquil ( $R^{\cdot}$ ), hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e não radicais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ácido hipocloroso ( $HOCl$ ).

Todos são capazes de reagir com os lipídeos da membrana, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outras macromoléculas, resultando em danos celulares (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Entre as reações produtoras de EROs, estão a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, as reações de oxidação catalizadas por desidrogenases e oxidases, a redução do oxigênio catalisada pela NADPH-oxidase durante a fagocitose, as reações de síntese de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos e as reações de biotransformação de xenobióticos. Fatores físicos que incluem raios X, ultra-som e luz ultravioleta também levam à geração de espécies derivadas de oxigênio nas células vivas (Sies, 1986; Halliwell & Gutteridge, 1989).

Segundo Halliwell & Gutteridge (1989), nem o ânion superóxido e nem o peróxido de hidrogênio são muito reativos; porém, a toxicidade de ambos é exacerbada pela presença de metais. Estas espécies tornam-se altamente tóxicas nas células devido à transformação do peróxido de hidrogênio em radical hidroxila, acelerada pela presença de anion superóxido e íons metálicos como  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^+$ . O radical hidroxila pode ser formado pela reação com íon ferroso pela reação de FENTON ou pela reação de superóxido com peróxido de hidrogênio pela reação de HABER-WEISS .

O dano celular causado pelos radicais livres parece contribuir para o envelhecimento e doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, declínio do sistema imune, artrite reumática, doenças inflamatórias, asma e disfunção cerebral (Mancini-Filho, 2001). Mesmo nas moléstias nas quais EROs não são a causa primária da lesão, elas são importantes porque toda destruição celular libera ferro, o qual catalisa a geração de radicais hidroxila (Benzie, 1996).

Devido à sua alta reatividade, o radical hidroxila é um oxidante poderoso e é uma das EROs mais tóxicas, que atua no próprio local onde foi gerado,

combinando-se com a maioria das moléculas orgânicas nas células. Estes radicais hidroxila, atuando sobre lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos e em um fenômeno chamado de estresse oxidativo, levam a modificações da função e estrutura celular que, por sua vez, poderão levar esta célula à morte. Da ação dos radicais hidroxila sobre os ácidos nucleicos decorrem modificações estruturais da molécula do DNA, implicando em mutações gênicas. Entre carboidratos, principalmente em glicosaminoglicanas, são capazes de provocar quebras na estrutura, incorrendo, dentre outras conseqüências, em perda de reconhecimento do contato celular, podendo levar a divisões celulares não limitadas pelo contato com as células vizinhas. Em proteínas, levam à peroxidação protéica, que causa quebra de cadeias polipeptídicas e ou perda ou alteração de atividade enzimática, com conseqüentes alterações funcionais e estruturais da célula. Sobre lipídios resultam no bem estudado fenômeno chamado peroxidação lipídica, que é o principal responsável por alterações da permeabilidade da membrana celular (Benzie, 1996; Gouvêa, 2004).

## **2.10 Peroxidação lipídica**

Freqüentemente, a oxidação dos componentes lipídicos das membranas celulares leva à injúria celular caracterizada pela alteração da fluidez, à modificação estrutural dos sistemas enzimáticos e à destruição das membranas (Halliwell & Gutteridge, 1989). Este processo oxidativo é responsável também pela alteração da permeabilidade e da habilidade para a manutenção do gradiente iônico transmembrana (Rice-Evans et al., 1991).

A oxidação lipídica é constituída de três fases principais: a iniciação, a propagação e a terminação (Sevanian & Hochstein, 1985). As reações de iniciação da oxidação de gorduras podem ser promovidas por dois grupos de fatores: o impacto ou absorção de energia e reações de óxido redução (Slater et al., 1987).

O primeiro grupo de mecanismos está relacionado a condições em que os alimentos ou o organismo humano estão sujeitos a fontes de elevada energia ou radiação ionizante (em alimentos: irradiação; em sistemas biológicos: exposição ocupacional ou acidental), radiação ultravioleta (em alimentos: usada em sanitização; no homem: exposição à luz solar e outras fontes), microondas (em alimentos: cozimento; em sistemas biológicos: exposição acidental ou ocupacional), luz visível com fotossensibilizadores (como as tetraciclinas na fotoperoxidação), e degradação térmica de material orgânico (nos alimentos é a cocção; no homem são as queimaduras decorrentes da exposição). No segundo grupo, ocorrem reações de óxido-redução catalisadas por metais de transição (reações de Fenton/ HaberWeiss) (Kubow, 1992) ou por enzimas, agrupadas em organelas ou isoladas (Rhee, 1988; Donnelly & Robinson, 1995). Tais fatores, capazes de romper a barreira eletroquímica entre o oxigênio e as moléculas de ácido graxo insaturado, constituem iniciadores da oxidação lipídica (Kanner, 1994).

Diversos fatores estão associados à ocorrência da oxidação lipídica em organismos vivos. Assim sendo, além dos fatores acima descritos, o exercício físico intenso, o estresse psicológico, a idade avançada, as infecções/inflamações, a hipertermia/hipotermia, a isquemia/reperfusão, a aterosclerose, o diabetes mellitus, a doença de Parkinson, a catarata, os metais pesados, os poluentes aéreos (ambiente de trabalho ou externo e fumaça de cigarro), os agrotóxicos (DDT, lindane, eldrin, paraquat), as drogas (álcool, anticancerígenos, sulfonamidas, tetraciclinas) e os alimentos (dietas ricas em gordura e pró-oxidantes e pobres em antioxidantes) constituem variáveis relacionadas à gênese da oxidação de gorduras (Duthie, 1993; Kehrer, 1993; Moller et al., 1996). Em relação à dieta, o consumo excessivo de alimentos com elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados, a deficiência de vitamina E, carotenóides, selênio e outros antioxidantes constituem fatores que favorecem a

oxidação lipídica (Slater et al., 1987; Duthie, 1993).

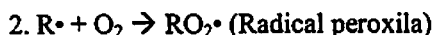
O início da oxidação lipídica decorre da interação de um iniciador com o oxigênio que, uma vez ativado, pode reagir com o ácido graxo insaturado, ocorrendo a retirada de um átomo de hidrogênio do carbono metilênico adjacente à ligação dupla cis do ácido graxo insaturado, resultando na formação de radicais alílicos, segundo a reação (Sevanian & Hochstein, 1985; Kanner, 1994):

Iniciação:

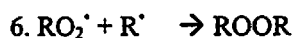
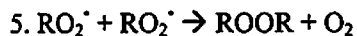


Uma vez iniciada, a reação segue em cadeia e somente termina quando estiverem esgotadas as reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio (Kirk, 1984). Assim sendo, a fase de propagação, que ocorre em seguida, é caracterizada por diversas reações:

Propagação:



As reações de propagação levam à formação de diversos peróxidos, que podem ser mensurados, servindo como índice de oxidação lipídica, seja em alimentos (Gray, 1978) ou mesmo no organismo humano (Halliwell & Chirico, 1993). Todavia, como os peróxidos são instáveis, sua mensuração é limitada às fases iniciais da oxidação lipídica, já que as reações continuam a ocorrer até a fase de terminação (Sevanian & Hochstein, 1985) :



Dessa maneira, com o esgotamento dos substratos, as reações de propagação vão cessando e inicia-se a formação dos produtos finais. Deste

modo, as reações de terminação têm como característica a formação de produtos finais estáveis ou não-reativos. Os radicais alcoxila ( $RO\cdot$ ), que participam de reações de decomposição, também podem sofrer epoxidação, polimerização (reação 5) ou reagir com outros grupos alquila ( $R\cdot$ ) (reação 6), reações químicas representativas da fase de terminação (Kubow, 1992).

Os principais produtos finais da oxidação lipídica compreendem os derivados da decomposição de hidroperóxidos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos. Também são produzidos moléculas derivadas do rearranjo de monoidroperóxidos ou monoidroperóxidos oxidados subsequente (grupo dos 5-peróxidos monocíclicos, hidroperoxi-epidioxidos, di-idroperóxidos, endoperóxidos bicíclicos, entre outros) e produtos de elevado peso molecular resultantes de reações de dimerização (principalmente) e polimerização (reação 7) de grupos C-C, éteres e peróxidos unidos a peróxidos (Esterbauer, 1993). Aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, álcoois e furanas, produtos da oxidação lipídica, geralmente voláteis, também podem ser mensurados em óleos e gorduras, carnes, leite, cerveja, frutas (sucos), especiarias, essências oleosas e outros alimentos (Gray, 1978; Sevanian & Hochstein, 1985; Hwang et al., 1990). Embora produzido em pequena quantidade na maioria dos tecidos, o malonaldeído é o aldeído mais conhecido gerado pela decomposição de hidroperóxidos, podendo ser mensurado e servir como indicador da oxidação lipídica (Sevanian & Hochstein, 1985; Kubow, 1992).

Pelo fato do fenômeno da oxidação lipídica ser importante na ação lesiva do oxigênio e de suas espécies oxidantes estarem em contato com as estruturas biológicas, é, muitas vezes, considerado como antioxidante apenas o composto que impede ou inibe a cadeia de reações da lipoperoxidação. Várias moléculas inibidoras do processo oxidativo foram utilizadas inicialmente para a proteção da borracha, plásticos, combustíveis e depois incorporadas à indústria de

alimentos como importantes aditivos, porém, com uso permitido em baixas e bem definidas concentrações. Os mais importantes são: o butil-hidroxi-anisol (BHA), o butil-hidroxi-toluleno (BHT) e o gaiato de propila (PG) (Halliwell & Gutteridge, 1999).

### **2.11 Avaliação da atividade antioxidante**

Considerando as particularidades e a complexidade do fenômeno de oxidação, no que diz respeito ao substrato oxidável, subdividido, por sua vez, em várias etapas, compreende-se a dificuldade de encontrar um método de avaliação completo, ideal, que permita detectar, na sua totalidade, a capacidade antioxidante de um sistema ou composto químico antioxidante. Tal dificuldade é freqüentemente lembrada por pesquisadores (Smith & Anderson, 1987; Halliwell et al., 1995), em especial, da indústria alimentícia, já que os fenômenos de oxidação de proteínas e, principalmente, de lipídios, podem diminuir em muito a vida útil de alimentos como massas, gorduras, óleos vegetais e produtos cárneos (Frankel et al., 1994), além de ser um fenômeno altamente nocivo às estruturas biológicas, uma vez que as membranas que as constituem apresentam-se como bicamadas de lipídios e proteínas (Halliwell & Gutteridge, 1999).

No que se refere à parte de avaliação do processo oxidativo e, conseqüentemente, da eficácia de compostos antioxidantes, várias metodologias são utilizadas como as revisadas por Aruoma (2003). Entretanto, a dificuldade de se encontrar um método ideal e completo que permita a avaliação de um composto químico quanto à sua capacidade antioxidante, no seu todo ou por completo, é fato constatado pelos especialistas desde o início das pesquisas na área (Halliwell et al., 1995; Frankel et al., 1994). Diante disso, tais pesquisadores propõem, sempre que possível, a realização de um conjunto de métodos de modo que cada um contribua com a elucidação de uma parte do

Os compostos fenólicos parecem ser destruídos com a torração (Daglia et al. 1994), enquanto os produtos da reação de Maillard, com propriedades antioxidantes, são formados (Kroyer et al., 1989; Elizalde et al., 1992). Nicoli et al. (1997a) relataram que, no grau de torração médio, a bebida de café arábica apresentou a mais alta atividade antioxidante *in vitro*. Como sugerido por estes autores, os produtos da reação de Maillard conferem ao café propriedades seqüestrantes de oxigênio e estes produtos são reduzidos ou transformados em compostos com menor capacidade seqüestrante, com o avanço da torração. Castillo et al. (2002) também verificaram o efeito da torração na atividade antioxidante da bebida de café, tendo a menor sido observada com o grau de torração escuro, sendo o claro igual ao médio. Anese & Nicoli (2003) relataram que a atividade antioxidante da bebida de café aumentou com a torração e pode ser influenciada pelas condições de empacotamento. Amostras de café empacotadas a vácuo mantiveram as propriedades redutoras durante o tempo de armazenamento, embora a atividade seqüestrante de radical tenha se alterado, como nas amostras empacotadas na presença de oxigênio.

Borrelli et al. (2002), após separarem as melanoidinas do café claro, médio e escuro por cromatografia de filtração em gel e analisarem por espectrometria de massa, observaram que a quantidade de melanoidina presente no café aumentou com a intensidade do tratamento térmico, enquanto seu peso molecular diminuiu. A atividade anti-radical das melanoidinas diminuiu com a intensidade da torração, mas a capacidade de prevenir a peroxidação do ácido linoléico foi maior em café torrado escuro.

Yamato et al. (2002) verificaram que o café contribuiu para a redução do estresse oxidativo induzido em cérebro de ratos e este efeito pode estar relacionado à cafeína mas não ao ácido clorogênico. Outros estudos indicam que a cafeína age como seqüestrante de radicais gerados pela reação de Fenton (Shi et al., 1991) e inibe a lipoperoxidação em fígado de ratos (Devasagayam et al.,



1996). Chul Lee (2000) demonstraram importante atividade antioxidante, dos produtos do metabolismo da cafeína (1-metilxantina e ácido 1-metil-úrico) *in vitro*, mas não da cafeína. Hasan (1999) atribuiu à cafeína e aos taninos a propriedade antitoxigênica do café e chá.

Alterações séricas, em populações humanas, têm sido relatadas decorrentes do consumo de café. O consumo de café aumentou a concentração de ácido úrico no plasma humano (Natella et al., 2002). Yukawa et al. (2004) relataram redução significativa da oxidação da LDL em estudantes japoneses, após a ingestão de altas doses de café (450mL/kg/dia).

A formação de compostos com atividade pró-oxidante tem sido observada em alimentos e em outros sistemas durante a reação de Maillard (Auroma, 1996). Daglia et al. (1994; 1998) demonstraram que café torrado possui atividade pró-oxidante *in vitro*. Esta atividade depende da espécie de café e do grau de torração. A atividade pró-oxidante do café arábica foi maior que o café robusta porque o café arábica apresentou menor eficiência antioxidante (Andueza et al., 2004).

Muitos compostos fenólicos podem agir como pró-oxidantes (Gutteridge & Xiaio-Chang, 1981; Laughton et al., 1989; Wiseman & Halliwell, 1993). Yamanaka et al. (1997) verificaram que o ácido clorogênico e o ácido caféico, presentes no café, têm ação pró-oxidante via formação de radicais hidroxila.

## **2.14 Mutagenicidade**

Certos agentes químicos associados ao estilo de vida e dieta, bem como as radiações ionizantes e ultravioleta, podem induzir alterações genéticas permanentes em todos os organismos vivos, as mutações. Essas alterações têm efeitos deletérios no indivíduo ou nos seus descendentes e as implicações dessas alterações genéticas são muito amplas. Em populações humanas, podem aumentar a incidência de doenças genéticas e levar ao envelhecimento precoce.

A indução de danos na linhagem germinativa e nos mecanismos que controlam a divisão celular nos seres vivos pode ter conseqüências substanciais, tanto para a saúde humana como para o meio ambiente. Os agentes mutagênicos podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias. Após passar por várias divisões, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado, poderá determinar a perda do controle de sua divisão, determinando assim o aparecimento do câncer ou tumor (Camargo, 2002).

Os mecanismos de mutagênese e carcinogênese podem estar intrinsecamente ligados. A mutação é uma conseqüência do dano no DNA e este pode ser o estágio inicial do processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor (Sgarbieri, et al., 1997)

A maioria dos cânceres é causada pela exposição dos indivíduos aos agentes carcinogênicos ambientais, em particular os hábitos dietéticos, que são considerados os principais determinantes para a gênese do câncer em humanos (Hasegawa et al., 1995). A carcinogênese pode ser estudada em três fases: iniciação, promoção e metástase. Estabelecida a iniciação, certos constituintes da dieta poderão agir como moduladores da promoção e do desenvolvimento tumoral, tanto no sentido de acelerar o processo como o sentido oposto, de reprimir ou retardar o seu desenvolvimento. Tem sido demonstrado que tanto macronutrientes, como gorduras, proteínas, carboidratos e micronutrientes, como vitaminas e elementos minerais, podem modular o desenvolvimento tumoral e influir de maneira importante na incidência e na patogenicidade dos tumores. Compostos não-nutrientes, existentes nos alimentos ou que se formam no preparo e consumo dos alimentos, podem atuar como moduladores da carcinogênese (Sgarbieri et al., 1997).

A formação de compostos mutagênicos durante o tratamento térmico em alimentos está bem estabelecida (Sgarbieri et al., 1997). Compostos mutagênicos

podem ser formados durante a pirólise de proteínas e aminoácidos (Peters et al., 1981).

### **2.15 Café e mutagenicidade**

Está bem documentado que a dieta tem um papel crucial na etiologia do câncer humano e esforços têm sido feitos para identificar substâncias protetoras (antimutagênicos e anticarcinogênicos) em alimentos. Embora numerosos estudos tenham sido publicados, é problemático usar estes resultados para o desenvolvimento de estratégias nutricionais, devido ao uso de modelos *in vitro*, genotoxinas e carcinógenos que não são relevantes para humanos, falta de conhecimentos sobre a dose-efeito dos constituintes dietéticos protetores do DNA, entre outros (Knasmuller et al., 2002).

Os componentes regularmente presentes nos alimentos, pertencentes aos mais variados grupos de substâncias químicas, que possuem efeitos preventivos para o câncer ou benéficos para outras patologias, são freqüentemente conhecidos como quimiopreventivos (Stavric, 1994). Os alimentos contendo agentes para a quimioprevenção constituem um dos principais grupos de alimentos com propriedades funcionais, conhecidos também como nutracêuticos ou fármaco-alimentos (Broth & Thomson, 1995).

O modo de ação dos quimiopreventivos é pouco conhecido, embora muitos deles sejam antioxidantes e, como tal, talvez possam seqüestrar radicais livres, formados durante a preparação do alimento ou em processos biológicos que ocorrem no organismo vivo (Stavric, 1994).

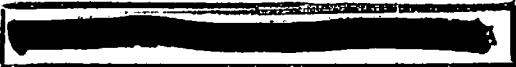
O café é uma bebida mundialmente consumida. Devido à sua popularidade e amplo uso, existem numerosos estudos relacionados à sua segurança e implicações na saúde. Contudo, os dados são controversos. Vários estudos que demonstraram a atividade mutagênica do café e cafeína, *in vitro*, utilizaram doses muito altas (Nehling & Debry, 1994). Além disso, seus efeitos

foram inativados pela adição de enzimas microssomais hepáticas, possivelmente devido à sua inativação enzimática ou simplesmente pela ação direta de mutágenos com proteínas presentes em S9 (Nagao et al., 1979).

Por outro lado, o café apresenta propriedades antioxidantes e age como seqüestrante de radicais livres (Standler et al., 1994). O DNA nuclear é um dos principais alvos biológicos do estresse oxidativo (Ames, 1989). O perigo genotóxico produzido pelos radicais livres se traduz em uma modificação de bases do DNA e formação de adutos (Pfohl-Leszkowicz et al., 1995) conseqüentemente, estimulando o processo carcinogênico (El Ghissassi et al., 1995).

O efeito mutagênico do café tem sido demonstrado *in vitro*: pelo teste de Ames (Nagao et al., 1979; Aeschbacher & Wurzner, 1980; Aeschbacher et al., 1980; Fujita et al., 1985; Fung et al., 1988; Duarte et al., 1999) em *Escherichia coli* (Kosugi et al., 1983), em *Drosophila melanogaster* (Graf & Wurgler, 1986; Hiramoto et al., 1998), em cultura de células de pulmão de hamster (Nakasato et al., 1984; Hiramoto et al., 1998), de linfócitos humanos (Aeschbacher et al., 1985; Hiramoto et al., 1998) e de células embrionárias intestinais (Itagaki et al., 1992). Tem sido relatado que o café induz à quebra da fita única de DNA em células ovarianas de hamster em cultura (Rinkus, et al., 1987; Hiramoto et al., 1998), troca de cromátides irmãs e células endorreduplicadas (Tucker et al., 1989; Hiramoto et al., 1998).

Usando o teste de Ames, alguns autores foram capazes de demonstrar uma fraca atividade mutagênica em extrato aquoso de café instantâneo e café filtrado. A atividade mutagênica foi determinada com a linhagem de *Salmonella typhimurium* TA100 e a adição de enzimas microssomais de mamíferos (S9) reduziu ou mesmo eliminou totalmente o efeito mutagênico (Nagao et al., 1979; Aeschbacher & Wurzner, 1980). Aeschbacher et al. (1985) citam que algumas enzimas encontradas no extrato de fígado, como glioxalase I e II, em associação



com catalase e glutathione redutase, podem inativar os efeitos mutagênicos do café e da cafeína *in vitro*. A peroxidase também é capaz de eliminar o efeito citotóxico do café instantâneo em células embrionárias intestinais *in vitro*; já a catalase tem um menor efeito protetor. A superóxido dismutase aumenta o teor de peróxido de hidrogênio, aumentando o efeito citotóxico (Itagaki et al., 1992).

Numerosos trabalhos com o objetivo de verificar os efeitos genotóxicos dos vários constituintes do café têm sido realizados (Nehlig & Debry, 1994). De fato, mais de 660 substâncias voláteis já foram identificadas no café (Viani, 1993). É possível que alguns destes compostos voláteis tendam a formar interações com o DNA devido à sua reatividade, podendo, em parte, serem responsáveis pelo efeito mutagênico do café *in vitro*. Esta hipótese é baseada no fato de que os grãos de café crus não são mutagênicos e só se tornam após a torração (Albertini et al., 1985; Dorado et al., 1987). Alguns compostos produzidos durante a torração, como dicarbonilas alifáticas (metilglioxal, etilglioxal, propilglioxal, maltol e diacetil) e peróxido de hidrogênio são ativos no teste de mutagenicidade de Ames (Fujita et al., 1985b). Metilglioxal e peróxido de hidrogênio parecem ser os responsáveis pela mutagenicidade do café instantâneo. O metilglioxal pode ser gerado durante a reação de Maillard, pela decomposição de açúcares e aminoácidos. A presença de peróxido de hidrogênio potencializa a mutagenicidade do metilglioxal (Fujita et al., 1985a). Durante a torração, a maioria do ácido clorogênico presente no grão cru se decompõe, formando vários outros fenólicos como ácido caféico, catecol, pirogalol ou hidroquinona (Millin & Cruickshank, 1988). A auto-oxidação destes polifenóis, que ocorre principalmente em pH alcalino, pode ser a fonte de peróxido de hidrogênio presente no café (Rueff et al., 1999). As amins heterocíclicas (Kikugawa et al., 1989) também podem ser formadas durante a torração. Entretanto, fibras de hemicelulose insolúveis e polifenóis solúveis de alto peso molecular presentes no café são capazes de remover as amins

heterocíclicas mutagênicas (Kato et al., 1991). Algumas substâncias mutagênicas são formadas durante a pirólise do café, e são provenientes de compostos nitrogenados nele presentes. Mas, compostos fenólicos, como ácidos clorogênico e caféico, podem inibir as propriedades mutagênicas das substâncias formadas por nitrosação (Nehlig & Debry, 1993).

Outras substâncias presentes no café, como cafeína, ácido clorogênico, ácido cafeico e flavonóides, são suspeitas de contribuir para o efeito mutagênico direto do café (Fung et al., 1988; Nehlig & Debry, 1994). Estudos *in vitro* estabeleceram que a cafeína pode potencializar o efeito genotóxico de vários agentes causadores de danos ao DNA (Nehlig & Debry, 1994). Porém, Nagao et al. (1979), usando o teste de Ames, não demonstraram diferença significativa na mutagenicidade entre café normal e descafeinado. Recentemente, Granby & Fagt (2004) demonstraram a presença de acrilamida, um provável carcinógeno, em café. Estes autores relataram que o nível de acrilamida não diferiu com o tipo de preparo da bebida, mas se alterou de acordo com o grau de torração do café, sendo que o café torrado médio continha mais acrilamida que o café torrado escuro.

Sakamoto et al. (2003) demonstraram que o café aumenta a formação da base modificada 8-hidroxi-desoxiguanosina, um dos principais produtos da oxidação do DNA, em ratos. Além dos compostos presentes no café, tem sido estudado o efeito carcinogênico de papéis de filtro usados no seu preparo. Dependendo de como são feitos, estes filtros podem conter 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, substância muito tóxica para o homem (Nehlig & Debry, 1994).

O efeito do café em populações humanas também sido estudado. Smith et al. (1990) reportaram efeito mutagênico do café, pois observaram aumento na indução de micronúcleos em eritrócitos/reticulócitos de humanos esplenectomizados. Estudo epidemiológico sugeriu que o café (se consumidos

mais de 7 copos por dia) provocou câncer de bexiga em homens holandeses (Zeegers et al., 2001). No entanto, Ribeiro (2003) relata que o risco de câncer pode variar dramaticamente em diferentes regiões e populações, especialmente entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento. Além disso, a incidência pode variar com a idade da população, o nível de industrialização e de urbanização e com o padrão de dietas (Ribeiro & Salvadori, 2003).

Vários autores, utilizando diferentes protocolos, realizaram intensa pesquisa em relação à atividade antimutagênica do café. Empregando sistema de análise bacteriana, Stich et al. (1982) e Obana et al. (1986) demonstraram a inibição da mutagênese pelo café. Utilizando bebida de café filtrado, café instantâneo, café instantâneo descafeinado e café solúvel, em doses variando entre 225 a 1125 mg/kg de peso corporal, Abraham (1989) demonstrou a inibição dose-dependente da genotoxicidade em camundongos induzida pela mitomicina C, ciclofosfamida e procarbazona.

A administração oral de café em doses de 150 mg a 1000mg/kg reduziu significativamente o dano ao DNA mediado pela formação endógena de nitrosouréia em células de medula óssea e células epiteliais de colo em camundongos que receberam, simultaneamente, a administração de metiluréia e nitrito de sódio. Além disso, ácido clorogênico e pré-melanoidinas também inibiram o dano ao DNA (Aeschbacher & Jaccaud, 1990).

A bebida de café, administrada a camundongos (15-16 dias de gestação), inibiu a indução de micronúcleos pela ciclofosfamida, N-nitrosodietilamina, e N-nitroso-N-etilurea no fígado fetal, sangue fetal e medula óssea materna (Abraham, 1995a). Abraham (1995b) demonstrou que o café, mesmo em doses baixas (100 mg/kg) pode potencializar o efeito antigenotóxico de constituintes da dieta. No entanto, nesta concentração, o café sozinho não exerceu efeito antigenotóxico.

Em camundongos, o café inibiu a genotoxicidade de várias substâncias,

tais como 7,12-dimetilbenzo-a-antraceno (DMBA), benzo-a-pireno (BP), aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) e uretano (UR) (Abraham, 1991). Este autor concluiu que a atividade antimutagênica é dependente do tempo de administração do café em relação à exposição ao agente carcinogênico, sendo obtida maior inibição se o café for administrado antes do genotóxico, reduzindo um pouco sua atividade se co-administrado com o genotóxico e não obteve efeito se administrado 2 horas após o genotóxico. Em contraste com estas observações, existem relatos que mostram que a ingestão de café não causa alteração significativa na incidência *in vivo* de dano cromossomal induzido pela dimetilnitrosamina (Shimizu and Yano, 1987), aflatoxina B<sub>1</sub> (Ito et al., 1989) e adrimianina (Abraham, 1989).

Constituintes do café, como ácido cafêico, ácido clorogênico, cafeína, kaveol, cafestol e taninos, têm sido identificados como inibidores da genotoxicidade de alguns carcinógenos. Sob condições *in vitro*, San & Chan (1987) observaram a inibição do metabolismo e mutagenicidade induzida pela aflatoxina pelos ácidos clorogênico e cafêico. O consumo de dieta contendo ácido cafêico protegeu significativamente camundongos contra a genotoxicidade do DMBA (Raj et al., 1983). Além disso, segundo Kasai et al. (2000), o ácido clorogênico pode inibir o dano de DNA *in vitro*; Wattenberg (1983) relatou a inibição da neoplasia induzida por BP pelo ácido cafêico; Cavin et al. (2002) demonstraram o efeito anticarcinogênico dos diterpenos kaveol e cafestol; Ito et al. (1989) demonstraram a supressão da aberração cromossômica induzida pela aflatoxina, em células de medula óssea de ratos, pela cafeína e Nepka et al. (1999) demonstraram a atividade quimiopreventiva da administração de ácido tânico na redução da incidência de câncer hepático em camundongos. A cafeína inibiu a carcinogênese da pele de ratos induzida por agentes químicos encontrados em cigarros (Rothwell, 1974) e carcinogênese estomacal induzida pela peroxidação de lipídeos em ratos (Nishikawa et al., 1995).

O mecanismo molecular do efeito antimutagênico do café é pouco



conhecido. De acordo com Schlegel et al. (1987), o efeito antimutagênico da cafeína se deve à inibição da síntese protéica.

Dois tipos de substâncias que agem como antagonistas do efeito mutagênico de aminas heterocíclicas produzidas pela pirólise de alimentos foram identificados no café. O primeiro composto, uma fibra de hemicelulose insolúvel, pode efetivamente adsorver vários agentes mutagênicos formados durante a torração do café. O outro é formado por polifenóis de alto peso molecular capazes de destruir agentes mutagênicos. Polifenóis são convertidos em derivados de quinona na presença de oxigênio molecular, os quais poderiam destruir agentes mutagênicos presentes nos alimentos. A quantidade destes dois componentes contidos em um copo de café seria suficientes para neutralizar uma quantidade substancial de agentes mutagênicos produzidos pela pirólise de nutrientes (Kato et al., 1991).

Dados atuais sugerem que o equilíbrio entre as reações de fase I (enzimas que ativam carcinógenos) e reações de fase II (enzimas que desintoxicantes) é crítico para determinar o risco de um indivíduo para o câncer. Deficiências humanas da atividade de enzimas da fase II, especialmente a glutathione S-transferase (GST), têm sido associadas ao aumento do risco de câncer (Wilkinson & Clapper, 1997). Por outro lado, a indução da GST ou outras enzimas de fase II, como UDP-glucuronil-transferase (UDP-GT) pelos antioxidantes, representa uma estratégia promissora para a prevenção do câncer (Prochaska & Talalay, 1988).

De acordo com Wattenberg & Lam (1984), a adição de café cru moído na dieta de camundongos aumentou a atividade da glutathione S-transferase no fígado e mucosa do intestino grosso e a torração não alterou esta atividade. No entanto, comparando a bebida tipo turco com a bebida de café instantâneo, observou que esta última apresentou menor atividade. Estes autores relacionaram a redução da atividade com a ausência de lipídeos kaveol e

cafestol, que exercem efeito quimioprotetor, no café instantâneo. Além disso, Cavin et al. (2003) demonstraram que diterpenos específicos do café cafestol e kaveol inibiram a formação de adutos no DNA pelo benzo-a-pireno em hepatócitos de ratos. Em células de origem humana, o efeito protetor encontrado foi similar, sugerindo que os efeitos em ratos podem ser relevantes para o homem. Mas, os mecanismos que contribuem para estes efeitos podem variar. O principal mecanismo para este efeito observado em ratos foi a indução da glutathione s-transferase, entretanto, foi o de menor importância em relação às células brônquicas humanas em que a inibição do citocromo P450 foi de maior significância.

Graf et al. (1998) demonstraram a inibição da recombinação mitótica pelo café instantâneo em *Drosophila melanogaster*, enquanto que Huber et al. (2003) demonstraram a estimulação, pelo café e seus componentes kaveol e cafestol, da atividade da 0<sup>6</sup>-metilguanina-DNA metiltransferase em fígado de ratos adicionando novas perspectivas para a atividade antimutagênica/anticarcinogênica do café além da modificação do metabolismo de xenobióticos.

Estudos epidemiológicos sugerem uma relação inversa entre o consumo de café e o câncer intestinal (Giovannucci, 1998).

## **2.16 Café e parâmetros bioquímicos e hematológicos**

A oxidação da LDL é umas das principais causas de doenças cardiovasculares. Além disso, indicadores de risco para essas doenças são a elevação de colesterol - LDL, diminuição de colesterol - HDL e aumento dos triglicérides (Berliner et al., 1995; Martinez & Lourenço, 1996).

Estudos epidemiológicos são controversos. Em países escandinavos, foi demonstrada correlação positiva entre a ingestão de café e concentrações de colesterol no plasma (Thelle et al., 1983). Mas, esta relação não tem sido

encontrada em outros países da Europa nem nos Estados Unidos (Thelle et al., 1987; Trugo, 1997). Estudos indicam que estes diferentes efeitos poderiam ser explicados pelo método de preparo da bebida (Thelle et al., 1983). O conteúdo de kaveol e cafestol, principalmente o último, nas bebidas de café tem sido relacionado com o aumento do colesterol (Urgert & Katan, 1997).

O cafestol está presente em todas as espécies de café, embora o café arábica contenha maiores concentrações que o robusta (Roos et al., 1997). Pesquisas têm relacionado a influência do modo de preparo da bebida ao conteúdo de kaveol e cafestol; além disso, sabe-se que estes diterpenos são retidos pelo papel de filtro. A bebida de café fervido, não filtrado (tipo turco), aumenta o nível de colesterol (Aro et al., 1987), entretanto, a relação de outros tipos de preparo da bebida de café com o nível sérico de lipídios e lipoproteínas não está completamente esclarecida (Miyake et al., 1999). Como revisado por estes autores, um copo de café instantâneo por dia foi associado com um aumento significativo de colesterol total em mulheres. Além disso, Burr et al. (1995) demonstraram um aumento significativo no nível de colesterol total e apolipoproteína B após a ingestão de café instantâneo. Por outro lado, tem sido demonstrado que o método de preparação da bebida ou filtração não tem uma importante influência na composição lipídica e não há retenção preferencial de um componente lipídico particular no filtro de papel (Ratnayake et al., 1993).

Ito et al. (1998) não encontraram aumento de colesterol total e triglicerídeos em humanos que receberam a bebida de café filtrado. A ingestão de café instantâneo (Hill, 1985; Aro et al., 1985, McAnlins et al., 1998) ou de café filtrado (Natella et al., 2002) não induziu alteração do nível de colesterol. Para acentuar a controvérsia, Yukawa et al. (2004) revelaram redução no colesterol total e LDL-colesterol após consumo de café, contudo não houve alterações significativas de triglicerídeos e HDL-colesterol.

O ácido úrico nos animais é o produto final do metabolismo das bases

púricas, sendo a guanina e a adenina convertidas em xantina e hipoxantina, respectivamente. Estas, por ação da xantina oxidase, formam ácido úrico. Sua concentração nos líquidos orgânicos depende do balanço entre a produção e a eliminação através dos rins. Natella et al. (2002) relataram aumento significativo na concentração de ácido úrico após consumo de café, por humanos. Por outro lado, Leenen et al. (2000) não observaram, em humanos, aumento de ácido úrico após a suplementação com bebidas ricas em fenólicos.

O ferro é indispensável à produção da hemoglobina, pigmento dos glóbulos vermelhos que lhes permite o transporte de oxigênio e cuja falta causa anemia. Certos constituintes dos alimentos inibem a absorção de ferro não-heme. Fitatos, componentes naturais de grãos e alguns outros alimentos vegetais formam complexos estáveis e mal absorvíveis com o ferro. Farelos e outras fibras inibem a absorção de ferro, principalmente devido ao seu conteúdo de fitatos. Polifenóis (taninos) no chá, café e certos vegetais, ligam-se ao ferro não – heme para formar complexos tanato-ferro insolúveis (Gillooly et al., 1984; Zijp et al., 2000). Polifenóis presentes no café e chá inibiram a absorção de ferro, segundo Disler et al. (1975) de uma maneira dose-dependente (Layrisse et al., 2000b). A influência do tipo de preparo da bebida na absorção de ferro foi testada por Layrisse et al. (2000b), que verificaram que café tipo-americano não modificou significativamente a absorção de ferro, enquanto o café tipo expresso reduziu em 50% a absorção do ferroquel (substância utilizada para a fortificação de alimentos).

Hurrell et al. (1999), investigando a ingestão de leite no chá e café em relação à absorção de ferro, verificaram pouca ou nenhuma influência na sua natureza inibitória. Estes autores demonstraram que chás de ervas, chá preto, café e coca podem ser potentes inibidores da absorção de ferro, propriedade que poderia ser considerada durante o aconselhamento alimentar de portadores de deficiência de ferro.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Matéria-prima

Foram utilizadas neste experimento, amostras de café (*Coffea arabica* L.), cultivar Mundo Novo, provenientes da gleba M17 da Fazenda Conquista (865m de altitude) , pertencente à Ipanema Agrícola S.A., localizada no município de Alfenas, MG.

Os frutos do cafeeiro, safra 2001/2002 (aproximadamente 20.000 L), foram colhidos manualmente por derriça no pano e encaminhados para os lavadores para separação, por densidade, dos frutos cerejas e verdes dos frutos bôia. Foram utilizados dois tipos de café, descascado e natural.

#### 3.2 Processamento da matéria-prima

Para a obtenção da amostra de café natural, uma porção de 100 litros de cafés cerejas e verdes foi retirada diretamente da bica do lavador, antes do descascador e colocada em peneiras, onde foi realizada a retirada manual de todos os frutos verdes. Posteriormente, foram levadas para secar ao sol em terreiro de concreto, sendo revolvidos de hora em hora.

A amostra de café descascado (100 litros) também foi obtida pela retirada direta na bica do descascador de cerejas, colocada em peneiras e levadas para secar ao sol em terreiros de concreto, sendo revolvidos de horam em hora.

As duas amostras atingiram, após secagem, o mesmo grau de umidade ( $\pm$  12%). Depois de beneficiados, foram obtidos os grãos peneira 17/18, sem defeitos, das amostras natural e descascado.

#### 3.3 Preparo da amostra

Amostra de cafés foram torradas em torrador de laboratório (Probat) com

capacidade 1kg, em três graus de torração: claro, médio e escuro. O ponto ideal de torração foi determinado visualmente. Em seguida, os grãos torrados foram moídos (moedor elétrico Raiar, modelo RA21) em granulometria fina, empacotados em embalagens de polietileno/alumínio/polipropileno, seladas a vácuo e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o uso.

### **3.4 Métodos e análises**

#### **3.4.1 Análise de cor**

A cor do café torrado e moído foi analisada usando-se um colorímetro (Chomameter-2 Reflectance, Minolta, Osaka, Japan) acoplado a um processador de dados (OP-300). O instrumento foi padronizado contra um branco antes de cada leitura. A cor foi expressa em parâmetros da escala desenvolvida pela Commission Internationale de Eclairage (CIE)  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . Foram feitas cinco medidas de cada amostra.

#### **3.4.2 Preparo da bebida**

A bebida foi preparada de acordo com o método de Nicoli (1997), com modificações. Foram adicionados 10g de café em pó em filtro de papel Whatman n. 3 e, em seguida, foram vertidos 100 mL de água deionizada, a  $90^{\circ}\text{C}$ , sobre o pó contido no filtro. Todos os experimentos foram realizados com bebida preparada no momento de uso e quando necessário, ela foi diluída para a avaliação de diferentes concentrações da bebida.

#### **3.4.3 Determinação do pH**

Foi determinado o pH da bebida, usando-se pHmetro equipado com um eletrodo de vidro e controle de temperatura. Foram feitas cinco medidas para cada amostra.

### **3.4.4 Determinação do teor de polifenóis**

O teor de polifenóis das bebidas de café (10g/100mL) foi quantificado pelo método de Folin-Denis (AOAC, 1990). O volume do filtrado foi completado para 100 mL com água destilada. Transferiram-se 2 mL da bebida para um balão volumétrico de 100 mL, contendo 75 mL de água destilada, 5 mL de reagente Folin-Dennis, 10 mL de solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e completado o volume com água destilada. A mistura foi agitada e, após 30 minutos, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 760 nm. Foi feita uma curva padrão com ácido tânico 100mg/1000 mL e calculado o Km. O teor de polifenóis foi expresso em g de equivalentes de ácido tânico por 100 g da amostra (g eq.ác. tânico/100g).

$$\text{Polifenóis} = \text{Km} \times \text{Absorbância} / \text{tomada de ensaio} / \text{volume final}$$

### **3.4.5 Análise de sólidos solúveis totais**

O teor de sólidos solúveis totais nas bebidas de café foi determinado usando-se refratômetro Abbe modelo 2 WAJ, de acordo com o método descrito pela AOAC (1990).

### **3.4.6 Determinação da concentração dos ácidos cafeoilquínico (CQA)**

A concentração de CQA (%) foi determinada em café cru e torrado, por cromatografia líquida de alta resolução (CLAE). Amostras de 10,0g de café cru moído foram colocadas em papel de filtro Whatman n. 3 e, em seguida, foram vertidos 100 mL de água a 90°C. Os lipídeos foram extraídos com éter de petróleo por 6 h, em Soxhlet. A seguir foi adicionado 1 mL de cada solução Carrez 1 e 2. A amostra foi diluída em 100 mL de água deionizada, filtrada em papel Whatman n.1 e em filtro de 0,45 µm (HATF 013 00, Millipore).

A extração de CQA do café torrado e moído foi feita de acordo com a metodologia de Trugo & Macrae (1984a). Amostras de 10 g de café torrado moído foram colocadas em papel de filtro Whatman n. 3 e, em seguida, foram

vertidos 100 mL de água a 90°C. Aliquotas de 20 mL foram transferidas para balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados 2 mL de solução Carrez 1 e 2 e o volume completado com água destilada. A amostra foi filtrada em papel Whatman n.1 e em filtro de 0,45 µm (HATF 013 00, Millipore).

A cromatografia líquida de alta resolução foi realizada de acordo com a metodologia de Moreira et al. (2001), utilizando-se cromatógrafo Knauer, equipado com coluna RT-18, detector de UV a 315 nm e integrador HP. O sistema utilizado para as análises cromatográficas foi isocrático, com fluxo constante de 1,0 mL/min. A fase móvel consistiu de tampão citrato tripotássico 0,01 M pH 2,5, contendo 40% (v/v) de metanol. O pH da solução foi ajustado com solução de ácido clorídrico 6N.

#### 3.4.7 Avaliação do poder redutor

A avaliação do poder redutor das bebidas de café foi realizada pelo método de Yen & Chen (1995), com modificações.

Aliquotas de 0,01 mL da bebida de café, na concentração final de 1000 ppm, foram diluídas em 1 mL de etanol absoluto e transferidas para tubo de ensaio contendo 2,5 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 6,6 e 2,5 mL de ferricianeto de potássio ( $K_3\{Fe(CN)_6\}$ ) a 1% (p/v). A mistura foi incubada em banho-maria a 45°C, por 20 minutos. Aliquotas de 2,5 mL de ácido tricloroacético a 10% (p/v) foram adicionadas ao tubo de ensaio, com posterior agitação. Aliquotas de 2,5 mL da mistura foram transferidas para outro tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de  $FeCl_3$  a 0,1% (p/v), com posterior agitação. A leitura da absorbância foi realizada a 700 nm. Foram feitas 4 repetições e cada uma delas realizada em triplicata. O aumento da absorbância indica aumento do poder redutor. A atividade redutora da bebida foi expressa como porcentagem de inibição em comparação ao BHT, usado como padrão.



### 3.4.8 Avaliação da atividade quelante de metais (Fe<sup>2+</sup>)

Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Tang et al. (2002) com modificações. Aliquotas de 1 mL da bebida de café, na concentração final de 1000 ppm, foram transferidas para tubos de ensaio âmbar de 25 mL. Em seguida, foram adicionados 3,7 mL de água deionizada, 0,1 mL de FeSO<sub>4</sub> (Fe<sup>2+</sup>) 2 mM, 2 mL de ferrozine 5mM (reagente cromogênico). A mistura foi agitada e, após 20 minutos, foi feita a leitura a 562 nm. A redução na absorbância indica atividade quelante de metais. Foram feitas três repetições e, cada uma delas, realizada em triplicata.

### 3.4.9 Avaliação da atividade seqüestrante de radicais livres

Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Hatono et al. (1988) com modificações. A bebida de café foi diluída em etanol, a fim de se obter as seguintes concentrações finais: 25, 50, 100, 200 e 400 ppm. Aliquotas de 4 mL foram transferidas para tubos de ensaio de 25 mL. A seguir, foi adicionado 1 mL de DPPH 0,0005 M, diluído em etanol. A mistura foi agitada e, após 30 minutos, foi feita a leitura a 517 nm. Foram feitas três repetições e cada uma delas realizada em triplicata. A atividade seqüestrante de radicais livres (ASRL) foi expressa em porcentagem por comparação ao controle (BHT) e foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\%ASRL = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100$$

em que, Ac = absorbância do controle (DPPH); At = absorbância do teste com diferentes concentrações da bebida de café.

### 3.4.10 Determinação da atividade de guaiacol-peroxidase *in vitro*

A peroxidase é uma enzima, que tem como substrato o peróxido de hidrogênio. Na reação peroxidativa, esta enzima oxida um composto doador de

ions  $H^+$ , transformando o peróxido de hidrogênio em água e formando um composto oxidado. Vários compostos podem ser doadores de  $H^+$  para a formação de água. Um deles é o guaiacol que, reduzido, é incolor e oxidado, apresenta coloração castanha e pode ser quantificado por espectrofotometria (Makinen & Tenuvuo,1982).

A atividade da peroxidase HRP (*horsehadish peroxidase*, Sigma) foi monitorada por 5 minutos, a 450nm, a 25°C, em um sistema apresentando 2770  $\mu L$  de ácido succínico 0,1 M, pH 5,0, 150  $\mu L$  de guaiacol 1mM, 10  $\mu L$  de peroxidase (170 U) e 10  $\mu L$  água destilada para o controle e 10  $\mu L$  de diversas concentrações da bebida de café: 10.000, 20.000, 30.000 e 40.000 ppm para o teste e, no momento da leitura foram adicionados 60  $\mu L$  de  $H_2O_2$  1 mM. Amostras incubadas sem adição de peroxidase foram utilizadas como branco. O aumento da absorbância em 450 nm foi monitorado a 37°C. A oxidação do guaiacol foi estimada pela diferença entre os valores de absorbância obtidos entre o terceiro e quarto minuto de reação e foi considerada como 100% no controle. A inibição da oxidação do guaiacol (%) pela bebida de café foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%Inibição = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100$$

em que, Ac = absorbância do controle; At = absorbância do teste com diferentes concentrações da bebida de café.

### **3.4.11 Determinação da inibição da peroxidação de lipídeos *in vitro***

A fim de determinar se a bebida de café é capaz de reduzir o estresse oxidativo, foi analisada a peroxidação de lipídeos isolados de cérebro de rato. A peroxidação de lipídeos foi determinada pela formação de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Winterbourn et al. (1981). Os produtos da peroxidação de lipídeos reagem com o ácido tiobarbitúrico,

produzindo um composto que apresenta absorvância a 535 nm.

Para o ensaio, foram utilizados ratos adultos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando  $270 \pm 20$  g, obtidos do Biotério da Escola de Farmácia e Odontologia/Centro Universitário Federal de Alfenas (Efoa/Ceufe). Após a eutanásia por deslocamento cervical, foram retirados os cérebros dos animais, os quais foram pesados e homogeneizados em homogeneizador de tecidos, em banho de gelo, após adição de PBS 0,1 M, pH 7,2 (volume equivalente a 4 vezes o peso fresco de tecido). O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm, por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante, mantido em banho de gelo, foi utilizado nos ensaios. Aliquotas de 500 µL de homogeneizado de cérebro (controle), 490 µL de homogeneizado contendo 10µL da bebida de café descascado e natural em diferentes concentrações (200, 2.000 e 20.000 ppm) e em três graus de torração (claro, médio e escuro) ou 10 µL de BHT foram incubadas a 37°C, com agitação, por 30 minutos para a obtenção da peroxidação espontânea. Imediatamente após, foram adicionados 500 µL de ácido clorídrico a 25% (v/v), 500 µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (p/v, em NaOH 0,05 M) e 45µL de BHT 2% (p/v, em etanol). A mistura foi incubada em banho-maria a 98°C, por 15 minutos. Após o resfriamento em banho de gelo por 10 minutos foi adicionado 1,5mL de butanol e as amostras foram agitadas vigorosamente em vórtex. A seguir, foram centrifugadas a 900 rpm, por 5 minutos e a fração contendo butanol foi recolhida e utilizada para a determinação da absorvância a 535 nm. A concentração de TBARS foi calculada a partir da curva padrão de dialdeído malônico (MDA; 1,1,3,3 tetraetoxipropano). A inibição da peroxidação lipídica, após a adição de diferentes concentrações da bebida de café, foi considerada como atividade antioxidante, sendo calculada como porcentagem de inibição da peroxidação de lipídeos, por comparação ao controle:

$$\% \text{Inibição} = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100$$

em que, Ac =absorbância do controle; At = absorbância do teste com diferentes concentrações da bebida de café.

#### **3.4.12 Determinação da inibição da peroxidação de lipídeos *in vivo***

Foram utilizados ratos adultos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando  $270 \pm 20$  g, que foram mantidos em caixas de polietileno, recebendo água e ração comercial *ad libitum*. Os animais foram divididos em 4 grupos de 12 animais: controle 7 dias, tratado 7 dias (receberam bebida de café por 7 dias), controle 30 dias e tratado 30 dias (receberam bebida de café por 30 dias).

A bebida de café descascado escuro, na concentração de 570 ppm/kg, que corresponde ao consumo humano de 4 xícaras de 50 mL da bebida de café 10g%/dia, foi administrada aos animais por gavagem, uma vez ao dia, por 7 e 30 dias. Decorrido o tempo, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. A seguir, foi preparado o homogeneizado de cérebro e determinada a peroxidação lipídica como descritos anteriormente .

#### **3.4.13 Determinação da concentração de proteínas**

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se BSA como padrão.

#### **3.4.14 Determinação parâmetros bioquímicos e hematológicos**

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados em amostras de sangue de ratos divididos em 2 grupos: controle e tratado (receberam bebida de café). A bebida de café descascado escuro foi administrada (570 ppm/kg de peso corporal) aos animais por gavagem, uma vez ao dia, por 30 dias. O sangue foi coletado por punção cardíaca, após anestesia com cloridrato de acepromazina 1% (p/v) e cloridrato de cetamina.

Os parâmetros bioquímicos: colesterol total, colesterol - HDL,

triglicéridos e ácido úrico foram determinados por método enzimático-colorimétrico, utilizando-se kit (Labtest), em soro. Os parâmetros hematológicos foram determinados em contador eletrônico de células (Coulter - 780), em sangue total, utilizando-se EDTA como anticoagulante.

#### **3.4.15 Teste do micronúcleo de eritrócitos de medula óssea de rato**

O teste do micronúcleo fornece dados sobre a citotoxicidade e ou clastogenicidade. A diferenciação do eritroblasto leva à formação do eritrócito, célula anucleada. O eritrócito imaturo (RNA-positivo) está em um estágio intermediário de desenvolvimento, apresenta ribossomos, portanto, é policromático (PCE). O eritrócito maduro (RNA-negativo) não apresenta ribossomos, portanto, é normocromático (NCE). O aumento de eritrócitos micronucleados (MNE) indica danos cromossômicos. O aumento de NCE indica efeito citotóxico, com morte de células jovens ou diminuição da proliferação celular. Assim, o teste do micronúcleo foi realizado em células de medula óssea de rato, de acordo com o descrito por George et al. (1990).

Foram utilizados ratos adultos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando  $200 \pm 20$  g, que foram mantidos em caixas de polietileno, recebendo água e ração comercial *ad libitum* e foram divididos em grupos de 5 animais (Tabela 2).

As bebidas de café descascado escuro e claro (570 ppm/kg) foram administradas aos animais por gavagem, uma vez ao dia, por 7 e 30 dias. A ciclofosfamida foi administrada por gavagem, 24 horas antes da eutanásia. Decorrido o tempo, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical.

**TABELA 2** Esquema de tratamento utilizado para a realização do teste de micronúcleo de eritrócitos de medula óssea de ratos

Tempo em dias	Grupos de ratos					
	CN	CP	TC	TE	TC + AM	TE + AM
7	Água	CPF (50mg/kg)	CDC (570ppm/kg)	CDE (570ppm/kg)	CDC + CPF	CDE + CPF
30	Água	CPF (50 mg/kg)		CDE (570ppm/kg)		CDE + CPF

CN=controle negativo; CP= controle positivo; TC= tratado claro; TE=tratado escuro; AM= agente mutagênico; CPF= ciclofosfamida; CDC= café descascado claro; CDE= café descascado escuro;

O fêmur do membro posterior direito foi retirado, limpo e teve as epífises cortadas. A medula óssea foi retirada introduzindo-se no canal medular a agulha de uma seringa com 3 mL de soro bovino fetal. Após centrifugação por 5 minutos, a 1000 g, o precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL de soro fetal bovino e os esfregaços foram preparados. Após 24 horas, foram corados com May-Grunwald e Giensa, em preparação permanente. Foram analisadas 2.000 células por animal e a frequência de PCE, NCE e NME foram determinadas, bem como a relação PCE/NCE.

### 3.5 Delineamento experimental

Para os parâmetros cor, pH, sólidos solúveis, polifenóis e poder redutor, utilizou-se delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (2x3) sendo 2 tipos de café (natural e descascado) com 3 graus de torração (claro, médio e escuro) com 4 repetições para cada tratamento.

Para os parâmetros 5 CQA, 4 CQA, 3 CQA, variação dos teores de ácidos cafeoilquínicos, poder quelante, utilizou-se DIC em fatorial (2x4), sendo 2 tipos

de café (natural e descascado) com 4 graus de torração (cru, claro, médio e escuro) com 3 repetições para cada tratamento.

Para o parâmetro variação dos teores de ácidos cafeoilquínicos, utilizou-se DIC com 6 tratamentos, com 4 repetições para cada tratamento.

Para o parâmetro atividade seqüestrante utilizou-se DIC em fatorial (2x4x4), sendo 2 tipos de café (natural e descascado) com 4 graus de torração (cru, claro, médio e escuro), 4 concentrações (25, 50, 100 e 200 ppm) com 3 repetições para cada tratamento.

Para a comparação da atividade seqüestrante em relação aos padrões (ácido ascórbico, ácido gálico e butil-hidroxi-tolueno), utilizou-se DIC com 11 tratamentos com 3 repetições para cada tratamento.

Para o parâmetro atividade guaiacol-peroxidase, utilizou-se DIC em fatorial (2x3x4), sendo 2 tipos de café (natural e descascado) com 3 graus de torração (claro, médio e escuro), 4 concentrações (10.000, 20.000, 40.000 e 60.000 ppm) com 3 repetições para cada tratamento.

Para o parâmetro inibição da peroxidação de lipídeos *in vitro*, utilizou-se DIC em fatorial (2x3x3), sendo 2 tipos de processamento de café (natural e descascado) com 3 graus de torração (claro, médio e escuro), 4 concentrações (20, 200, 2.000 e 20.000 ppm) com 3 repetições para cada tratamento.

Para a inibição da peroxidação de lipídeos *in vivo* por 7 e 30 dias, comparação da inibição da peroxidação, parâmetros bioquímicos, parâmetros hematológicos e diferença de peso corporal, utilizou-se DIC com 2 tratamentos (controle e tratado com café descascado escuro) com 10 repetições para cada tratamento.

Para os parâmetros número de micronúcleo em eritrócitos policromáticos e relação de eritrócitos policromáticos e normocromáticos, utilizou-se DIC com 6 tratamentos (controle negativo, tratado com café descascado escuro por 7 dias, tratado com café descascado claro por 7 dias, controle positivo, tratado com café

descascado escuro + ciclofosfamida, tratado com café descascado claro + ciclofosfamida) com 4 repetições para cada tratamento.

Para os parâmetros número de micronúcleo em eritrócitos policromáticos, relação de eritrócitos policromáticos e normocromáticos e exames hematológicos em relação à ciclofosfamida, utilizou-se DIC com 4 tratamentos (controle negativo, tratado com café descascado escuro por 30 dias, controle positivo, tratado com café descascado escuro + ciclofosfamida) com 4 repetições para cada tratamento

Os valores observados de cada variável foram submetidos à análise de variância de acordo com Gomes (1990). As comparações múltiplas entre as médias dos tratamentos foram realizadas utilizando-se o teste Tukey a 5% de probabilidade.



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise de cor

De acordo com os parâmetros da escala CIE  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , os grãos de café torrados foram classificados em claro, médio e escuro. A Tabela 3 mostra mudanças nos valores de luminosidade ( $L^*$ ) para amostras de café em diferentes graus de torração. Como esperado, os valores de  $L^*$  diminuem com o aumento do grau da torração, o que está de acordo com resultados de Da Porto et al. (1991) e Nicoli et al. (1997).

Quando os parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  (coordenadas de cromaticidade) são examinados, cada estágio do processo de torração pode ser localizado em uma zona de cor bem definida, em que  $a^*$  e  $b^*$  indicam direções de cor:  $+a^*$  corresponde à direção vermelha,  $-a^*$  é a direção verde,  $+b^*$  é a direção amarela e  $-b^*$  é a direção azul. Observa-se que a cor do café com diferentes graus de torração mostrou-se diferente, porém, a cor do café de mesmo grau de torração foi igual em amostras de café descascado e natural. Isto indica que foi obtido o mesmo grau de torração nos dois tipos de processamento, o que é importante quando se deseja comparar a composição química e propriedades dos cafés utilizados.

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

PROCESSAMENTO TORRAÇÃO		L*	a*	b*
Descascado	Claro	36,25 a	+12,41 a	+8,52 a
	Médio	32,95 b	+11,82 b	+5,28 b
	Escuro	29,20 c	+10,28 c	+1,42 c
Natural	Claro	35,84 a	+12,37 a	+8,37 a
	Médio	33,19 b	+11,82 b	+5,21 b
	Escuro	29,84 c	+10,27 c	+1,41 c

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $p < 0,01$ ), pelo teste de Tukey.

#### 4.2 pH

Analisando-se os resultados da Tabela 4 observa-se que o pH das bebidas aumentou com o aumento da torração. Não houve diferença significativa entre os dois tipos de processamento.

TABELA 4 Valores de pH de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três graus de torração.

Processamento	Grau de torração			Média
	Escuro	Médio	Claro	
Descascado	5,14	4,85	4,71	4,90A
Natural	5,13	4,85	4,73	4,90A
Média	5,13a	4,85b	4,72c	

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si ( $p > 0,005$ ) e médias seguidas por diferentes letras minúsculas nas linhas diferem entre si ( $p < 0,01$ ), pelo teste de Tukey.

Esses resultados estão de acordo com Daglia et al. (2000), que também observaram que o pH das bebidas aumentou com o grau de torração. Este aumento está, provavelmente, associado à decomposição do ácido quínico em quinol, pirogalol e outros (Menezes, 1990).

### 4.3 Polifenóis

Os resultados apresentados na Tabela 5 demonstram a concentração de polifenóis nos diferentes tipos de bebidas de café.

O café descascado apresentou maior teor de polifenóis que o natural. Entre os polifenóis, destacam-se os taninos, compostos fenólicos solúveis em água que apresentam grande atividade biológica e farmacológica, inclusive atividade antioxidante (Haslan, 1996). O processo de torração causou uma redução no conteúdo de polifenóis, sugerindo que o café descascado claro seja a melhor bebida de café, pois o conteúdo de polifenóis mais alto pode fornecer uma melhor proteção contra o dano oxidativo.

TABELA 5 Conteúdo de polifenóis (g eq.ác. tânico/100g) da bebida de café submetido a dois tipos de processamento e três graus de torração.

Processamento	Grau de torração			Média
	Claro	Médio	Escuro	
Descascado	6,84Aa	6,42Ab	6,26Ac	6,50 A
Natural	6,44Ba	6,30Ba	6,12Bb	6,28 B
Média	6,64 a	6,36 b	6,19 c	

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas e diferentes letras minúsculas nas linhas diferem ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

#### 4.4 Sólidos solúveis totais

A análise do conteúdo de sólidos solúveis totais (SST), de bebidas de café submetidos a dois tipos de processamento e três graus de torração encontra-se na Tabela 6.

A concentração de sólidos totais não diferiu estatisticamente nas várias bebidas de café. Estes resultados estão de acordo com Trugo (2004) e indicam que foram comparadas amostras de café com o mesmo rendimento.

TABELA 6 Conteúdo de sólidos solúveis totais (SST) de bebidas de café submetidos a dois tipos de processamento e três graus de torração.

Processamento	Grau de torração			Média
	Escuro	Médio	Claro	
Descascado	2,02	2,02	2,02	2,02
Natural	2,02	2,02	2,02	2,02
Média	2,02	2,02	2,02	

#### **4.5 Concentração dos ácidos cafeoilquínico (CQA)**

O conteúdo de CQA nas bebidas de café está apresentado na Tabela 7. Observa-se que a maior concentração foi obtida no café cru e o conteúdo foi mais alto em amostras da bebida de café descascado que em amostras de café natural ( $p < 0,001$ ). O componente principal em ambos os tipos de processamento de café foi o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA), o qual representa 76,71% do CQA total em café descascado e 76,75% em natural. O segundo componente principal foi o 4-CQA, representando 12,87% e 13,12% do total de CQA, respectivamente, no café descascado e natural. A menor fração do CQA total foi o 3-CQA, que representou 10,42% para o descascado e 10,13% para o café natural.

Depois de torrado, ocorreu mudança estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) na composição de CQA nas amostras de café. A bebida de café descascado cru apresentou conteúdo mais alto de 5-CQA que a bebida de café natural cru e seu nível diminuiu continuamente com a torração, especialmente nas amostras das bebidas de café descascado ( $p < 0,05$ ). O 4-CQA e o 3-CQA aumentaram com a torração clara, quando comparados ao café cru e diminuíram nas amostras torradas em graus médio e escuro.

A torração determinou mudança considerável na composição de CQA nos dois tipos de café. O aumento de 3-CQA, após a torração, também foi observado por Trugo & Macrae (1984a). A formação de 3-CQA e 4-CQA poderia ocorrer por meio da isomerização do 5-CQA, os quais diminuíram nitidamente com a torração ou, ainda, da decomposição parcial de outros ácidos cafeoilquínicos, como os ácidos dicafeoilquínicos.

Os CQAs são compostos fenólicos naturais formados pela esterificação do ácido quínico com o ácido caféico e são coletivamente chamados de ácidos clorogênicos, que exercem um papel importante na formação de pigmentos, aroma e sabor do café (Moreira et al., 2001). Clifford & Ohiokpehai (1983)

encontraram uma correlação entre a adstringência do café e o conteúdo de ácidos clorogênicos. Levando em consideração que um composto fenólico também possui atividade antioxidante (Rice-Evans et al., 1996), estes resultados indicaram que embora o café natural escuro pudesse ser considerado como o melhor por ser mais encorpado, a redução do conteúdo de vários compostos fenólicos, inclusive CQA e polifenóis pode alterar sua capacidade antioxidante, diminuindo-a.

Polifenóis presentes na dieta são geralmente considerados como antinutrientes, porém, recentes pesquisas atribuem a eles um possível efeito benéfico à saúde por agirem como antioxidantes *in vitro* (Somosa et al., 2003). O café é uma das principais fontes de compostos fenólicos da dieta, com participação dos ácidos clorogênicos.

TABELA 7 Concentração (% de peso seco) de ácidos cafeoilquínicos (CQA) em bebidas de café cru e torrado e porcentagem de variação durante a torração.

CQA	Bebidas de café							
	Descascado				Natural			
	Cru	Claro	Médio	Escuro	Cru	Claro	Médio	Escuro
3-CQA	0,943b	1,054a	0,801 c	0,392 e	0,854 bc	0,903 bc	0,625 d	0,354 e
Varição		+11,77e	-15,05 c	-58,43 a		+5,73	-26,81 b	-58,54 a
4-CQA	1,165b	1,305 a	0,800 c	0,388 d	1,106 b	1,118 b	0,773 c	0,430 d
Varição		+12,02 e	-31,32 c	-66,69 a		+1,08 d	-30,10 c	-61,12 b
5-CQA	6,942a	2,423 b	1,366 e	0,545 f	6,468 b	1,979 c	1,335 e	0,697 f
Varição		-68,08 f	-80,32 c	-92,14 a		-69,40 e	-79,36 d	-89,22 b

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey. Sinal + indica ganho; - indica perda.

#### 4.6 Poder redutor (PR)

O teste para avaliar o poder redutor baseia-se na redução do íon ferricianeto a ferrocianeto que, na presença do íon férrico, forma o azul da Prússia. Todas as amostras de bebida de café analisadas apresentaram altos valores de poder redutor (PR), o que indica atividade antioxidante (Tabela 8). O tipo de processamento do café alterou sua capacidade redutora. Houve uma redução significativa do PR com a torração ( $p < 0,01$ ), demonstrada pelo menor poder apresentado pelas amostras de torração escura. Daglia et al. (2000) não encontraram alteração significativa do poder redutor com a torração. Neste trabalho, a diminuição do poder redutor poderia ser, provavelmente, atribuída ao diferente conteúdo de polifenóis nas amostras estudadas, particularmente reduzidos após a torração (Trugo & Macrae, 1984a; 1984b).

TABELA 8 Poder redutor (%) da bebida de café descascado e natural em diferentes graus de torração.

Processamento	Grau de torração			Média
	Escuro	Médio	Claro	
Descascado	35,96	38,60	37,80	37,45A
Natural	33,65	35,80	38,40	35,95B
Média	34,80b	37,20ab	38,10a	

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si ( $p > 0,05$ ) e médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas linhas diferem entre si ( $p < 0,01$ ), pelo teste de Tukey.



#### 4.7 Poder quelante de metais

Os valores do poder quelante de  $Fe^{2+}$  estão apresentados na Tabela 9. Ficou demonstrado neste estudo que os diferentes tipos de processamento usados não interferiram no poder quelante do metal ferro apresentado pela bebida de café. Entretanto, o grau de torração influenciou o poder quelante. Houve redução significativa do poder quelante com a torração ( $p < 0,01$ ), tendo sido obtidos valores maiores para o café cru, seguido de torração clara, escura e, por fim, média.

A redução, provavelmente, se deve à redução de polifenóis e ácidos clorogênicos, contrabalançada pela formação de outras substâncias com poder quelante, como os produtos da reação de Maillard (Wijewickreme & Kitts, 1998). Assim, a bebida de café pode ser considerada como antioxidante e sua ingestão pode contribuir para a quelação de metais de transição que, em excesso, podem levar à peroxidação lipídica, com conseqüente lesão das membranas plasmáticas e oxidação do DNA. O  $Fe^{2+}$  em solução, mesmo em concentração muito baixa, induz a geração de  $HO^{\bullet}$ , por meio da reação de Fenton, pela retirada de um hidrogênio de muitas biomoléculas, causando injúria ou morte celular (Repine et al., 1979).

TABELA 9 Poder quelante da bebida de café descascado e natural em diferentes graus de torração.

Processamento	Grau de torração				Média
	Cru	Claro	Médio	escuro	
Descascado	14,97	7,84	1,04	2,95	6,70A
Natural	16,10	7,51	1,10	4,11	7,21A
Média	15,53a	7,67b	1,07d	3,53c	

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) e diferentes letras minúsculas nas linhas diferem entre si ( $p < 0,01$ ), pelo teste de Tukey.

#### **4.8 Atividade seqüestrante de radicais livres**

A atividade seqüestrante de radical DPPH das bebidas de café natural e descascado é apresentada nas Tabelas 10a e 10b. Dentre os compostos utilizados como padrão, o ácido ascórbico apresentou a maior atividade seqüestrante de radicais livres (96,50%), seguido do ácido gálico (95,33 %) e do BHT (92,09%).

As bebidas de café, na concentração de 200ppm, apresentaram alta atividade seqüestrante de radicais, com valores próximos aos dos padrões (Tabela 10a), a qual aumentou com o tratamento térmico (Tabela 10b) e do café cru para o claro. Entretanto, os graus de torração médio e escuro induziram diminuição da atividade seqüestrante em comparação ao grau claro.

A comparação do poder seqüestrante entre os dois tipos de processamento e o grau de torração mostrou diferença significativa. Os dados demonstram que não houve diferença significativa entre as bebidas de café de torração clara e o BHT, porém, todas as amostras apresentaram atividade seqüestrante menor que o ácido gálico e o ácido ascórbico ( $p < 0,001$ ).

A maior atividade seqüestrante foi obtida com bebidas de café na concentração de 200 ppm, obtendo-se diminuição significativa da atividade em concentrações menores.

TABELA 10a Atividade seqüestrante de radical DPPH das bebidas de café descascado e natural (200ppm), em quatro graus de torração, ácido ascórbico (AC), ácido gálico (AG) e butil-hidroxi-tolueno (BHT) .

CONC. (ppm)	Descascado				Natural				Padrões		
	Claro	Médio	Escuro	Cru	Claro	Médio	Escuro	Cru	AC	Ac. gálico	BHT
200	92,52 b	91,38 bc	89,12 d	87,66 e	91,94 bc	90,91 c	89,30 d	86,89 e	96,48a	95,33a	92,14 bc

Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5%.

TABELA 10b Atividade seqüestrante de radical DPPH das bebidas de café descascado e natural, em quatro graus de torração e quatro concentrações.

CONCENTRAÇÃO (ppm)	Descascado				Natural				Média
	Claro	Médio	Escuro	Cru	Claro	Médio	Escuro	Cru	
25	27,43a	22,30bc	19,74cd	17,69de	23,71b	22,35bc	20,18cd	15,35f	21,09 D
50	51,63a	43,79c	39,73d	34,06e	46,81b	42,01cd	34,30e	33,85e	40,77 C
100	88,27a	84,37b	78,43c	67,69d	86,30ab	83,89b	69,02d	66,65d	78,08 B
200	92,52 a	91,38 abc	89,12 cd	87,66d	91,94 ab	90,91 abc	89,30 bcd	86,89d	89,97 A
<b>MÉDIA</b>	64,96a	60,46c	56,75d	51,77f	62,19b	59,79c	53,20e	50,69f	

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas e letras minúsculas diferentes nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

O DPPH é um radical estável com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. Assim sendo, apenas agentes redutores fortes são capazes de reagir com radicais estáveis em um modo estequiométrico (Schwarz et al., 2001). Portanto, os resultados deste método indicam o potencial antioxidante do composto em estudo, tanto no sentido de prevenir a etapa de iniciação como de inibir a etapa de propagação de reações de oxidação, como da peroxidação lipídica e oxidação do DNA.

Neste estudo, as bebidas de café apresentaram atividade seqüestrante de radicais DPPH, que aumentou com a torração. Os resultados sugerem que a formação de antioxidantes induzido pelo tratamento térmico poderia equilibrar a redução de compostos fenólicos naturalmente presentes na bebida de café. Ohnishi et al. (1994) relataram que os isômeros do ácido cafeoilquínico apresentaram forte atividade antioxidante e o efeito seqüestrante de radical DPPH, tendo os 3- e 4-CQA apresentado mais atividade seqüestrante que o 5-CQA. No presente trabalho, verificou-se que as concentrações de 3- e 4-CQA aumentaram com a torração, o que poderia explicar, pelo menos em parte, o aumento da atividade seqüestrante aqui observada. Borrelli et al. (2002) correlacionaram o aumento da atividade seqüestrante de radical DPPH do café de torração clara às melanoidinas, formadas durante a torração. Anese & Nicoli (2003) encontraram maior atividade seqüestrante para o café de torração escura.

#### **4.9 Atividade de guaiacol-peroxidase *in vitro***

Os resultados da Tabela 11 mostram o efeito da torração e da variação da concentração da bebida de café sobre a atividade da peroxidase *in vitro*. Os resultados demonstram que a inibição da peroxidase está diretamente correlacionada com o aumento da concentração da bebida. O aumento do grau de torração, para a maioria das concentrações de bebida analisadas, induziu à diminuição da inibição da peroxidase. Este efeito da torração não teve relação

com o tipo de processamento do café.

O ensaio da atividade da peroxidase *in vitro* avalia a presença de um doador de elétrons capaz de reduzir o peróxido de hidrogênio, indicando atividade antioxidante. As bebidas de café inibiram a oxidação do guaiacol. Seu mecanismo de ação pode incluir a inibição enzimática, a doação de elétrons, atuando como antioxidante ou ainda seqüestrante de água oxigenada.

Kato et al. (2003) verificaram que compostos fenólicos antioxidantes inibiram a atividade *in vitro* de peroxidase de neutrófilo humano. Estes autores sugeriram a ocupação do sítio ativo da enzima pelo composto fenólico e ou a atividade seqüestrante. Contudo, o mecanismo de ação dos compostos fenólicos não foi elucidado. Tatsuzawa et al. (1999) verificaram que compostos fenólicos atenuaram a lesão hepática por reperfusão em ratos, pela inibição da atividade de peroxidase. Em contraste, o teste também poderia sugerir um efeito inibitório da atividade da peroxidase. Porém, Itagaki et al. (1992) demonstraram que a adição de peroxidase inibiu a mutagenicidade apresentada pela bebida de café, indicando que o café não atua como inibidor da peroxidase. A peroxidase faz parte do sistema de defesa antioxidante. Contudo, a ativação excessiva, principalmente durante a reação inflamatória pode levar à formação de radicais tirosil, que podem oxidar lipídeos e proteínas (Kato et al., 2003).

A inibição da oxidação do guaiacol foi dependente da concentração da bebida de café, aumentou com a torração e não apresentou diferença significativa com o processamento. Trabalhos prévios demonstraram também o aumento da atividade antioxidante de bebidas de café com o aumento da concentração (Nicoli et al., 1997a; Daglia et al., 2000; Yanagimoto et al., 2002).

Contudo há controvérsias em relação ao grau de torração e a atividade antioxidante (Nicoli et al., 1997a; Daglia et al., 2000; Richelli et al., 2001; Borrelli et al., 2002; Anese & Nicoli, 2003).

TABELA 11 Inibição da atividade de guaicol-peroxidase (%) pela bebida de café descascado e natural em diferentes concentrações e graus de torração.

Concentração (ppm)	Descascado			Natural			Média
	Claro	Médio	Escuro	Claro	Médio	Escuro	
10.000	9,28 abD	7,57 abcD	6,18 bcD	10,73 aD	6,82 abcD	4,47 cD	7,51 D
20.000	17,57 aC	15,39 bcC	11,23 cdC	18,64 abC	13,10 cdC	10,36 dC	15,13 C
30.000	30,83 bB	29,90 bB	24,80 cdB	36,07 aB	29,30 bcB	22,30 dB	28,86 B
40.000	39,36 abA	35,24 bcA	31,76 cdA	42,03 aA	39,85 aA	28,61 dA	36,14 A
<b>Média</b>	25,38 a	22,08 b	18,49 c	26,87 a	22,26 b	16,43 c	

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna indicam  $p < 0,01$ , pelo teste de Tukey e médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas indicam  $p < 0,01$ , pelo teste de Tukey.

Avaliando-se os dados do presente trabalho, verifica-se que o café claro apresentou a capacidade mais alta de inibir a oxidação do guaiacol. Esta aparente controvérsia pode ser atribuída ao método de análise e preparo da bebida. Nicoli et al. (1997a) demonstraram que a bebida de torração médio-escura apresenta maior atividade antioxidante. Porém, os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  apresentados por esses autores se assemelha aos parâmetros do café de torração clara deste trabalho. No estudo de Nicoli et al. (1997), a atividade antioxidante foi inversamente correlacionada com o grau de torração, como demonstrado também por Anese & Nicoli (2003). O comportamento antioxidante dependente do grau de torração pode, provavelmente, ser atribuído à redução de compostos fenólicos e à sucessiva formação de outros compostos antioxidantes, como os produtos da reação de Maillard.

#### **4.10 Inibição da peroxidação de lipídeos *in vitro***

As bebidas de café nas concentrações de 200, 2.000 e 20.000 ppm inibiram a peroxidação lipídica (Tabela 12). Contudo, a concentração de 20 ppm não apresentou atividade inibitória da lipoperoxidação. Assim, a capacidade de inibir a peroxidação lipídica mostrou-se concentração-dependente.

O processamento do café alterou a capacidade de inibir a peroxidação lipídica. O café descascado apresentou maior atividade antioxidante, que o café natural, provavelmente pelo maior teor de ácidos clorogênicos apresentados por este tipo de processamento.

Foi observada uma relação inversa entre a capacidade das bebidas de café inibirem a lipoperoxidação e o grau de torração (Tabela 12). Isto poderia ser atribuído, pelo menos em parte, à redução de polifenóis com a torração. Richelle et al. (2001) também observaram que as bebidas de café podem inibir a oxidação de lipídeos, resultado, provavelmente, devido à ação de vários compostos

polifenólicos. Nicoli et al. (1997b), utilizando o teste de Rancimat, demonstraram que bebidas de café podem suprimir a oxidação de lipídio, com a atividade máxima para o café torrado médio-escuro que corresponde às amostras de café de torração claras do presente trabalho.

Daglia et al. (2000), analisando a capacidade protetora da bebida de café contra peroxidação de lipídio microsomal em fígado de ratos, observaram que as amostras apresentaram atividade protetora semelhante. Os mesmos autores usando outro teste, baseado em oxidação conjunta de  $\beta$ -caroteno e ácido linoleico, observaram aumento na capacidade de inibição da peroxidação de lipídeos das bebidas de café, com a torração. Resultados semelhantes foram obtidos por Borrelli et al. (2002), que observaram a redução da peroxidação do ácido linoleico em cultura de células, com o aumento da torração.

TABELA 12 Inibição da peroxidação de lipídeos *in vitro* de bebidas de café natural e descascado em três graus de torração e três concentrações.

Conc. (ppm)	Descascado			Natural			Média
	Claro	Médio	Escuro	Claro	Médio	Escuro	
200	6,15aC	7,28aC	6,16aC	7,23aC	7,40aC	5,42aC	6,61C
2.000	37,92abB	39,69abB	32,37bB	37,54abcB	35,12bcdB	33,87cdB	36,09B
20.000	55,64abA	58,70aA	52,29bA	55,16abA	54,35bA	53,34bA	54,92A
<b>Média</b>	<b>33,24ab</b>	<b>33,22ab</b>	<b>30,27c</b>	<b>33,31ab</b>	<b>32,29bc</b>	<b>30,88c</b>	

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna indicam  $p < 0,01$ , pelo teste de Tukey e médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas indicam  $p < 0,01$ , pelo teste de Tukey.



#### 4.11 Inibição da peroxidação de lipídeos *in vivo*

As análises das Tabelas 13, 14 e 15 mostram que a bebida de café inibiu significativamente a peroxidação lipídica *in vivo*, quando administrada por 7 dias (48,60%) e por 30 dias (53,40%), o que foi evidenciado pela diminuição da concentração de dialdeído malônico, quando comparada ao controle. No entanto, não houve diferença significativa entre as porcentagens de inibição da peroxidação dos tratamentos por 7 e 30 dias (Tabela 15).

Tendo em vista que no teste *in vitro*, o café descascado escuro apresentou a menor atividade de inibição da peroxidação lipídica, testou-se esta bebida *in vivo*. Os resultados demonstraram que esta bebida foi eficiente e inibiu a lipoperoxidação, com maior atividade quando administrada por 7 ou 30 dias consecutivos. Tendo em vista que as análises foram feitas em homogeneizado de cérebro, os resultados *in vivo* permitem sugerir que componentes da bebida de café seriam capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, podendo atuar como antioxidantes. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios *in vitro* indicando que o café protege contra a peroxidação de lipídeos dependendo do método de análise e de preparação da bebida (Yamato, 2002).

TABELA 13 Concentração média das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  proteína), em ratos tratados com a bebida de café descascado escuro (7 dias) e controle (água).

Tratamento (7 dias)	TBARS ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína)
Controle	0,3865 a
Bebida de café	0,2019 b

Médias seguidas por letra minúscula diferentes na coluna diferem entre si a 1% pelo teste de F.

TABELA 14 Concentração média das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  proteína) em ratos tratados com a bebida de café descascado escuro (30 dias) e controle (água).

Tratamento (7 dias)	TBARS ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ proteína)
Controle	0,5553 a
Bebida de café	0,2682 b

Médias seguidas por letra minúscula diferentes na coluna diferem entre si a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 15 Médias da Inibição da peroxidação de lipídeos (%) *in vivo* pela bebida de café.

TRATAMENTO (dias)	INIBIÇÃO (%)
7	48,60
30	53,40

#### 4.12 Parâmetros bioquímicos

A ingestão de 570 ppm/kg diários da bebida de café por 30 dias não produziu modificação no nível plasmático dos parâmetros bioquímicos analisados (Tabela 16).

Estudos recentes têm analisado a relação entre o consumo de café e níveis plasmáticos de colesterol, porém, detalhes sobre o tipo de café e o método de preparo da bebida responsável pela ação são pouco identificados. Também, tem-se estudado a associação entre polifenóis, a concentração de terpenóides do café e níveis de colesterol do plasma (Thelle et al., 1987; Natella et al., 2002). Neste estudo, utilizou-se rato como modelo experimental, pois é considerado um modelo animal para se estudar o efeito de compostos sobre os níveis de colesterol (Terpstra et al., 2000). Resultados semelhantes foram obtidos por

Natella et al. (2002), utilizando bebidas de café em concentrações maiores que as do presente trabalho.

Ito et al. (1998) e Maeng et al. (2004) também não encontraram alterações significativas nos níveis séricos de colesterol, triglicérides e HDL em indivíduos após a ingestão de 5 copos de café por dia, durante quatro semanas. O estudo realizado por Yukawa et al. (2004) revelou redução no colesterol total, MDA, porém, não houve alterações significativas nos níveis séricos de HDL-colesterol e triglicérides após ingestão de 8g de café arábica, por 4 semanas.

**TABELA 16** Parâmetros bioquímicos determinados no soro de rato controle e tratados com bebida de café (570 ppm/kg/dia) por 30 dias.

<b>PARAMETROS</b>	<b>CONTROLE (mg/dL)</b>	<b>TRATADO (mg/dL)</b>
Colesterol total	84,60	74,80
Colesterol HDL	22,54	22,21
Triglicérides	107,60	92,40
Ácido úrico	1,48	1,11

Richelle et al. (2001) observaram que a bebida de café diminuiu a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e houve redução na capacidade antioxidante de bebidas de café com aumento no tempo de torração, atribuída à perda de compostos polifenólicos. De acordo com McAnlins et al. (1998), o café não afeta o nível de lipídeos e a susceptibilidade de oxidação de LDL, indicando que o seu consumo pode proteger contra aterosclerose.

Modificações significantes na concentração de colesterol foram encontradas em outros estudos após a ingestão de café ou componentes isolados, como o ácido clorogênico, em concentrações maiores que as utilizadas no presente trabalho (Thelle et al., 1987). Estudos comprovaram que o aumento de colesterol deve-se à ingestão de cafestol e caveol, ambos presentes na fração lipídica do café (Terpstra et al., 2000). Estudos epidemiológicos conduzidos na Suécia (maior consumidor *per capita*) indicam que a ingestão freqüente de café aumenta os níveis de colesterol no plasma (Terpstra et al., 2000). Estes resultados podem ser atribuídos à composição do café, bem como ao modo de preparo da bebida. Daglia et al. (2000) demonstraram que o café robusta apresenta maior teor de cafeína, enquanto o caveol e cafestol estão presentes em maiores concentrações no café arábica. O modo de preparo pode permitir que esses compostos lipídicos estejam em maior ou menor concentração na bebida. Quando o café é filtrado, a pequena fração lipídica que permanece na superfície da bebida aquosa é totalmente retida no filtro. Os povos escandinavos preferem o café turco, enquanto que, na maioria dos países, o hábito predominante é o consumo de café filtrado, o que explica a ocorrência desse fenômeno naquela região (Trugo, 2001).

Tem sido demonstrado aumento de ácido úrico no plasma após administração de bebidas e alimentos ricos em fenóis (Natella et al., 2002). Este aumento poderia ser atribuído à interferência de fenóis na secreção e reabsorção de ácido úrico. Contudo, Leenen et al. (2000) não relataram aumento de ácido

úrico após a suplementação com chá preto e verde em humanos. No presente estudo, não foi observado aumento de ácido úrico após a ingestão de café, podendo-se pressupor que o café não precisa ser incluído na restrição alimentar de pacientes com gota.

#### **4.13 Parâmetros hematológicos**

Não foram observadas alterações significativas nos animais tratados com café, quando comparadas ao grupo controle (Tabela 17).

Compostos encontrados em vegetais, chá e café, como polifenóis e fitatos, podem inibir a absorção de ferro (Disler et al., 1975; Gillooly et al., 1984), devido à formação de complexos (Zijp et al., 2000). Crianças israelitas que ingeriram chá tiveram um aumento significativo de anemia microcítica (Mork et al., 1983). Layrisse et al. (2000b) verificaram que polifenóis presentes em café e chá inibiram a absorção de ferro de maneira dose-dependente. Neste estudo, a ingestão de café por 30 dias não levou ao aparecimento de anemia, indicando que o consumo de café, mesmo que possa reduzir a absorção de ferro, não alterou os níveis de hemoglobina em ratos saudáveis, com dieta equilibrada.

TABELA 17 Parâmetros hematológicos de ratos, após a ingestão da bebida de café por 30 dias (570 ppm/kg/dia).

PARAMETROS	CONTROLE	TRATADO
Hemácias ( $10^9/\text{mm}^3$ )	7,30	7,30
Hemoglobina (g/dL)	14,46	14,42
Hematocrito (%)	43,15	42,57
VCM (fL)	56,90	56,80
HCM (pg)	19,47	19,76
CHCM (%)	34,15	33,70
Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	5,22	5,30
Linfócitos, (%)	71,60	72,64
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )	746,30	720,54

VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração hemoglobínica corpuscular média.

#### 4.14 Teste do micronúcleo de eritrócitos de medula óssea de rato

Nas Tabelas 18 e 19 é mostrado o efeito protetor da bebida de café contra os danos ao DNA induzidos pela ciclofosfamida. Foi observada redução significativa ( $p < 0,01$ ) da frequência de MNE (eritrócitos micronucleados) em amostras de células de medula óssea de animais que receberam ciclofosfamida, após a ingestão de café. Entretanto, não houve diferença significativa entre a porcentagem de inibição da formação de MNE após a ingestão de café por 7 dias (28,64%) e por 30 dias (37,82).

TABELA 18 Frequência de eritrócitos micronucleados (MNE) e relação de eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE) em medula óssea de ratos que ingeriram 570 ppm/kg/dia de bebida de café descascado claro e escuro, por 7 dias.

TRATAMENTO	MNE	PCE/NCE
Controle (água)	3,6 a	1,32 a
Ciclofosfamida	39,8 b	0,96 b
Café claro (mg/kg)	2,6 a	1,36 a
Café escuro (mg/kg)	3,6 a	1,28 a
Café claro + ciclofosfamida	26,6 c	1,05 b
Café escuro + ciclofosfamida	28,4 c	1,04 b

Média seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam  $p < 0,01$  pelo teste de Tukey.

TABELA 19 Frequência de eritrócitos micronucleados (MNE) e relação de eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE) em medula óssea de ratos que ingeriram 280 mg/kg/dia de bebida de café descascado claro e escuro, por 30 dias.

TRATAMENTOS	MNE	PCE/NCE
Controle (água)	3,33 a	1,32 a
Ciclofosfamida	32,16 b	0,99 b
Café escuro (mg/kg)	3,83 a	1,29 a
Café escuro + ciclofosfamida	20,0 c	1,09 b

Média seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam  $p < 0,01$  pelo teste de Tukey.

Quanto à citotoxicidade, determinada pela relação PCE/NCE, não foi observada diferença significativa entre os resultados dos animais que ingeriram café e o controle negativo (água). Contudo, houve diferença significativa entre o controle negativo e o grupo que recebeu a ciclofosfamida ( $p < 0,01$ ), comprovando que a concentração de ciclofosfamida administrada foi suficiente para exercer ação tóxica para as células da medula óssea. A ingestão das bebidas de café claro e escuro, antes da administração da ciclofosfamida, não preveniu a citotoxicidade do agente mutagênico; no entanto, a ingestão da bebida de café por 30 dias foi mais efetiva que por 7 dias.

Os chamados agentes mutagênicos, os quais alteram a seqüência de bases no DNA, aceleram o aparecimento de mutações e, por uma questão de estatística, este aumento está associado ao desenvolvimento dos tumores (Camargo, 2002). Os efeitos genotóxicos e mutagênicos do café têm sido demonstrados em bactérias e em culturas de células de mamíferos. Contudo, *in vivo* o efeito mutagênico do café não foi comprovado, pois as enzimas desintoxicantes de mamíferos, homogeneizado de fígado, catalase e peroxidase parecem inibir o efeito mutagênico do café (Nehlig & Debry, 1994; Stadler et al., 1994).

Neste estudo, usando teste do micronúcleo, as bebidas de café não apresentaram efeito genotóxico ou citotóxico, mesmo quando o café foi ingerido por 30 dias consecutivos. Ao contrário, as bebidas de café preveniram as lesões do DNA causadas pela ciclofosfamida, mas não o efeito citotóxico do agente mutagênico. A presença, no café, de um sistema efetivo de inativação de compostos mutagênicos é uma possível explicação dos resultados observados. Estes resultados estão de acordo com os relatos sobre o efeito antígenotóxico do café na presença de carcinógenos conhecidos, como uretano, N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina, aflatoxina, entre outros (Abraham, et al., 1998 ; Abraham & Stopper, 2004; Abraham, 1991). Abraham (1995), testando o efeito do café



instantâneo (100 mg/kg), não verificou efeito antigenotóxico. Isto, possivelmente, pode ser explicado pela baixa concentração de café instantâneo utilizado, mostrando relação concentração-efeito. Segundo Kosugi et al. (1983), o café cru não possui efeito mutagênico, o qual é adquirido com a torração (Dorado, 1987).

#### **4.15 Parâmetros hematológicos em relação à ciclofosfamida**

A análise dos parâmetros hematológicos de ratos que receberam a bebida de café por 30 dias encontra-se na Tabela 20.

Nenhuma alteração significativa foi observada entre os grupos: ciclofosfamida e café + ciclofosfamida ( $p>0.05$ ), embora possa verificar uma tendência em reduzir o efeito da ciclofosfamida pelo café nos leucócitos e linfócitos em ratos tratados por 30 dias.

Apesar de ter reduzido a relação PCE/NCE, não houve redução significativa do número de hemácias, pois a vida média desta célula no sangue periférico é alta e necessitaria de doses repetidas de ciclofosfamida para demonstrar o seu efeito citotóxico. Além do mais, a variabilidade biológica entre os animais é grande o suficiente para não demonstrar o efeito citotóxico de uma única administração de ciclofosfamida em hemácias. Como a vida média de leucócitos é pequena, esta célula é o melhor indicador do efeito citotóxico da ciclofosfamida, principalmente linfócitos, que são o seu principal alvo. Quanto ao número de plaquetas, a ciclofosfamida tem menor efeito sobre estas células que outros agentes alquilantes (Goodman, 1995).

O consumo de café por 30 dias não alterou o crescimento em relação ao peso corporal dos ratos tratados (93,4 g), quando comparados ao controle (90,7g), indicando que a ingestão de café não afetou o crescimento de animais ( $p>0,05$  teste t).

TABELA 20 Resultados hematológicos em ratos após o consumo da bebida de café escuro por 30 dias.

PARÂMETROS HEMATOLÓGICO	CONTROLE (ÁGUA)	CAFÉ	CAFÉ + CF	CF
Hemácias(mm <sup>3</sup> /sg)	7,53 a	7,49 a	7,79 a	7,89 a
Leucócitos(mm <sup>3</sup> /sg)	6,26 a	6,52 a	3,46 b	2,54 b
Plaquetas(mm <sup>3</sup> /sg)	869,20 a	952,50 a	778,0 0 a	809,00 a
Linfócitos (mm <sup>3</sup> /sg)	4,24 a	4,58 a	1,81 b	1,36 b

Média seguidas por letras diferentes na mesma linha indicam  $p < 0,01$  pelo teste de Tukey  
CF = ciclofosfamida.

#### 4.16 Considerações gerais

O presente estudo mostrou que as bebidas de café apresentaram atividade antioxidante, mesmo em concentrações mais baixas que as consumidas diariamente por humanos. Parece que a relação entre a atividade antioxidante e o grau de torração varia de acordo com o tipo de café, as condições de torração, o procedimento de extração e o método antioxidante. Assim, a utilização de vários métodos para avaliar a atividade antioxidante parece importante, pois, compostos antioxidantes presentes na bebida têm diferentes mecanismos de ação. O grau de torração induziu diminuição da atividade, no entanto, ainda permaneceu alta. Isto pode ser explicado pela formação de compostos pró-oxidantes e ou antioxidantes durante o tratamento térmico. Os estágios iniciais da reação de Maillard, a mais importante para o escurecimento não-enzimático de alimentos, são responsáveis pela formação de pró-oxidantes, enquanto que os estágios avançados fornecem compostos antioxidantes (Manzocco et al., 2001).

O mecanismo preciso pelo qual o café exerceu seu efeito antígenotóxico não foi determinado. No entanto, o presente trabalho indica que esta bebida e seus constituintes podem inibir a formação de compostos genotóxicos e

carcinogênicos ou mesmo bloquear a reação de tais agentes com as células-alvo. A atividade antioxidante demonstrada pode também contribuir para a ação antigenotóxica da bebida de café.

## 5 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos nesta pesquisa permitiram concluir que:

- a bebida de café apresenta atividade antioxidante e esta é dependente da concentração;
- a atividade antioxidante diminui com a torração, embora permaneça alta e isto pode ser atribuído, pelo menos em parte, à redução de polifenóis durante o processo de torração;
- o tipo de processamento de café influenciou na atividade antioxidante da bebida de café, em relação aos parâmetros poder redutor e peroxidação lipídica;
- a bebida de café filtrado diminuiu a peroxidação lipídica em cérebro de rato *in vitro* e *in vivo*;
- a bebida de café descascado, provavelmente, por ter maior concentração de polifenóis, entre eles o ácido cafeoilquínico, apresentou maior atividade contra a peroxidação lipídica e maior poder redutor que a bebida de café natural.;
- não houve alteração de parâmetros hematológicos e bioquímicos após a ingestão da bebida de café descascado escuro por 30 dias;
- a bebida de café descascado, administrada em ratos por 7 e 30 dias, apresentou proteção contra o efeito genotóxico da ciclofosfamida;
- a bebida de café descascado não apresentou proteção contra o efeito citotóxico da ciclofosfamida;
- o grau de torração não influenciou na proteção contra o efeito genotóxico e citotóxico da ciclofosfamida após 7 dias de ingestão da bebida de café por ratos;
- a ingestão de café filtrado pode ter efeito benéfico para a saúde

humana, por ter atividade redutora, quelante de metais, seqüestrante de radicais livres, inibitória da peroxidação lipídica e da ação de agentes mutagênicos, além de não interferir nos níveis de colesterol total, HDL, triglicérides e ácido úrico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABID-ESSEFI, S.; OUANES, Z.; HASSEN, W.; BAUDRIMONT, I.; CREPPY, E.; BACHA, H. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. **Toxicology in Vitro**, Oxford, n. 4, Aug. 2004.

ABRAHAM, S. K. Inhibition of *in vivo* genotoxicity by coffee. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 27, n. 12, p. 787-792, Dec. 1989.

ABRAHAM, S. K. Inhibitory effects of coffee on the genotoxicity of carcinogens in mice. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 262, n. 2, p. 109-114, Feb. 1991.

ABRAHAM, S. K. Inhibition effects of coffee on transplacental genotoxicity in mice. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 347, n. 1, p. 45-52, June 1995.

ABRAHAM, S. K. Anti-genotoxic effects in mice after the interaction between coffee and dietary constituents. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 15-20, Jan. 1996.

ABRAHAM, S. K.; SINGH, S. P.; KESAVAN, P. C. *In vivo* antigenotoxic effects of dietary agents and beverages co-administered with urethane: assesment of the role of glutathione S-transferase activity. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 413, n. 2, p. 103-110, Mar. 1998.

ABRAHAM, S.K.; STOPPER, H. Anti-genotoxicity of coffee agains N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse lymphona cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 561, n. 1, p. 23-33, 2004.

AESCHBACHER, H. U.; WURZNER, H. P. An Evaluation of instant and regular coffee in the Ames mutagenicity test. **Toxicology Letters**, Clare, v. 68, n. 2, p. 139-145, 1980.

AESCHBACHER, H. U.; CHAPPUIS, C.; WURZNER, H. P. Mutagenicity testing of coffee: a study of problems encountered with the Ames Salmonella test system. **Food and Cosmetic Toxicology**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 605-613, 1980.

AESCHBACHER, H. U.; RUCH, E.; MEIRE, H.; WURGLER, F. E. Instant and brewed coffees in the citro human lymphocyte mutagenicity test. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 747-752, 1985.

AESCHBACHER, H. U.; JACCAUD, E. Inhibition by coffee of nitrosourea-mediated DNA damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 633-637, Sept. 1990.

ALBERTINI, S.; FRIEDERICH, U.; SCHLATTER, C.; WURGLER, F. E. The influence of roasting procedure on the formation of mutagenic compounds in coffee. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 593-595, June 1985.

AMES, B. Dietary carcinogens and anticarcinogens. **Science**, Washington, v. 221, n. 4617, p. 1256-1264, 1983.

AMES, B. N. The measurement of oxidative damage in humans: relation to cancer and aging. In: HAYAISHI, O.; NIKI, E.; KONDO, M.; YOSHIKAWA, T. (Eds.). **Medical, biochemical and chemical aspects of free radicals**. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 1453-1460.

ANDUEZA, S.; CONCEPCTÓN C. Chemical and sensorial characteristics of expresso coffee as affected by grinding and torrefacto rost. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 51, p. 7034-7039, 2003.

ANDUEZA, S.; PAZ DE PEÑA. M.; CONCEPCTÓN C.; NICOLI, M. C. Comparison of antioxidant and pro-oxidant activity in coffee beverages prepared with conventional and "Torrefacto" coffee. **Lebensmittel-Wissenschaft, und – Technologie-Food-Science**, Stuttgart, n. 8, 2004.

ANESE, M.; NICOLI, M. C. Antioxidant properties of ready-to-drink coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 942-946, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analyses of the Association of Official Analytical Chemists**. 15. ed. Washington, 1990. 684 p.

ARO, A.; TUOMILEHTO, J.; KOSTIALNEN, E.; UUSITALO, U.; PIETINEN, P. Boiled coffee increases serum low density lipoprotein concentration. **Metabolism Clinical and Experimental**, Philadelphia, v. 36, n. 11, p. 1027-1030, Nov. 1987.

ARO, A.; TEIRILA, J.; GREF, C. G. Dose dependent effect of serum cholesterol and apoprotein B concentrations by consumption of boiled, nonfiltered coffee. **Atherosclerosis**, Clare, v. 83, n. 2-3, p. 257-261, Aug. 1990.

ARUOMA, O. i. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 523-524, p. 9-20, Feb./mar. 2003.

AUROMA, O.I. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.73, p.1617-1625, 1996.

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

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

BENZIE, I. E. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **International Journal of Food Science and Nutrition**, Abingdon, v. 47, n. 3, p. 233-261, May 1996.

BERLINER, J. A.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A. M.; FRANK, J. S.; DEMER, L. L.; EDWARDS, P. A.; WATSON, A. D.; LUSIS, A. J. Atherosclerosis: basic mechanism: oxid inflammation and genetic. **Circulation**, Dallas, Philadelphia, v. 91, n. 32, p. 2488-2496, July 1995.

BLOCK, G. et al. Fruit, Vegetables, and Cancer Prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition Cancer an International Journal**, mahwah, v. 18, n. 1, p. 1-29, 1992.

BORRELLI, R. C.; VISCONTI, A.; MENNELLA, C.; ANESE, M.; FOGLIANO, V. Chemical characterization and antioxidant properties of coffee melanoidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 22, p. 6527-6533, Oct. 2002.

BOUBLIK, J. H.; QUINN, M. J.; CLEMENTS, J. A.; HERINGTON, A. C.; WYNNE, K. N.; FUNDER, J. W. Coffe contains potent opiate receptor-binding activity. **Nature**, London, v. 301, n. 5897, 1983.



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

BRANDO, C. H. J. Cereja descascado, desmucilado, fermentado, despulpado ou lavado? In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 25., 1999, Franca. **Anais...** Rio de Janeiro: MAARA/PROCAFÉ, 1999. p.342-346.

BROTH, A.; THOMSON, C. A. Position of the American Dietetic Associations: phytochemicals and functional foods. **Journal American Dietetic Association**, v. 95, p. 493-496, 1995.

CAMARGO, A. C. O que é câncer? [S. l.]: CTPHC, 2002. Disponível em: <<http://hcanc.org.br/crom1.html>>. Acesso em: 23 jun. 2002.

CAPPUCCIO, R.; SUGGI LIVERANI, F. Computer simulation as a tool to model coffee brewing cellular automata for percolation process; 2D and 3D Techniques for fluid-dynamic simulations. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON THE CHEMISTRY OF COFFEE, 18., 1999, Helsinki, Finland. **Proceeding...** ASIC: Paris, 1999. p 173-178.

CASTILLO, M. D.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 13, June 2002.

CAVIN, C.; HOLZHAUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W. W.; SCHILTER, B. Cafestol and Kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 8, p. 1155-1163, Aug. 2002.

CAVIN, C.; BEZENCON, C.; GUIGNARD, G.; SCHILTER, B. Coffee diterpenes prevent benzo[ $a$ ]pyrene genotoxicity in rat and human culture systems. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 306, n. 2, p. 488-495, June 2003.

CHEFTEL, J.C.; CHEFTEL, H. In: **Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los alimentos**. Acribia, Zaragoza, 1988, 333 p.

CHUNG, S.K.; OSAKA, T.; KAWASISHI, S. Hydroxy radical-scavengers from brown ustad (*Brassica nigra*). **Bioscience Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 118-123,

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

CLARKE, R. J. Extration. In: CLARKE ; MACRAE. **Coffee Technology**. New York: Elsevier Applied Science, 1987. p. 109-144.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamate-nature occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of. Food and Agriculture**, Washington, v. 79, n. 3, p. 362-372, Mar. 1999.

CLIFFORD, M. N.; WIGHT, J. The measurement of feruloylquinic acids and caffeoylquinic acids in coffee beans. Development of the technique and its preliminary application to green coffee beans. **Journal of the Science of. Food and Agriculture**, Washington, v. 27, n. 1, p. 73-84, Jan./Feb. 1976.

CLIFFORD, M. N.; OHIOKPEHAI, O. Coffee astringency. **Food Analysis**, v. 20, p. 83-86, 1983.

CLIFFORD, M. N. Chemical and Physical Aspect of Green Coffee and Coffee Products. In: CLIFFORD, M. N.; WILSSON, K. C. (Eds.). **Coffee, Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage**. London: Croomheim, 1985. p. 305-359.

PORTO, C.; NICOLI, M. C.; SEVERINI, C.; SENSIDONI, A.; LERICI, C. R. Study on physical and physicochemical changes of coffee beans during roasting. Note 2. **Italian Journal of Food Science**, v.3, p.197-207, 1991.

DAGLIA, M.; STOPPINI, G.; CUZZONI, M. T.; DACARRO, C. Antibacterial activity of coffee. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 42, n. 10, p. 2270-2272, Oct. 1994.

DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; DACARRO, C.; GAZZANI, G. Isolation of na antibacterial component from roasted coffee. **Journal Pharmaceutical Biometical Analysis**, Oxford, v. 18, n. 1-2, p. 219-225, 1998.

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

DART, S. K.; NURSTEN, H. E. In: \_\_\_\_\_. **Coffee: chemistry**. London: Elsevier Applied Science, 1985.

DEVASAGAYAM, T. P. A.; KAMAT, J. P.; HARI, M.; KESAVAN, P. C. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, Paris, v. 1282, n. 1, p. 63-70, 1996.

DISLER, P. B.; LYNCH, S. R.; CHARLTON, R. W.; TORRANCE, J. D.; BOTHWELL, T. H. The mechanism of the inhibition of iron absorption by tea. **South African Journal of Marine Science**, Pretoria, v. 40, p. 109-116, 1975.

DONNELLY, J. K.; ROBINSON, D. S. Invited review: free radicals in foods. **Free Radical Research**, Reading, v. 22, n. 2, p. 147-176, 1995.

DORADO, G.; BARBANCHO, M.; PUEYO, C. Coffee is highly mutagenic in the L-arabinose resistance test in *Salmonella typhimurium*. **Environmental Mutagenesis**, New York, v. 9, n. 3, p. 251-260, 1987.

DUARTE, M. P.; LAIRES, A.; GASPAR, J.; LEÃO, D.; OLIVEIRA, J. S.; RUEFF, J. Genotoxicity of instant coffee: possible involvement of phenolic compounds. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 442, n. 1, p. 43-51, June 1999.

☞ DUTHIE, G. G. Lipid peroxidation. **European Journal of Clinical Nutrition**, Hampshire, v. 47, n. 11, p. 759-764, 1993.

DUTHIE, G. G.; BROWN, K. M. Reducing the Risk of Cardiovascular Disease, ch 2, p. 19-38, In: GOLDBERG, I. (Ed.). **Functional Foods**. Chapman and Hall: New York, 1994.

EL GHISSASSI, F., BARBIN, A., NAIR, A.; ARTSCH, H. Formation of 1,N<sup>6</sup>-ethenoadenine and 3,N<sup>4</sup>-ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases. **Chemical Research and Toxicology**, v. 8, n. 2, p. 279-283, Mar. 1995.

ELIZALDE, B. E.; BRESSA, F.; DALLA ROSA, M. Antioxidative action of Maillard reaction volatiles: Influence of Maillard solution browning level. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 69, n. 4, p. 331-334, Apr. 1992.

✕ ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 57, n. 5, p. 779-786, May, 1993. Supplement.

- ESTERBAUER, H.; GEBICKI, J.; PUHL, H.; JURGENS, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 13, p. 341-390, 1992. Resumo.
- FRANKEL, E.N.; HUANG, S.W.; KANNER, J.; GERMAN, J. B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 42, p. 1054-1059, 1994.
- FUJITA, Y.; WAKABAYASHI, K.; NAGAO, M.; SUGIMURA, T. Characteristics of major mutagenicity of instant coffee. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 142, p. 145-148, 1985a.
- FUJITA, H.; WAKABAYASHI, K.; NAGAO, M.; SUGIMURA, T. Implication of hydrogen peroxide in the mutagenicity of coffee. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 144, p. 227-230, 1985b.
- FUNG, V. A.; HUGHES, T. J.; KIRBY, P. E.; DUNKEL, V. C. Mutagenic activity of some coffee flavor ingredients. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 204, n. 2, p. 219-228, Feb. 1988.
- GEORGE, E., WOOTTON, A. K., GATEHOUSE, D.G. Micronucleus induction by azobenzene and 1,2-dibromo-3-chloropropane in rat: Evaluation of a triple-dose protocol. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 324, n. 3-4, p. 129-134, June/Aug. 1990.
- GILLOLY, M.; BOTHWELL, J. D.; TORRANCE, A. P.; DERMAN, D. P.; CHARLTON, R. W.; MILLS, W.; BEZWODA, W. R. The effects of organic acids, phytates and polyphenols on absorption of iron from vegetables. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 49, n. 3, p. 331-342, May 1984.
- GIOVANNUCCI, E. Meta-análise of coffee consumption and risk of colorectal cancer. **American Journal Epidemiology**, Baltimore, v. 147, n. 2, p. 1043-1052, Jan. 1998.
- GOMES, F. P. **Curso de Estatística Experimental**. São Paulo: Nobel, 1990. p. 96-125. Experimentos Fatoriais.
- GOODMAN, A.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996. 1436 p.

GOUVÊA, C. M. C. P. Oxidações biológicas e atividade vegetal. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.p. 101-124.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E. Investigation of coffee in *Drosophila* genotoxicity tests, **Food Chemistry Toxicology**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 835-842, Aug. 1986.

GRAF, U.; Abraham, S. K.; guman-Rincon, J.; Wurgler, F. E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 402, n. 1-2, p. 203-209, June 1998.

GRAHAM, D. M. Caffeine-Its identity, Dietary Soucer, Intake and Biological effects. **Nutrition Reviews**, Lawrence, v. 36, n. 4, p. 97-102, 1978.

GRANBY, K.; FAGT, S. Analysis of acrylamide in coffee and dietary exposure. **Analytica Chemica Acta**, Amsterdam, v. 520, n. 1-2, p. 177-182, Aug. 2004.

✕ GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation: a review. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 55, n. 6, p. 539-546, 1978.

GUTTERIDGE, J. M. C.; XAIO-CHANG, F. Enhancement of bleomycin-iron free radical damage to DNA by antioxidants and their inhibition of lipid peroxidation, **Febs Letters**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 71-74, 1981.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. .57, n. 5, p. 715-725, May 1993.

✕ HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 2. ed. Oxford: University Press, 1989. 543 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. Oxford: University Press, 1999. 936 p.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food Chemistry Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 601-617, July 1995.

HASAN, H. A .H. Role of Caffeine and tannin in anti-toxicogenic properties of coffee and tea. **Cryptogamie Mycology**, Paris, v. 2, n. 1, p. 17-21, Jan./Mar. 1999.

HASEGAWA, R.; OGISO, T.; IMAIDA, K.; SHIRAI, T.; ITO, N. Analysis of the potential carcinogenicity of coffee and its related compounds in medium-term liver bioassay of rats. **Food Chemistry Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 15 – 20, Jan. 1995

HASLAN, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Chicago, v. 59, p.205-215, 1996.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a Class of Natural Products of High Pharmacological Potency. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 1141-1148, 1983.

HIRAMOTO, K.; LI, X.; MAKIMOTO M.; KATO T.; KIKUGAWA K. Identification of hydroxyhydroquinone in coffee as a generator of reactive oxygen species that break DNA single strands. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 419, n. 1-3, p. 43-51, Nov. 1998.

HUBER, W.W.; SCHARF, G.; NAGEL, G.; PRUSTOMERSKY, S.; SCHULTE-HERMANN, R.; KAINA B. Coffee and its chemopreventive components Kahweol and Cafestol increase the activity of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in rat liver-comparison with phase II xenobiotic metabolism. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 522, n. 1-2, p. 57-68, Jan. 2003.

HURRELL,R.F.; REDDY,M.; COOK,J.D. Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. **British Journal Nutrition**, Cambridge, v. 81, n. 4, p. 289-95, Apr. 1999.

✶ HWANG ,S. Y.; BOWERS, J. A.; KROPF, D. H. Flavor, texture, color, and hexanal and TBA values of frozen cooked beef packaged in modified atmosphere. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 26-29, Jan./Feb. 1990.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. O Café no Mundo. Disponível em: <<http://www.pr.gov.br/iapar/cafe/m&prodcons.html>>. Acesso em: 10 jul. 2002.

✶ ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso Coffee: the chemistry of quality**. London: Academic Press, 1995. 253 p.

ITAGAKI, S. K.; KOBAYASHI, T.; KITAGAWA, Y.; IWATA, S.; SUWA, Y.; NUKAYA, H. Cytotoxicity of coffee in human intestinal cells *in vitro* and its inhibition by peroxidase. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 6, n. 5, p. 417-421, Sept. 1992.

ITO, T.; TOSHITSUGU, I.; ATSUSHI, Y.; TAKESHI, Y.; KOJI, I.; HIROSHI, Y.; HIROSHI, H.; HIDEKI, S.; MAKOTO, A.; EMIKO, M.; NAKAMURA, H. Effect of filtered coffee intake on lipid metabolism. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 52, p. 210-216, 1998.

ITO, Y.; OHNISHI, S.; FUJIC, K. Chromosome aberrations induced by aflatoxina B1 in rat bone marrow cells *in vivo* and their suppression by green tea. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 222, n. 3, p. 253-261, Mar. 1989.

JACOB, R. A. The Integrated Antioxidant System. **Nutrition Research**, Oxford, v. 15, n. 5, p.755-766, May 1995.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology Medicine**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 515-540, 1990.

JIALAL, I.; DEVARAJ, S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 42, n. 4, p. 498-506, Apr. 1996. Resumo.

JIALAL, I.; GRUNDY, S. M. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v. 669, p. 2327-2348, Sept. 1992.

KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. **Meat Science**, Amsterdam, v. 36, n. 1-2, p. 169-189, 1994.

KASAI, H.; FUKADA, S.; YAMAIZUMI, Z.; SERGIE, S.; MORI, H.. Action of chlorogenic acid in vegetables and fruits as an inhibitor of 8-hydroxydeoxyguanosine formation *in vitro* and in a rat carcinogenesis model. **Food Chemistry Toxicology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 467-471, May 2000.

KATO, T.; TAKAHASHI, S.; KIKUGAWA, K. Loss of heterocyclic amine mutagens by insoluble hemicellulose fiber and high-molecular-weight soluble polyphenolics of coffee. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 246, n. 1, p. 169-178, 1991.

KATO, Y.; NAGAO, A.; TERAU, J.; ASAWA, T. Inhibition of myeloperoxidase catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants in vitro. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 67, n. 5, p. 1136-1139, May 2003.

KAWACHI, I. **Arch. Intern. Méd.** v. 156, n. 521, 1996.

✕ KEHRER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical Reviews in toxicology**, Boca Raton, v. 23, n. 1, p. 22, 1993.

KIKUGAWA, K.; KATO, T.; TAKAHASHI, D. Possible presence of 2-amino-3,4-dimethylimidazol [4,5-f]quinoline and other heterocyclic amine-like mutagens in roasted coffee beans. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 37, n. 4, p. 881-886, July/Aug. 1989.

KIKUZARI, H.; NAKATANI, N. Antioxidant effects of some ginger constituents. **Journal Food Science**, Chicago, v. 58, n. 6, p. 1407-1410, nov./Dec. 1993.

KIRK, J. R. Biological availability of nutrients in processed foods. **Journal of Chemical Education**, Washington, v. 61, n. 4, p. 364-367, 1984.

KIYOHARA, C. et al. **Journal Nutrition**, v. 82, p. 125, 1999.

KNASMÜLLER, S.; STELUKELLNER, H.; MAYER, B. J. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 1051-1062, 2002.

KOSUGI, A.; NAGAO, M.; SUWA, Y.; WAKABAYASHI, K.; SUGIMURA, T. Roasting coffee beans produces compounds that induce prophage in *E. coli* and are mutagenic in *E. coli* and *S. typhimurium*, **Mutation Research**, Amsterdam, v. 116, n. 1-2, p. 179-184, 1983.

KRINGS, U.; BERGER, R.G. Antioxidant activity of some roasted foods. **Food Chemistry**, Oxford, v. 72, n. 2, p. 223-229, Feb. 2001.

KROYER, G.; KRETSCHMER, L.; WASHUTT, J. Antioxidant properties of tea and coffee extracts. **Journal of Agriculture and food chemistry**, Washington, v. 2, n. 2, p. 433-437, mar./Abr. 1989.



- ✧ KUBOW, S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 12, n. 1, p. 63-81, Jan. 1992.
- LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v.27, n. 4, p. 969-78, Apr. 1988.
- LAUGHTON, M. J.; HALLIWELL, B.; EVANS, P. J.; HOULT, J. R. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v.38, n. 17, p. 2859-2865, Sept. 1989.
- LAYRISSE, M. et al. New property of vitamin A and beta-carotene on human iron absorption: effect on phytate and polyphenols as inhibitors of iron absorption. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Buenos Aires, v. 50, p. 243-248, 2000 a.
- LAYRISSE, M.; GARCIA-CASAL, M. N.; SOLANO, L. Iron bioavailability in humans from breakfasts enriched with iron bis-glycine chelate, phytates and polyphenols. **Human Nutrition and Metabolism**, v. 50, p. 2195-2199, 2000 b.
- LEE, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 295, n. 1-2, p. 141-154, May 2000.
- LEENEM, R.; ROODENBURG, A.J.; TIJBURG, L. B.; WISEMAN, S.A.. A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 54, p. 87-92, 2000.
- LEITZMANN, M.F. *et. al.* **JAMA**, 281: 2106, 1999.
- LIMA, D.R. Café e saúde. In: \_\_\_\_\_ **Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia VI**. Rio de Janeiro: Medsi, 2002. cap.15, p.141-149.
- LOPES, L.M.V. Avaliação da qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). 2000. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

- MAENG, S.H.;KIM,H.Y.; CHUNG, H.W.; KIM, S.J. ; HAN, J.H.; LEE, Y.M.; KIM, K.J. YU, I.J. Micronuclei induction by 13 week-inhalation of 1,1-dichloro-1-fluorethane in Sprague-Dawley rats. **Toxicology Letters**, v. 146, p. 129-137, 2004.
- MAKINEN, K. K.; TENOVUO, J. Observations on the use of Guaiacol and 2,2'-Azino-di(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid) as Peroxidase Substrates. **Analytical Biochemistry**, New York, v.126, n. 1, p.100-108, 1982.
- MANCINI FILHO, J. Importância Química e nutricional dos Antioxidantes naturalmente presentes nos alimentos. IN: MERCADANTE, A. Z.; BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A.; PEREIRA, J. L.; PASTORE, G. M (Eds.). **Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas**. Campinas: FEA/ UNICAMP, 2001. v. 2, p. 174-176.
- MANZOCCO, L.; CALLIGARIS, S.; MASTROCOLA, D.; NICOLI, M. C.; LERICI, C. R. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 31, n. 9-10, p. 340-346, Sept./Oct. 2001.
- MARTIN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Discrimination between Arabica and robusta green coffee varieties according to their chemical composition. **Talanta**, Amsterdam, v. 46, n. 6, p. 1259-1264, Aug. 1998.
- MARTINEZ, T. L. R., LOURENÇO, D. M. **Avaliação e conduta nos riscos trombo e aterogênico**. São Paulo : Art Plus, 1996. 164 p.
- MCANLIS, G. T.; MCENENY, J.; PEARCE, J; YOUNG, I. S. Black tea consumption does not protect low density lipoprotein from oxidative modification. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 52, p. 202-206, 1998.
- MENEZES, H.C. **Variação dos monoisômeros e diisômeros do ácido cafeoilquínico com a maturação de café**. 1990. 95 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MENEZES, H. C. The relationship between the state of maturity of raw coffee beans and the isomers of caffeoylquinic acid. **Food Chemistry**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 293-296, 1994.

MIDDLETON, E., "The flavonoids," **Trends in Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 8, p. 335-8, 1984.

MILLIN, D. J.; CRUICKSHANK, D. Hot beverages coffee, tea, cocoa and others, In: RANKEN (Ed.). **Food Industries Manual**, 2. ed. New York, 1988. p. 216-226.

✕ MOLLER, P.; WALLIN, H.; KNUDSEN, L. E. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. **Chemico-Biological Interactions**, Clare, v. 102, n. 1, p. 17-36, Sept. 1996.

MORCK, T. A.; LYNCH, S. R.; COOK, J. D. Inhibition of food iron absorption by coffee. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 37, n. 3, p. 416-420, 1983

MOREIRA, R. F. A .; TRUGO, L. C., MARIA, C. A. B. de; MATOS, A. G. B.; MATOS, S. M.; SANTOS, S. M.; LEITE, J. M. C. Discrimination of Brazilian arábica green coffee samples by chlorogenic acid composition. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Caracas, v. 51, n. 1, Mar. 2001.

NAGAO, M.; TAKAHASHI, Y.; YAMANAKA, H.; SUGIRIMURA, T. Mutagens in coffee and tea. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 101-106, 1979.

NAKASATO, F.; NAKAYASY, M.; FUJITA, J.; NAGAO, M.; TERADA, M.; SUGIMURA, T. Mutagenicity of instant coffee on cultured Chinese hamster lung cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 141, n. 2, p. 109-112, 1984.

NATELLA, F.; NARDINI, M.; GIANNETTI, I.; DATTILO, C.; SCACCINI, C. Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. **Journal and Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 21, p. 6211-6216, Oct. 2002.

NEHLIG, A. **Chemtech**, v. 29, n. 7, p. 30, 1999.

NEHLIG, A.; DEBRY, G. Potential genotoxic, mutagenic and antimutagenic effects of coffee: A review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 317, n. 2, p. 145-162, Apr. 1994.

NEPKA, C.; SIVRIDIS, E. ANTONOGLOU, O.; KORTSARIS, A.  
Chemopreventive activity of very low dose dietary tannic acid administration in hepatoma bearing C3H male mice. **Cancer Letters**, Clare, v. 141, n. 1-2, p. 57-62, July 1999.

NETCOMEX. Ano deverá ter produção inferior à demanda. Disponível em: <<http://www.netcomex.com.br/noticias/materia.asp?a=8600&s=51>> Acesso em: 02 out. 2004.

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

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. T.; FRANCESCHI, S.; LERICI, C. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. **Cancer Letters**, Clare, v. 114, n. 1-2, p. 71-74, Mar. 1997b.

NISHIKAWA, A.; FURUKAWA, F.; IMAZAWA, T.; IKEZAKI, S.; HASEGAWA, T.; TAKAHASHI, M. Effects of caffeine on glandular stomach carcinogenesis induced in rats by N-methyl-N-nitrosoguanidine and sodium chloride. **Food Chemistry Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 21-26, Jan. 1995. Resumo.

O'BRIEN, J.; MORRISSEY, P. A. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard reaction in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 28, n. 3, p. 211-248, 1989.

OBANA, H.; NAKAMURA, S.; TANAKA, R. Supressive effects of coffee on the SOS responses induced by UV and chemical mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 175, n. 1, p. 47-50, 1986.

PÁDUA, F. R.; PEREIRA, R.; FERNANDES, S. Polifenóis, pH e acidez de diferentes espécies de café. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=243>>. Acesso em: 15 nov. 2004.

PETERS, J. H.; MORTELMANS, K. E.; REIST, E. J.; SIGMAN, C. C.; SPANGORD, R. J.; THOMAS, D. W. Synthesis, chemical characterization, and mutagenic activities of promutagens produced by pyrolysis of proteinaceous substances. **Environmental Mutagen**, New York, v. 3, n. 6, p. 639-649, 1981.

PIMENTA, C. J. **Qualidade do café (*Coffea arabica* L.) originado de frutos colhidos em quatro estádios de maturação.** 1995. 94 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PIMENTA, C. J. **Época de colheita e tempo de permanência dos frutos à espera da secagem, na qualidade do café (*Coffea arabica* L.).** 2001. 145p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de Lavras, Lavras.

PIMENTA, C. J.; Vilela, E. R. Compostos fenólicos e qualidade de bebida. In: I SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2000. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=172>>. Acesso em: 15 nov. 2004.

PROCHASKA, H. J.; TAL; ALAY, P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. **Cancer Research**, Oxford, v. 48, p. 4776-4782, 1988.

RAGHAVAN, B.; RAMALAKSHMI, K. Coffee: chemistry and technology of its processing. **Indian Coffee**, Bangalore, v. 62, n. 11, p. 3-11, nov. 1998.

RAJ, A. S.; HEDDLER, J. A.; NEWMARK, H. L.; KATZ, M. Caffeic acid as an inhibitor of DMBA-induced chromosome breakage in mice assessed by bone-marrow micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 124, n. 3-4, p. 247-253, 1983.

RATNAYAKE W.M.N., HOLLYWOOD, R., O'GRADY, E.; STAVRIC B. Lipid content and composition of coffee brews prepared by different methods. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 263-269, Apr. 1993.

REPINE, J. E.; EATON, J.W.; ANDERS, M. W.; HOIDAL J. R.; FOX, R. B. Geration of hydroxyl radical by enzymes, chemicals, and human phagocytes in vitro. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 64, n. 6, p. 1642-1651, 1979.

RHEE, K. S. Enzymic and nomenzymic catalasis of lipid oxidation in muscle foods. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 6, p. 127-132, June 1988.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.). **Mutagenese Ambiental**. ULBRA, 2003. p. 173-200.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, F. M. D. Dietary components may prevent mutation-related diseases in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 544, n. 2-3, p. 195-201, Nov. 2003.

RIBEIRO, D. M. **Qualidade do café cereja descascado submetido a diferentes temperaturas, fluxos de ar e períodos de pré-secagem**. 2003. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

✳ RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T.; SYMONS, M. C. R. **Techniques in free radical research**. Netherlands: Elsevier, 1991. 291 p.

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

RINKUS, S. J.; TYLER, S. I.; TAYLOR, R. T. Mutagenicity and DNA damage in Chinese hamster ovary cells treated with coffee. **Environmental Mutagenesis**, New York, v. 9, n. 8, p. 90, 1987. Supplement.

ROOS, B. de; VAN DER WEG, G.; URGERT, R.; VAN DE BOVENKAMP, P. CHARRIER, A.; KATAN, M. B. Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant *coffea*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3065-3069, Aug. 1997

ROTHWELL, K. Dose-related inhibition of chemical carcinogenesis in mouse skin by caffeine. **Nature**, London, v. 252, n. 5478, p. 69-70, 1974. Resumo.

RUEFF, J.; GASPAR, J.; MARTINHO, G.; RODRIGUES, S. DNA damage and oxygen species, In: DUARTE, M. P. Genotoxicity of instant coffee: possible involvement of phenolic compounds. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 442, n. 1, p. 43-51, 1999.

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

SAKAMOTO, W.; ISOMURA, H.; FUJIE, K.; NISHIHARA, J.; OZAKI, M.; YUKAWA, S. Coffee increases levels of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in rats. **Toxicology**, Clare, v. 183, n. 1-3, p. 255-263, Feb. 2003.

SAN, R. H. C.; CHAN, R. I. M. Inhibitory effect of phenolic compounds on aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism and induced mutagenesis. **Mutation Research**, v. 177, n. 2, p. 229-239, Apr. 1987.

SÁNCHEZ-GONZALEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 133-139, mar./Apr. 2004.

SCHLEGEL, R.; CROY, R. G.; PARDEE, A. B. Exposure to caffeine and suppression of DNA replication combine to stabilize the proteins and RNA required for premature mitotic events. **Journal of Cellular Physiology**, v. 131, n. 1, p. 85-91, 1987.

SCHWARZ, K.; BERTELSEN, G.; NISSEN, L. R.; GARDNER, P. T.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; HUYNH-BA, T.; LAMBELET, P.; McPHAIL, D.; SKIBSTED, L. H.; TIJBURG, L. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. **European Food Research Technology**, New York, v. 212, n. 3, p. 319-328, 2001.

✕ SEVANIAN, A.; HOCHSTEIN, P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. **Annual Reviews of Nutrition**, Palo Alto, v. 5, p. 365-390, 1985.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedade, degradações, modificações. Varela: São Paulo, 1996. 517 p.

SGARBIERI, V. C.; STEDEFELDT, E.; CANDIDO, L. M. B. Alimentação e câncer: Fatores de Indução e/ou Promoção e de Prevenção da Carcinogênese In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 1., 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1997.

SHI, X.; DALAL, N. S.; JAIN, A. C. Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. **Food Chemical Toxicology**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 1-6, jan. 1991.

SHIMIZU, M.; YANO, E. Mutagenicity of instant coffee and its interaction with dimethylnitrosamine in the micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 189, n. 3, p. 307-311, Nov. 1987.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angewand Chemie International Edition**, Deerfield, v. 25, n. 12, p. 1058-1071, Dec. 1986.

SILVA, J. S. **Colheita, secagem e armazenamento do café**. In: ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE, 1., 1999, Viçosa, MG. Anais... Viçosa, MG: [s. n.], 1999. p. 39-80.

SILVA, A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, Jan./Fev. 1999.

SILVA, V. O. Perspectivas para o agribusiness em 2004 e 2005. In: ASSO CIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. 2004. **Perspectivas do Mercado de Café...** [S. l.: s. n.], 2004. Disponível em: <[http://www.abic.com.br/arquivos/abic\\_perspectivas\\_mcafe6abr04.pdf](http://www.abic.com.br/arquivos/abic_perspectivas_mcafe6abr04.pdf)>. Acesso em: 8 ago. 2004.

SILVA, A. M. F.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, Jan./Fev. 1999.

X SLATER, T. F.; CHEESEMAN, K. H.; DAVIES, M. J.; PRONDFOOT, K. Free radical mechanisms in relation to tissue injury. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 46, n. 1, p. 1-12, Feb. 1987.

SMITH, A. W. The Coffee plant and Processing at origin. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Eds.). **Coffee: chemistry**. Elsevier Applied Science, 1985. p. 3-23.

SMITH, C. V.; ANDERSON, R. E. Methods for determination of lipid peroxidation in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine**, Reading, v. 3, p. 341-344, 1987.

SMITH, D. F.; MACGREGOR, J. T.; HIATT, R. A.; HOOPER, N. K.; WEHR, C. M.; PETRES, B.; GOLDMAN, L. R.; YUAN, L. A.; SMITH, P. A.; BECKER, C. E. Micronucleated erythrocytes as an index of cytogenetic damage in humans: demographic and dietary factors associated with micronucleated erythrocytes in splenectomized subjects, **Cancer Research**, Philadelphia, v. 50, n. 16, p. 5049-5054, Aug. 1990.



SOMOSA, V.; LINDENMETER, M.; WENZEL, E.; FRANK, O.; ERBERSDOBLER, F. H.; HOFMANN, T. Activity-Guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using *in vitro* and *in vivo* techniques. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 23, p. 6861-6869, Dec. 2003.

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

STAVRIC, B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. **Food and chemical Toxicology**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 79-90, Jan. 1994.

STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T. E.; KHOO, J. C.; WITZTUM, J. L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase atherogenicity. **New England Journal Medicine**, Boston, v. 320, n. 14, p. 915-924, Apr. 1989. Resumo.

STICH, H. F.; ROSIN, M. P.; BRYSON, L. Inhibition of mutagenicity of a model nitrosation reaction by naturally occurring phenolics, coffee and tea. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 95, n. 2-3, p. 119-128, 1982.

TATSUZAWA, H.; MARUYAMA, T.; HORI, K.; SANO, Y.; NAKANO, M. Singlet oxygen ( $(^1\Delta_g)O_2$ ) as the principal oxidant in myeloperoxidase-mediated bacterial killing in neutrophil phagosome. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, San Diego, v. 262, n. 3, p. 647-650, Sept. 1999.

TERPSTRA, A. H. M.; KATAN, M. B.; WEUSTEN-VAN DER WOUW, M. P. M. E.; ROOS, B.; BEYNEN, A. C. The hypercholesterolemic effect of cafestol in coffee oil in gerbils and rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 11, n. 6, p. 311-317, June 2000.

THELLE, D. S., ARNESEN, E.; FORDE, O. H. The tromso heart study. Does coffee raise serum cholesterol? **New England Journal Medicine**, Boston, v. 308, n. 20, p. 1454-1457, 1983.

THELLE, D. S.; HEYDEN, S.; FODOR, J. G. Coffee and cholesterol in epidemiological and experimental studies. **Atherosclerosis**, Clare, v. 67, n. 2-3, p. 97-103, Oct. 1987.

TRUGO, L. C. **Café: composição química e potencial nutracêutico** In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS, 1., 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: Adriana Z. Mercadante, 2001. 272 p.

TRUGO, L. C. et al. **Torrefação e granulometria na composição química.** In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2001. Disponível em: <<http://www.coffeebreak.com.br/ocafezal.asp?SE=8&ID=274>>. Acesso em: 15 nov. 2004.

TRUGO, L. C.; MARIA, C. A. B.; WERNEREK, C. C. **Simultaneous determination of total chlorogenic acid and caffeine in coffee by high-performance gel filtration chromatography.** **Journal Science Food Agricultural**, London, v. 34, n. 3, p. 300-306, Mar. 1983.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. **Proc. Intern. Coffee Ass.** 187, 1982.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. **A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC.** **Food Chemical**, Oxford, v. 15, n. 3, p. 219-227, 1984a.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. **Chlorogenic acid composition of instant coffees.** **The Analyst**, Cambridge, v. 109, p. 263-266, 1984b. Supplement.

TUCKER, J. D.; TAYLOR, R. T.; CHRISTENSEM, M. L.; STROUT, C. L.; HANNA, M. L. **Cytogenetic response to coffee in Chinese hamster ovary AUXB1 cells and human peripheral lymphocytes,** **Mutagenesis**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 343-348, Sept. 1989.

URGERT, R.; KATAN, M. B. **The cholesterol-raising factor from coffee beans: review.** **Annual Review Nutrition**, Palo Alto, v. 17, p. 305-324, 1997.

VIANI, R.; HORMAN, I. **Thermal behavior of trigonelline.** **Journal Food Science**, Chicago, v. 39, n. 6, p. 1216-1217, Nov. 1974.

VIANI, R. **The composition of coffee,** In: GUARATTINI, S. (Ed.). **Caffeine, Coffee and Health.** New York: Raven, 1993. p.17-41.

VILLELA, T. C. **Qualidade do café despulpado, desmucilado, descado e natural, durante o processo de secagem.** 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

WATTENBERG, L. M.; **Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents.** **Cancer Research**, Oxford, v. 43, p. 2448-2453, 1983.

WATTENBERG, L. M.; LAM, L. K. T. Protective effects of coffee constituents on carcinogenesis in experimental animals., **Cancer Research**, v.45, p.1-8, 1984.

WIJEWICKREME, A. N.; KITTS, D. D. Modulation of metal-induced genotoxicity by Maillard Reaction Products isolated from coffee. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 543-553, July 1998.

WILKINSON, J.; CLAPPER, M. L. Detoxication enzymes and chemoprevention. **Proceedings Society Experiment Biology and Medicine**, Malden, v. 216, n. 2, p. 192-200, Nov. 1997.

WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Carcinogenic antioxidants: diethylstilboestrol, hexoestrol and 17 $\alpha$ -ethinyloestradiol. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 332, n. 1-2, p. 159-163, Oct. 1993.

WOODMAN, J. S.; GIDDEV, A.; EGLI, R. The carboxylic acids of brewed coffee. **Proc. 3Ed. Coll. ASOC**, 137p., 1967.

WYNNE, K. N.; FAMILARI, M.; BOUBLIK, J. H.; DRUMMER, O. H.; ERA, I. D.; FUNDER, J. W. Isolation of opiate receptor ligands in coffee. **Clinical Experimental Pharmacology and Physiology**, Victoria, v. 14, n. 10, p. 785, Oct. 1987.

YAMATO, T.; YAMASAKI, S.; MISUMI, Y.; KINO, M.; OBATA, T.; AOMINE, M. Modulation of the stress response by coffee: an *in vivo* microdialysis study of hippocampal serotonin and dopamine levels in rat. **Neuroscience Letters**, Clare, v. 332, n. 2, p. 87-90, Oct. 2002.

YANAGIMOTO, K.; LEE, K. G.; OCHI, H.; SHIBAMOTO, T. Antioxidative activity of heterocyclic compounds found in coffee volatiles produced by Maillard reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 70, p. 5480-5484, Oct. 2002.

YANAMAKA, N.; ODA, O.; NAGAO, S. Prooxidant activity of caffeic acid, dietary non-flavonoid phenolic acid, on Cu<sup>2+</sup>-induced low density lipoprotein oxidation. **Febs Letter**, Amsterdam, v. 405, n. 3, p. 186-190, May 1997.

YEN, G. C.; CHEN, H. Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 67, n. 3, p. 415-420, Mar. 1995.

YEN, G.; WU, J. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**, Oxford, v. 65, n. 3, p. 375-379, May 1999.

YUKAWA, G. S.; MUNE, M.; OTANI, H.; TONE, Y.; LIANG, X. M.; IWAHASHI, H. SAKAMOTO, W. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. **Biochemistry**, Moscow, v. 69, n. 1, p. 70-74, Jan. 2004.

ZEEGERS, P. A. M, et al. Are coffee, tea, and total fluid consumption associated with bladder cancer risk? Results from the Netherlands Cohort Study. **Cancer Causes and Control**, Oxford, v. 12, p.231-238, 2001.

ZIJP, I. M.; KORVER, O.; TIJBURG, L. B. Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, Boca Raton, v. 40, n. 5, p. 371-98, 2000.

## ANEXO

<b>ANEXO A</b>	<b>Página</b>
TABELA 1A	Resumo da análise de variância dos parâmetros de cor L*, a* b* de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três graus de torração..... 108
TABELA 2A	Resumo da análise de variância para pH e sólidos solúveis totais (SST) de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três graus de torração ..... 108
TABELA 3A	Resumo da análise de variância do teor de polifenóis de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três graus de torração..... 109
TABELA 4A	Resumo da análise de variância para os teores de ácidos clorogênicos (CQA): 5-CQA, 4-CQA, e 3 CQA de bebidas de café em quatro graus de torração submetido a dois tipos de processamento ..... 109
TABELA 5A	Resumo da análise de variância para as variações dos teores de ácidos clorogênicos (CQA): 5-CQA, 4-CQA, e 3 CQA de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três graus de torração..... 110
TABELA 6A	Resumo da análise de variância para o poder redutor (PR) e poder quelante (PQ) de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três (PR) ou quatro (PQ) graus de torração ..... 110
TABELA 7A	Resumo da análise de variância da atividade seqüestrante de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e quatro graus de torração e quatro concentrações..... 111
TABELA 8A	Resumo da análise de variância da atividade seqüestrante de bebidas de café (200ppm), ácido ascórbico, ácido gálico e BHT. .... 111

TABELA 9A	Resumo da análise de variância da atividade de guaiacol-peroxidase de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três graus de torração e 4 concentrações.....	112
TABELA 10A	Resumo da análise de variância da inibição da peroxidação de lipídeos <i>in vitro</i> de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três graus de torração e três concentrações. ....	113
TABELA 11A	Resumo da análise de variância da inibição da peroxidação de lipídeos em ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 7 dias em relação ao controle negativo. ....	113
TABELA 12A	Resumo da análise de variância da inibição da peroxidação de lipídeos em ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 30 dias em relação ao controle negativo .....	114
TABELA 13A	Resumo da análise de variância da comparação da inibição da peroxidação de lipídeos em ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 7 e 30 dias .....	114
TABELA 14A	Resumo da análise de variância dos parâmetros bioquímicos: colesterol (C), colesterol HDL (HDL), triglicerídeos (T) e ácido úrico (AU), de ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 30 dias.....	115
TABELA 15A	Resumo da análise de variância para as variações dos parâmetros hematológicos: hemácias (H), hemoglobina (HB), hematócrito (HT), volume globular médio (VCM) de ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 30 dias. ....	115
TABELA 16A	Resumo da análise de variância para as variações dos parâmetros hematológicos: leucócitos(LEU), linfócitos (L) plaquetas (PLT), hemoglobina globular média (HCM) e concentração hemoglobínica globular média (CHCM) de ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 30 dias. ....	116

<b>TABELA 17A</b>	<b>Resumo da análise de variância para o número de micronúcleos em 2000 eritrócitos policromáticos (MNPCE) e a relação eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (PCE/NCE) de ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro e claro por 7 dias.....</b>	<b>116</b>
<b>TABELA 18A</b>	<b>Resumo da análise de variância para o número de micronúcleos em 2000 eritrócitos policromáticos (MNPCE) e a relação eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (PCE/NCE) de ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 30 dias.....</b>	<b>117</b>
<b>TABELA 19A</b>	<b>Resumo da análise de variância para as variações dos parâmetros hematológicos: hemácias (H), plaquetas (PLT), leucócitos(LEU), linfócitos (L) de ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 30 dias em relação a ciclofosfamida. ....</b>	<b>117</b>
<b>TABELA 20A</b>	<b>Resumo da análise de variância das diferenças entre os pesos inicial e final dos ratos tratados com a bebida de café descascado escuro comparados ao controle (água )......</b>	<b>118</b>

TABELA 1A Resumo da análise de variância dos parâmetros de cor L\*, a\*, b\* de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três graus de torração

FV	GL			Quadrados médios		
	L*	a*	b*	L*	a*	B*
TIPOS	1	1	1	0,1404 <sup>NS</sup>	0,0009 <sup>NS</sup>	0,0408 <sup>NS</sup>
TORRAÇÃO	2	2	2	85,3790*	9,6038*	99,0723*
TIP*TOR	2	2	2	0,5563 <sup>NS</sup>	0,0009 <sup>NS</sup>	0,0103 <sup>NS</sup>
RESÍDUO	18	18	18	0,2363	0,0081	0,0615
CV (%)				1,478	0,782	4,925

\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>NS</sup> não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

TABELA 2A Resumo da análise de variância para pH e sólidos solúveis totais (SST) de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três graus de torração

FV	GL		Quadrados médios	
	pH	SST	PH	SST
TIPOS	1	1	0,0001 <sup>NS</sup>	0,00017 <sup>NS</sup>
TORRAÇÃO	2	2	0,3522*	0,000007 <sup>NS</sup>
TIP*TOR	2	2	0,0008 <sup>NS</sup>	0,000009 <sup>NS</sup>
RESÍDUO	18	18	0,0005	0,00003
CV (%)			0,439	0,290

\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>NS</sup> não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.



Resumo da análise de variância para os teores de ácidos clorogênicos (CQA): 5-CQA, 4-CQA, e 3 CQA de bebidas de café em quatro graus de torração submetido a dois tipos de processamento

FV	GL			Quadrados médios		
	5- CQA	4- CQA	3- CQA	5-CQA	4-CQA	3-CQA
TIPO	1	1	1	0,2340 *	0,0198 *	0,0759 *
TORRAÇÃO	3	3	3	44,9107 *	0,8147 *	0,4391 *
TIP*TORR	3	3	3	0,1423 *	0,0132 *	0,0059 **
RESIDUO	16	16	16	0,0026	0,0012	0,0015
CV (%)				1,887	3,879	5,181

\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.  
\*\* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Resumo da análise de variância do teor de polifenóis de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três graus de torração.

F.V.	GL.	Quadrados médios
TIPOS	1	751,9482**
TORRAÇÃO	2	1003,6347**
TIPO*TORR	2	116,5659**
RESIDUO	18	13,3939
C.V. %	-	1,143

\* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

TABELA 5A Resumo da análise de variância para as variações dos teores de ácidos clorogênicos (CQA): 5-CQA, 4-CQA, e 3 CQA de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três graus de torração

FV	GL			Quadrados médios		
	5-CQA	4-CQA	3-CQA	5-CQA	4-CQA	3-CQA
TIPOS	5	5	5	451,7376*	4037,7492*	3702,8883*
RESÍDUO	18	18	18	0,0409415	0,5268	0,2457
CV (%)				0,225	2,473	2,105

\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

TABELA 6A Resumo da análise de variância para o poder redutor (PR) e poder quelante (PQ) de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três (PR) ou quatro (PQ) graus de torração

FV	GL		Quadrados médios	
	PR	PQ	PR	PQ
TIPOS	1	1	13,5907**	1,5402 <sup>NS</sup>
TORRAÇÃO	2	3	23,2473*	240,9988*
TIP*TOR	2	3	6,7493 <sup>NS</sup>	0,8605 <sup>NS</sup>
RESÍDUO	18	16	2,2554	0,8739
CV (%)			4,092	13,441

\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

\*\* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>NS</sup> não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

TABELA 7A Resumo da análise de variância da atividade seqüestrante de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e quatro graus de torração e quatro concentrações.

F.V.	G.L.	Quadrados médios
TIPOS	1	98,0489*
TORRAÇÃO	3	715,7570*
CONCENTRAÇÃO	3	24661,6153*
TIPO*TORR	3	11,2119*
TIPO*CONC	3	11,0425*
TORRA*CONC	9	63,9699*
TIP*TORR*CONC	9	10,0804*
RESÍDUO	64	0,7718
C.V.	-	1,528

\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

TABELA 8A Resumo da análise de variância da atividade seqüestrante de bebidas de café (200ppm), ácido ascórbico, ácido gálico e BHT.

F.V.	G.L.	Quadrado médio
TIPOS	10	26,1563*
RESÍDUO	22	0,2434
C.V.	-	0,541

\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

TABELA 9A Resumo da análise de variância da atividade de guaiacol-peroxidase de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três graus de torração e 4 concentrações.

F.V.	G.L.	Quadrados médios
TIPOS	1	1,1503 <sup>NS</sup>
TORRAÇÃO	2	398,2017 *
CONCENTRAÇÃO	3	3087,8661*
TIPO*TORR	2	32,2835*
TIPO*CONC	3	4,1575 <sup>NS</sup>
TORRA*CONC	6	13,5744 *
TIP*TORR*CONC	6	8,1691 *
RESÍDUO	48	2,3569
C.V.	-	7,065

\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

<sup>NS</sup> não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

TABELA 10A Resumo da análise de variância da inibição da peroxidação de lipídeos *in vitro* de bebidas de café submetido a dois tipos de processamento e três graus de torração e três concentrações.

F.V.	G.L.	Quadrados médios
TIPOS	1	46.6490**
TORRAÇÃO	2	63.3875*
CONCENTRAÇÃO	2	20368.8064*
TIPO*TORR	2	39,8911**
TIPO*CONC	2	31,5368**
TORRA*CONC	4	5,3396NS
TIP*TORR*CONC	4	3,1830NS
RESÍDUO	90	8,5246
C.V.	-	9,073%

\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

\*\* significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de F. NS: não significativo

TABELA 11A Resumo da análise de variância da inibição da peroxidação de lipídeos em ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 7 dias em relação ao controle negativo.

F.V.	G.L.	Quadrados médios
TIPOS	1	0,1704*
RESÍDUO	18	0,0023
C.V.	-	16,4034

\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

**TABELA 12A** Resumo da análise de variância da inibição da peroxidação de lipídeos em ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 30 dias em relação ao controle negativo.

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>Quadrados médios</b>
<b>TIPOS</b>	1	0,4122**
<b>RESÍDUO</b>	18	0,0074
<b>C.V.</b>	-	20,8840

\*\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

**TABELA 13A** Resumo da análise de variância da comparação da inibição da peroxidação de lipídeos em ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 7 e 30 dias .

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>Quadrados médios</b>
<b>DIAS</b>	1	78,2496NS
<b>RESÍDUO</b>	18	77,3956
<b>C.V.</b>	-	17,6908

NS não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 14A Resumo da análise de variância dos parâmetros bioquímicos: colesterol (C), colesterol HDL (HDL), triglicerídeos (T) e ácido úrico (AU), de ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 30 dias.

FV	GL				Quadrados médios			
	C	HDL	T	AU	C	HDL	T	AU
TIPOS	1	1	1	1	204,8NS	0,5445NS	281,25NS	0,882NS
RESÍDUO	18	18	18	18	131,3	11,6552	177,7611	0,2343
CV (%)					14,8236	15,2579	13,6117	29,0916

NS não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

115

TABELA 15A Resumo da análise de variância para as variações dos parâmetros hematológicos: hemácias (H), hemoglobina (HB), hematócrito (HT), volume globular médio (VCM) de ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 30 dias.

FV	GL				Quadrados médios			
	H	HT	HB	VCM	H	HT	HB	VCM
TIPOS	1	1	1	1	0,7605NS	16,5822NS	0,0720NS	0,050NS
RESÍDUO	18	18	18	18	0,4205	15,5695	1,0254	2,1389
CV (%)					8,6518	9,0832	6,9597	2,5725

NS não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 16A Resumo da análise de variância para as variações dos parâmetros hematológicos: leucócitos(LEU), linfócitos (L) plaquetas (PLT), hemoglobina globular média (HCM) e concentração hemoglobínica globular média (CHCM) de ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 30 dias.

FV	GL					Quadrados médios				
	LEU	L	PLT	HCM	CHCM	LEU	L	PLT	HCM	CHCM
TIPOS	1	1	1	1	1	0,5120NS	4,6080NS	5544,4500NS	0,4205NS	1,0125NS
RESÍDUO	18	18	18	18	18	1,2022	53,0177	8877,4500	0,4481	0,9158
CV (%)						17,9159	9,9254	12,5484	3,4125	2,8209

NS não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

116

TABELA 17A Resumo da análise de variância para o número de micronúcleos em 2000 eritrócitos policromáticos (MNPCE) e a relação eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (PCE/NCE) de ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro e claro por 7 dias.

FV	MNPCE	PCE/NCE	MNPCE	PCE/NCE
TIPOS	5	5	1307,3133**	0,1429**
RESÍDUO	24	24	5,7833	0,0058
CV (%)			13,7945	6,5697

\*\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F.



TABELA 18A Resumo da análise de variância para o número de micronúcleos em 2000 eritrócitos policromáticos (MNPCE) e a relação eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (PCE/NCE) de ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 30 dias.

FV	MNPCE	PCE/NCE	MNPCE	PCE/NCE
TIPOS	3	3	1160,7778**	0,1279**
RESÍDUO	20	16	4,0500	0,00391
CV (%)			13,7945	5,3149

\*\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

TABELA 19A Resumo da análise de variância para as variações dos parâmetros hematológicos: hemácias (H), plaquetas (PLT), leucócitos (LEU), linfócitos (L) de ratos que ingeriram a bebida de café descascado escuro por 30 dias em relação a ciclofosfamida.

FV	GL				Quadrados médios			
	H	PLT	LEU	L	H	PLT	LEU	L
TIPOS	3	3	3	3	0,0386NS	17598,0500NS	19,9840**	13,5037**
RESÍDUO	16	16	16	16	0,0749	5769,4000	0,8429	0,4471
CV (%)					3,542	9,035	19,535	22,318

NS não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de F.

\*\* significativo a 1% de probabilidade, pelo teste de F.

**TABELA 20A** Resumo da análise de variância das diferenças entre os pesos inicial e final dos ratos tratados com a bebida de café descascado escuro comparados ao controle (água).

<b>F.V.</b>	<b>G.L.</b>	<b>Quadrados médios</b>
Amostras	1	36,45 NS
Resíduo	18	94,0278
C.V.	-	10,5343

NS: não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste de F.