

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**LUCIANA SEGHE TO**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-  
INFLAMATÓRIA TÓPICA DAS FOLHAS DE CAFÉ  
(*Coffea arabica* L.)**

**JUIZ DE FORA  
2017**

**LUCIANA SEGHE TO**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-  
INFLAMATÓRIA TÓPICA DAS FOLHAS DE CAFÉ  
(*Coffea arabica* L.)**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas (Mestrado em Ciências  
Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia  
da Universidade Federal de Juiz de Fora  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian Pereira Rodarte  
Coorientador: Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa**

**JUIZ DE FORA  
2017**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Segheto, Luciana.

Avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória tópica das folhas de café (*Coffea arabica* L.) / Luciana Segheto. -- 2017. 107 p. : il.

Orientadora: Mirian Pereira Rodarte

Coorientador: Orlando Vieira de Sousa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. *Coffea arabica*. 2. Substâncias fenólicas. 3. Atividade antioxidante. 4. Atividade anti-inflamatória tópica. I. Rodarte, Mirian Pereira, orient. II. Sousa, Orlando Vieira de, coorient. III. Título.

LUCIANA SEGHE TO

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-  
INFLAMATÓRIA TÓPICA DAS FOLHAS DE CAFÉ  
(*Coffea arabica* L.)

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas (Mestrado em Ciências  
Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia  
da Universidade Federal de Juiz de Fora,  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 31/07/2017

Banca examinadora:



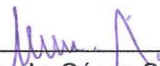
---

Prof.ª. Dr.ª. Mirian Pereira Rodarte  
Universidade Federal de Juiz de Fora



---

Prof.ª. Dr.ª. Elita Scio Fontes  
Universidade Federal de Juiz de Fora



---

Prof. Dr. Paulo César Stringheta  
Universidade Federal Viçosa

**LUCIANA SEGHE TO**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-  
INFLAMATÓRIA TÓPICA DAS FOLHAS DE CAFÉ  
(*Coffea arabica* L.)**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas (Mestrado em Ciências  
Farmacêuticas) da Faculdade de Farmácia  
da Universidade Federal de Juiz de Fora,  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas.**

**Aprovada em: 31/07/2017**

**Banca examinadora:**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian Pereira Rodarte  
Universidade Federal de Juiz de Fora**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elita Scio Fontes  
Universidade Federal de Juiz de Fora**

---

**Prof. Dr. Paulo César Stringheta  
Universidade Federal Viçosa**

**Dedico este trabalho à minha querida mãe,  
Joana, por estar ao meu lado sempre,  
transmitindo-me paz, amor e muito otimismo,  
e por me fazer enxergar os obstáculos como  
um incentivo a continuar indo em frente,  
e nunca como um problema.**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus orientadores Dr<sup>a</sup>. Mirian Pereira Rodarte e Dr. Orlando Vieira de Sousa, por me conduzir num caminho de ensinamentos e por todo aprendizado que obtive.

À professora Fernanda Maria Pinto Vilela, pelo auxílio e orientações.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e da Faculdade de Farmácia, pelos ensinamentos, e aos colegas Técnicos-Administrativos em Educação, Éder, Jésus e Carolina, por toda ajuda.

À Faculdade de Farmácia e aos Laboratórios de Farmacologia de Produtos Naturais e ao Laboratório CENTRALBIO, pela oportunidade de realização desse estudo.

A Deus, pelo dom da vida, pela saúde, força e coragem que me concede todos os dias de minha vida.

À minha família, meus pais e irmãos, pelo carinho e apoio.

Ao meu noivo Leonardo, pela compreensão nos momentos em que estive ausente, por todo amor e carinho e por me trazer a paz e a tranquilidade, que tanto me ajudaram nessa caminhada.

Ao Cícero, por ter me proporcionado condições para a realização desse trabalho, por todo apoio e compreensão.

Às amigas Ana Flávia, Bruna e Andressa, pelo companheirismo e pelo apoio.

E a todos aqueles que contribuíram na realização deste trabalho.

*“A força não provém da capacidade física. Vem de uma vontade indomável.”*

Mahatma Gandhi



## RESUMO

Os grãos de café apresentam constituintes de interesse farmacológico capazes de desencadear no organismo mecanismos protetores contra diversas patologias, como cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas e *diabetes mellitus*. As folhas do cafeeiro são consideradas resíduos do processamento do café, sendo o seu aproveitamento de extrema importância tecnológica e industrial. Considerando que poucas pesquisas são direcionadas para utilização com fins medicinais ou bioprospecção para emprego na indústria farmacêutica, o objetivo do presente estudo foi identificar e quantificar constituintes bioativos presentes nas folhas de *Coffea arabica* L., bem como avaliar as atividades antioxidante e anti-inflamatória tópica. As folhas foram pulverizadas e submetidas à maceração estática em metanol, seguida de partição líquido/líquido para obtenção das frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica. O ácido 5- cafeoilquínico (5-ACQ) e a mangiferina foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta (CLAE-UV). Os teores de fenólicos e flavonoides totais foram determinados por métodos espectrofotométricos e a atividade antioxidante avaliada por meio dos ensaios do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hicrazila (DPPH•), poder de redução do ferro e co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. A atividade anti-inflamatória tópica foi investigada usando modelos de edema de orelha induzidos pelo óleo de cróton, fenol e histamina. Os teores de fenólicos e flavonoides totais variaram de  $1,65 \pm 0,01$  a  $20,60 \pm 0,39$  g equivalentes de ácido gálico/100g e de  $0,26 \pm 0,17$  a  $14,96 \pm 0,05$  g equivalentes de rutina/100g, respectivamente. O teor de 5-ACQ variou de 2,29 a 5,50g/100g, e a mangiferina de 1,46 a 4,00g/100g. Os valores das concentrações efetivas 50% obtidos nos ensaios do DPPH• e poder de redução do ferro foram de  $7,47 \pm 0,12$  a  $122,76 \pm 1,38$   $\mu\text{g/mL}$  e de  $4,67 \pm 0,02$  a  $71,90 \pm 0,22$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. A porcentagem de inibição da peroxidação lipídica determinada pelo ensaio do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico variou de  $32,87 \pm 0,50$  a  $52,49 \pm 0,52$ . A aplicação do extrato metanólico (EM) foi capaz diminuir significativamente o edema induzido pelo óleo de cróton, fenol e histamina. Os resultados encontrados na análise histopatológica e na avaliação da atividade das enzimas mieloperoxidase e n-acetil- $\beta$ -d-glicosaminidase atestam o efeito do EM na inibição do processo inflamatório induzido pelo óleo de cróton. Os resultados encontrados demonstram que as folhas de *Coffea arabica* L. apresentam concentrações elevadas de substâncias fenólicas capazes de exercer efeitos farmacológicos importantes, justificando sua aplicação tecnológica para o desenvolvimento de novos produtos na área farmacêutica.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica* L. Folhas. Antioxidante. Anti-inflamatória.

## ABSTRACT

Coffee beans have constituents of great pharmacological importance capable of triggering protective mechanisms in the body against various pathologies, such as cardiovascular, cancer, neurodegenerative diseases and diabetes mellitus. The coffee leaves are considered as residues of the coffee processing, its technological and industrial use is extremely important. Whereas that few researches are directed to application in medicinal purposes or bioprospection for employment in the pharmaceutical industry, the objective of the present study was to identify and quantify bioactive constituents present in the *Coffea arabica* L. leaves, as well as to evaluate the antioxidant and topical anti-inflammatory activities. The leaves were pulverized and subjected to static maceration in methanol, followed by liquid / liquid partition to obtain hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanolic fractions. The 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) and mangiferin were identified and quantified by high performance liquid chromatography coupled to ultraviolet detector (HPLC-UV). The total phenolics and flavonoids contents were determined by spectrophotometric methods and the antioxidant activity evaluated by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH •) free radical scavenging, ferric reducing power (FRAP) and the  $\beta$ -carotene bleaching assays. The topical anti-inflammatory activity was investigated using ear edema models induced by croton oil, phenol and histamine. The total phenolic and flavonoid contents ranged from  $1.65 \pm 0.01$  to  $20.60 \pm 0.39$  g gallic acid equivalents/100g and from  $0.26 \pm 0.17$  to  $14.96 \pm 0.05$  g rutin equivalents/100g, respectively. The 5-CQA content ranged from 2.29 to 5.50g/100g, and mangiferin was 1.46 to 4.00 g/100g. The effective concentrations 50% values in the DPPH and FRAP assays were  $7.47 \pm 0.12$  and  $122.76 \pm 1.38$   $\mu$ g/mL and  $4.67 \pm 0.02$  and  $71.90 \pm 0.22$   $\mu$ g/mL, respectively. The percentage inhibition of lipid peroxidation determined by the  $\beta$ -carotene / linoleic acid assay ranged from  $32.87 \pm 0.50$  to  $52.49 \pm 0.52$ . The application of the methanolic extract (ME) was able to significantly decrease the edema induced by croton oil, phenol and histamine. The histopathological analysis results and the evaluation of activity of the enzymes myeloperoxidase and n-acetyl- $\beta$ -d-glucosaminidase attest the effect of ME on the inhibition of the inflammatory process induced by croton oil. The results evidence that the *Coffea arabica* L. leaves present high concentrations phenolic substances and important pharmacological effects for technological application to development of new products in the pharmaceutical area.

**Keywords:** *Coffea arabica* L. Leaves. Antioxidant. Anti-inflammatory.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Frutos de <i>Coffea arabica</i> L. ....	24
<b>Figura 2 -</b>	Estrutura química da cafeína .....	25
<b>Figura 3 -</b>	Estrutura química dos ácidos clorogênicos e derivados .....	26
<b>Figura 4 -</b>	Estrutura química da mangiferina e seu isômero .....	27
<b>Figura 5 -</b>	Folhas de <i>Coffea arabica</i> L. ....	33
<b>Figura 6 -</b>	Cafeeiro ( <i>Coffea arabica</i> L.) .....	47
<b>Figura 7 -</b>	Fluxograma do processo de extração e fracionamento das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. ....	49
<b>Figura 8</b>	Cromatogramas do extrato metanólico e frações e da coinjeção das amostras com os padrões de 5-ACQ e mangiferina .....	68
<b>Figura 9</b>	Espectros ultravioleta dos picos 1 e 2 do cromatograma do extrato metanólico e da coinjeção com os padrões de 5-ACQ e mangiferina .....	69
<b>Figura 10 -</b>	Análise histopatológica do efeito do extrato metanólico das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. sobre o edema e infiltrado leucocitário no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica do óleo de cróton .....	84
<b>Figura 11 -</b>	Efeito do extrato metanólico das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. sobre as enzimas mieloperoxidase e n-acetil- $\beta$ -d-glicosaminidase .....	85

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -	Rendimento das frações obtidas por partição do extrato metanólico das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. ....	61
<b>Tabela 2</b> -	Teor de fenólicos totais em gramas equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de amostra (g EAG/100g).....	62
<b>Tabela 3</b> -	Teor de flavonoides totais em gramas equivalentes de rutina por 100 gramas de amostra (g ER/100g) .....	63
<b>Tabela 4</b>	Teor de 5- ACQ e mangiferina do extrato metanólico e frações das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. ....	70
<b>Tabela 5</b> -	Concentração efetiva 50% (CE <sub>50</sub> ) do extrato metanólico e frações das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. pelo método do sequestro do radical DPPH• .....	72
<b>Tabela 6</b> -	Concentração efetiva 50% (CE <sub>50</sub> ) do extrato metanólico e frações das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. pelo método do poder de redução do ferro .....	73
<b>Tabela 7</b> -	Percentual de inibição da peroxidação lipídica do extrato metanólico e frações das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. pelo método de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico .....	75
<b>Tabela 8</b> -	Efeito do extrato metanólico das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton .....	77
<b>Tabela 9</b> -	Efeito do extrato metanólico das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. sobre o edema de orelha induzido pelo fenol .....	78
<b>Tabela 10</b>	Efeito do extrato metanólico das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. sobre o edema de orelha induzido pela histamina .....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACG – Ácidos clorogênicos

ACQ – Ácido cafeoilquínico

AFQ – Ácido feruloilquínico

AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais

AA – Ácido araquidônico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEME – Central de Medicamentos

CLAE-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta

COX – Ciclo-oxigenase

diACQ – Ácido dicafeoilquínico

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH• – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EM – Extrato metanólico

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FA – Fração em acetato de etila

FB – Fração butanólica

FD – Fração diclorometânica

FH – Fração hexânica

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

IL – Interleucina

LT – Leucotrienos

LOX – Lipo-oxigenase

MPO – Mieloperoxidase

NAG – N-acetil- $\beta$ -d-glicosaminidase

NO – Óxido Nítrico

PG – Prostaglandinas

PKC – Proteína quinase C

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PPPM – Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais

PRGC – Peptídeos relacionados ao gene da calcitonina

OMS – Organização Mundial da Saúde

RENAME – Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

SE – Solução estoque

SP – Substância P

SUS – Sistema Único de Saúde

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TPA – 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol

TR – Tempo de retenção

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1 FONTES E REGULAMENTAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS .....	18
2.2 HISTÓRICO E MERCADO DO CAFÉ .....	20
2.3 CARACTERÍSTICAS MORFOAGRONÔMICAS DO CAFEIEIRO .....	22
2.4 CONSTITUINTES QUÍMICOS E SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DO CAFÉ .....	25
2.5 GRÃOS DE CAFÉ .....	27
2.6 SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ .....	31
<b>2.6.1 Folhas de café .....</b>	<b>32</b>
2.7 ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	34
<b>2.7.1 Mecanismos de defesa antioxidante .....</b>	<b>34</b>
<b>2.7.2 Substâncias relacionadas com a atividade antioxidante .....</b>	<b>35</b>
.....	
<b>2.7.3 Métodos utilizados na determinação da atividade antioxidante .....</b>	<b>38</b>
2.8 ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA .....	39
<b>2.8.1 Mecanismos de defesa anti-inflamatória .....</b>	<b>39</b>
<b>2.8.2 Substâncias relacionadas com a atividade anti-inflamatória .....</b>	<b>41</b>
.....	
<b>2.8.3 Métodos utilizados na determinação da atividade anti- inflamatória ..</b>	<b>43</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>46</b>
3.1 GERAL .....	46
3.2 ESPECÍFICOS .....	46
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	47

4.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO .....	48
4.3 PROCESSO DE FRACIONAMENTO .....	48
4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS .....	49
4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	50
4.6 IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E MANGIFERINA .....	51
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	52
<b>4.7.1 Método do sequestro do radical DPPH•.....</b>	<b>52</b>
<b>4.7.2 Método do poder de redução.....</b>	<b>53</b>
<b>4.7.3 Método da co-oxidação do <math>\beta</math>- caroteno / ácido linoleico .....</b>	<b>54</b>
4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA .....	55
<b>4.8.1 Animais .....</b>	<b>55</b>
<b>4.8.2 Métodos utilizados na avaliação da atividade anti-inflamatória .....</b>	<b>56</b>
<i>4.8.2.1 Método do edema da orelha induzido pelo óleo de cróton .....</i>	<i>57</i>
<i>4.8.2.2 Método do edema de orelha induzido pelo fenol .....</i>	<i>57</i>
<i>4.8.2.3 Método do edema de orelha induzido pela histamina .....</i>	<i>57</i>
4.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	58
5.0 DETERMINAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE .....	58
5.1 DETERMINAÇÃO DA N-ACETIL- $\beta$ -D-GLICOSAMINIDASE .....	59
6.0 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	60
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
7.1 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO.....	61
7.2 TEORES DE FENÓLICOS E FLAVONÓIDES TOTAIS .....	62
7.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO 5-CAFEOILQUÍNICO E MANGIFERINA .....	67



7.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	72
7.5 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA .....	76
7.5.1 Efeito do extrato metanólico das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton .....	76
7.5.2 Efeito do extrato metanólico das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. sobre o edema de orelha induzido pelo fenol .....	77
7.5.3 Efeito do extrato metanólico das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. sobre o edema de orelha induzido pela histamina .....	78
7.5.4 Análise histopatológica .....	83
7.5.5 Efeito do extrato metanólico das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. sobre as enzimas mieloperoxidase e n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase .....	85
8 CONCLUSÕES .....	90
REFERÊNCIAS.....	91

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de grãos de café, sendo os grãos verdes aplicados como insumos para a produção de extratos, em função do efeito exercido pelos ácidos fenólicos sobre diversas doenças metabólicas, dentre elas a obesidade. Estudos também apontam o efeito hipotensor dos ácidos clorogênicos, principais ácidos fenólicos do café (SHIMODA; SEKI; AITANI, 2006). Essas substâncias também estão envolvidas no controle de processos inflamatórios, por meio da inibição da cascata inflamatória, atuando como reguladores da proliferação e apoptose de algumas células cancerosas (GAWLIK-DZIKI et al, 2014). Na indústria, o potencial antioxidante do óleo de café verde favorece seu uso como matéria-prima na preparação de cremes e pomadas (DICKSON et al, 2015; DZIKI et al, 2015; FERRARI et al, 2010).

Entretanto, a maior parte da produção dos grãos ainda é direcionada para o consumo, usados principalmente na preparação da bebida do café, largamente apreciada pelo seu sabor e aroma característicos. Além dos atributos sensoriais, as atividades biológicas da bebida estimulam o elevado e crescente consumo do produto. As substâncias fenólicas, também presentes nos grãos torrados, apresentam comprovada atividade antioxidante e são capazes de desencadear no organismo diversos mecanismos protetores contra doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas e diabetes mellitus (ABRAHÃO et al, 2012; CAMPOS-ESPARZA; SÁNCHEZ-GÓMEZ; MATUTE, 2009; DICKSON et al 2015; FARAH, DONANGELO, 2006; OIC, 2016; SHAFIQUE et al, 2012).

O estudo dos grãos, tanto crus (verdes) quanto torrados, e dos subprodutos do seu processamento, tem ampliado cada vez mais a utilização dessa planta. Nesse sentido, verifica-se que após o beneficiamento das sementes, o resíduo gerado (casca e polpa), que até então seria descartado, passou a ser investigado quanto ao seu potencial farmacológico e possibilidades de aplicação biotecnológica (ALVAREZ; RODRIGUEZ, 2000; PALOMINO GARCÍA; DEL BIANCHI, 2015; PERRONE et al, 2008).

As folhas do cafeeiro, após a colheita dos grãos, também são consideradas resíduos do processamento, uma vez que a forma manual de colheita pela derrida do café, na qual os frutos são retirados de uma só vez, carreando galhos e folhas, ainda, é o tipo de prática mais empregada nas lavouras cafeeiras do Brasil. Desse

modo, o estudo e aproveitamento das folhas são de extrema importância, pois são produzidas em quantidades significativas e apresentam baixo valor agregado, se comparadas aos grãos. Além disso, o estado de Minas Gerais destaca-se pela maior produção de grãos em relação aos demais estados, gerando assim uma grande quantidade de folhas (MURTHY, NAIDU, 2012; OIC, 2016; SILVA, 2011).

Pesquisas relacionadas à avaliação da composição química e da atividade biológica das folhas do cafeeiro são escassas, sendo mais direcionadas à avaliação do efeito protetor que os metabólitos secundários exercem sobre a planta, bem como para o desenvolvimento de cultivares de café com alta produtividade e qualidade (DOMINGUES JÚNIOR et al, 2012; RAMIRO, GUERREIRO-FILHO, MAZZAFERA, 2006; SALGADO et al, 2008; TEIXEIRA et al, 2012).

Observa-se também que a aplicação das folhas para fins medicinais ou sua utilização na indústria farmacêutica como insumo ainda foi pouco investigada, sendo necessário, portanto, pesquisas mais aprofundadas sobre as suas propriedades farmacológicas (ABRAHÃO et al, 2010; MOREIRA et al, 2013; OIC, 2016; RAMALAKSHM, KUBRA, RAO, 2008; RUSAK et al, 2008).

Dessa forma, este trabalho propõe a investigação do potencial químico e farmacológico das folhas de *Coffea arabica* L. por meio da avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória, com intuito de demonstrar o emprego das folhas como uma opção terapêutica e fonte de substâncias de valor biológico relevantes para a indústria farmacêutica.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 FONTES E REGULAMENTAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

As plantas são uma fonte importante de substâncias naturais biologicamente ativas, sendo empregadas com finalidade terapêutica. Há registros de sua utilização no tratamento de enfermidades na Mesopotâmia, no ano de 2.600 a.C. Diversas substâncias relatadas, como os óleos de espécies de *Cedrus* (Cedar) e *Cupressus sempervirens* (Cypress), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), espécies de *Commiphora* (mirra) e *Papaver somniferum* (suco de papoula), são utilizadas até hoje para o tratamento de doenças que vão desde tosses e resfriados até infecções parasitárias e inflamações (BURSLEM et al, 2001; GURIB-FAKIM, 2006; LORENZI, MATOS, 2002). Nesse sentido, o conhecimento e a pesquisa da biodiversidade vegetal podem representar uma estratégia para a busca de novas opções terapêuticas.

O reino vegetal destaca-se pelo fornecimento de metabólitos secundários de forma mais expressiva que os outros reinos da natureza. Verifica-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo 25% oriundos de plantas, 12% de micro-organismos e 3% de animais (CALIXTO, 2001; ELISABETSKY, COSTA-CAMPOS, 1996; NEWMAN, CRAGG, 2014). É importante destacar que os produtos naturais apresentam inúmeras aplicações, como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos, o que aumenta sua representatividade e seu valor agregado (GURIB-FAKIM, 2006, PINTO et al, 2002; RATES, 2001).

O Brasil possui uma imensa biodiversidade e sua flora representa 22% das espécies de plantas superiores do planeta. O país é considerado um território vasto para a busca de novas substâncias de interesse biológico, o que favorece investimentos em pesquisas, considerando que somente uma pequena porcentagem das plantas nativas foi investigada quanto ao seu potencial medicinal (GURIB-FAKIM, 2006, PINTO et al, 2002; RATES, 2001).

Para avançar esse processo, nas últimas décadas, os órgãos governamentais tem estimulado o desenvolvimento de utilização de plantas medicinais em funções de suas aplicações terapêuticas. Além disso, há uma demanda crescente desses produtos, tendo em vista que um quarto de todas as prescrições médicas são

formulações baseadas em substâncias vegetais ou análogos sintéticos derivados de plantas. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), considerável parcela da população utiliza medicamentos derivados de plantas para a sua saúde, empregam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e utilizam fitoterápicos ou preparações a base de plantas (GURIB-FAKIM, 2006; OMS, 2002).

Inicialmente, as políticas governamentais impulsionaram o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais (PPPM) da Central de Medicamentos (CEME), do Ministério da Saúde, vigente entre 1982 e 1997, cujo objetivo era desenvolver uma terapêutica alternativa e complementar, com embasamento científico, por meio do estabelecimento de medicamentos fitoterápicos originados a partir da determinação do real valor farmacológico de preparações de uso popular, à base de plantas medicinais (BRASIL, 2006).

A partir de recomendações da OMS, o Brasil instituiu por intermédio da Portaria MS/GM nº 971, de 3 de maio de 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), a qual estimula a criação de hortos de espécies terapêuticas, bem como a utilização de plantas medicinais no Sistema Único de Saúde (SUS). A PNPIC destacou-se, pois estabeleceu parâmetros legais, priorizando as peculiaridades socioeconômicas, culturais e científicas brasileiras, além do incentivo ao desenvolvimento de produtos baseados em espécies bioativas nacionais (ROCHA et al, 2015).

No que diz respeito às políticas de saúde, instituiu-se também a Resolução da Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação – CIPLAN Nº 08, de 08/03/1988, que regulamentou a prática de Fitoterapia nos serviços de saúde, assim como criou procedimentos e rotinas relativas à prática da Fitoterapia nas Unidades Assistenciais Médicas. Além disso, a Portaria MS nº 886, de 20/04/2010 implantou a “Farmácia Viva” no SUS, a qual realiza todas as etapas, desde o cultivo, a coleta, o processamento, o armazenamento de plantas medicinais, a manipulação até a dispensação de preparações magistrais e oficinais de plantas medicinais e produtos fitoterápicos.

Em 2012, o Ministério da Saúde publicou a Portaria MS/GM nº 533, de 28 de março de 2012, na qual estabeleceu o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME, incluindo mais quatro medicamentos fitoterápicos – babosa, hortelã, plantago e salgueiro.

Com intuito de normatizar as políticas de utilização de plantas medicinais, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou uma série de portarias e resoluções para o uso de drogas vegetais, como a RDC nº 10, de 10/03/2010, que dispõe sobre a notificação de drogas vegetais e a RDC nº 13, de 14/03/2013, que institui as boas práticas de fabricação de produtos tradicionais fitoterápicos. Em relação aos medicamentos fitoterápicos citam-se a RDC nº 26, de 13/05/2014, que orienta sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, a resolução nº 90, de 16/03/2004, que preconiza a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos e a RDC nº 14, de 14/03/2013, que trata das boas práticas de fabricação de insumos farmacêuticos ativos de origem vegetal.

Considerando as perspectivas culturais e econômicas, bem como a necessidade de integrar aos sistemas oficiais de saúde práticas reconhecidamente eficazes e seguras, de forma a ampliar o acesso e o uso racional aos medicamentos, verifica-se que investimentos em estudos de plantas medicinais e fitoterápicos é uma estratégia para priorizar recursos e pesquisas em espécies vegetais medicinais, com vistas ao desenvolvimento de produtos/medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2006; PINTO et al, 2002; SANTOS et al, 2011).

## 2.2 HISTÓRICO E MERCADO DO CAFÉ

O café é uma das principais *commodities* agrícolas produzidas no Brasil, sendo responsável por 30% do mercado internacional. Especificamente, Minas Gerais sobressai pela maior produção, estimada em 25,7 milhões de sacas na safra 2017, predominantemente da variedade *Coffea arabica* L (ABIC, 2016; OIC, 2016). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a participação percentual da produção de café do estado de Minas Gerais, que concentra a maior área com a espécie, 1,21 milhão de hectares, corresponde a 68,2% da área ocupada com café arábica, em nível nacional. São Paulo é o segundo maior produtor de arábica e cultiva 12,1% (213,47 mil hectares) da área total do país. Os demais estados possuem participação inferior a 10% (CONAB, 2017).

A bebida do café é considerada uma das mais apreciadas em todo mundo devido aos seus atributos sensoriais e efeitos fisiológicos, principalmente pela ação

estimulante. A espécie *Coffea arabica* L. é a mais cultivada, correspondendo a mais de 70% da produção mundial de café. Essa maior representatividade no cultivo deve-se ao fato da *C. arabica* ser uma variedade com maior aceitação sensorial pelos consumidores, em comparação com o *Coffea canephora* (OIC, 2016; VAN DER VOSSSEN, BERTRAND, CHARRIER, 2015).

O relato mais conhecido sobre sua descoberta foi registrado no manuscrito do lêmên, no ano de 575. Este faz menção à Lenda de Kaldi, onde um pastor observou o efeito estimulante das folhas e frutos do café nas cabras, que apresentavam maior resistência e agilidade ao subir montanhas íngremes e percorrer longos trajetos. Mais tarde, o pastor da Etiópia experimentou os frutos, constatando o efeito estimulante do café (GOLE et al, 2008; MARTINS, 2012).

A África foi o território de origem do café, especificamente no interior da Etiópia, onde se consumia a polpa do fruto ou misturava-se nas refeições. Além disso, as folhas eram maceradas para o preparo de chás. Entretanto, foram os árabes que dominaram a técnica inicial do plantio e preparação do produto. De acordo com os mesmos manuscritos de 575, a primeira região a receber as sementes do café foi o lêmên, no sudoeste da Ásia. Somente no ano de 1000 conheceu-se a infusão das frutas fervidas em água, usadas para fins medicinais e por monges nas rezas e vigílias noturnas (ABIC, 2016; GOLE et al, 2008; MARTINS, 2012).

Em relação ao processo de torração, como é conhecido nos dias atuais, esse só foi instituído no século XIV. As plantas foram denominadas *kaweh* e sua bebida nomeada de *Kahwah* ou *Cahue*, que significa força em árabe (ABIC, 2016; MARTINS, 2012). Ainda no século XIV, o lêmên ampliou a produção comercial pela facilidade de irrigação dos pés de café com as águas dos poços que também serviam a população. Do mesmo modo, o café se difundiu largamente na península arábica, sendo visto como uma bebida exótica, planta embriagadora e misteriosa e que vinha ao encontro dos preceitos religiosos do Islamismo, regidos pelo Alcorão, que condenava bebidas alcoólicas (ABIC, 2016; MARTINS, 2012).

Somente em 1450, o hábito de tomar café em recintos domésticos se consolidou, em função do interesse pela bebida e pelo potencial de comercialização, que se ampliou largamente no mundo árabe. A Turquia se destacou pelo consumo do café, ritual que se propagou por todo o mundo. No Brasil, o café chegou a Belém, no ano de 1727, e, desde então, o consumo e o plantio intensificaram-se ao longo dos séculos, não

demorando muito até que o Brasil fosse considerado o maior produtor de café do mundo (ABIC, 2016; MARTINS, 2012).

Inicialmente, os efeitos estimulantes no sistema nervoso central, provocados principalmente pela cafeína despertaram o interesse da comunidade científica. Na prática, percebe-se um revigoramento, diminuição do sono e da fadiga após o consumo de doses terapêuticas, e em algumas pesquisas demonstrou-se a melhora da cognição e do desempenho psicomotor. Verificou-se também um aumento da disponibilidade de energia, do gasto energético diário, da agilidade, vigília, da capacidade de se concentrar e focar a atenção, além de aprimorar o funcionamento da memória de curto prazo (GLADE, 2010; LORIST, TOPS, 2003).

Porteriormente, estudos sobre outras substâncias com propriedades farmacológicas do café difundiram-se, como por exemplo, os ácidos clorogênicos, que desempenham um importante papel no combate aos radicais livres, podendo ser consideradas substâncias antioxidantes naturais (ABRAHÃO et al, 2008; FARAH, DONANGELO, 2006; GORNAS et al, 2016; LIANG et al, 2016).

Das espécies catalogadas, duas são importantes pelo valor comercial, representando 99% da produção mundial do café: *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. A primeira fornece o café arábica, com atributos sensoriais diferenciados; a segunda, a variedade robusta, produz o café *conillon*, mais resistente às pragas e às intempéries, mas não oferece bebida tão qualificada, possuindo sabor adstringente e mais amargo (CAMARGO, 2010; DAVIS et al, 2006).

### 2.3 CARACTERÍSTICAS MORFOAGRONÔMICAS DO CAFEIEIRO

O café origina-se de um arbusto da família *Rubiaceae*, caracterizada pela presença de iridoides (um grupo de monoterpenoides), alcaloides (incluindo alcaloides indólicos como a quinina, obtida a partir de espécies de Cinchona), metilxantinas, tais como a cafeína, teobromina, teofilina e antranoides (GÓMEZ-RUIZ, LEAKE, AMES, 2007; GURIB-FAKIM, 2006).

O cafeeiro desenvolve-se principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Os arbustos são lenhosos e atingem em média 3 metros, podendo chegar até 12 metros de altura. Sua raiz é extensa e preenche os primeiros 60 cm da camada de solo, podendo atingir até 3 m de profundidade. É considerada uma planta de dias curtos, necessitando



do período da noite para iniciar a floração. Após a germinação das sementes, os arbustos de café podem levar de 3 a 5 anos para florescer e gerar frutos (CLAY, 2004; GLIMN-LACY, KAUFMAN, 2006; MARTINS, 2012).

Normalmente, o cafeeiro tem um único tronco principal, mas pode ser cultivado utilizando um sistema de troncos múltiplos. Os ramos ortotrópicos (verticais) estendem-se do tronco principal e, a partir deles ocorre a ramificação dos plagiotrópicos (horizontais). As inflorescências estão presentes como aglomerados ou botões em série nas axilas dos ramos plagiotrópicos. Em cada região axilar da planta há de 2 a 20 flores. Estas são suportadas por um curto pedúnculo e por um cálice rudimentar de cinco pétalas, uma corola branca, e anteras relativamente curtas (DAMATTA, 2004; DAVIS et al, 2006; WINTGEN, 2013).

A espécie *C. arabica* é uma planta complexa, contendo 44 cromossomos, e só pode fazer cruzamentos com a mesma espécie. Trata-se de uma variedade mais delicada, que se desenvolve preferencialmente em altitudes elevadas, de 1000 a 2800 m acima do nível do mar. Além disso, exige um clima mais ameno. Seu desenvolvimento é favorável quando é cultivada em ambientes com 1200 a 1800 mm de chuva por ano e temperaturas em torno de 18-21°C (DAMATTA, 2004; DAVIS et al, 2006).

O estágio de floração da *C. arabica* pode variar de região para região, mas geralmente situa-se entre janeiro e abril. O florescimento ocorre após um período de chuvas, com grandes volumes de precipitação, seguido de uma fase de seca, e dura em torno de 1 a 3 dias. Terminado esse ciclo, os frutos desenvolvem-se ao longo dos 7 a 10 meses subsequentes (KLEIN, DEWENTER, TSCHARNTKE, 2003; WINTGEN, 2013).

O fruto do cafeeiro é formado por exocarpo, mesocarpo, pergaminho ou endocarpo e sementes ou grãos. A casca (exocarpo) modifica-se de verde para vermelha ou amarela com o amadurecimento, atingindo o estado de “cereja”, conforme ilustrado na Figura 1 (MARTINS, 2012; WINTGEN, 2013).

Recomenda-se que a colheita seja efetuada no máximo 2 a 3 meses após o amadurecimento do fruto, para evitar sua deterioração ocasionada pela fermentação dos açúcares presentes na mucilagem. Após a colheita, o fruto passa por um processo de beneficiamento, cujo objetivo é separar as sementes, que constituem o produto comercializável (ABIC, 2016; CARDOSO, 1994).

Figura 1 – Frutos de *Coffea arabica* L.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Depois de colhidos, os frutos do café podem ser preparados por via seca ou úmida. A primeira consiste na secagem em terreiro, pré-secador/secador mecânico, onde o fruto passa pelo processo de secagem na sua forma integral (com casca e mucilagem), dando origem aos cafés denominados coco ou de terreiro. Já na via úmida, antes da secagem, o café é submetido à operação de descascamento, e posteriormente, a mucilagem pode ser removida por processo fermentativo ou mecânico (BORÉM et al, 2008; RESENDE, ARCANJO, SIQUEIRA, 2009).

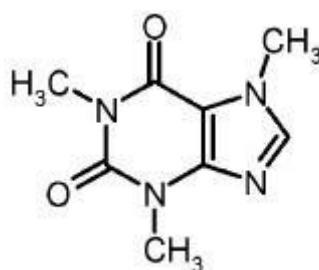
O beneficiamento dos grãos gera uma quantidade de resíduos com grande potencial de reaproveitamento. Nesse sentido, verifica-se a utilização das cascas de café na alimentação animal, como adubo orgânico, além de diversas possibilidades de aplicações. Há também estudos demonstrando sua utilização na produção de biocombustíveis (ALVAREZ, RODRIGUEZ, 2000; SILVA, 2011; SOCCOL, 2002).

## 2.4 CONSTITUINTES QUÍMICOS E SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DO CAFÉ

O café possui mais de mil componentes químicos, o que o torna um produto bastante complexo, apresentando na sua composição pseudoalcaloides como a cafeína, além de minerais, ácidos clorogênicos, ácidos alifáticos, lipídeos, carboidratos, aminoácidos e compostos voláteis (CLARKE; MACRAE, 1989; ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; GEORGE, RAMALAKSHMI, RAO, 2008; LUDWIG et al, 2014).

O teor de cafeína presente nos grãos de café varia entre 1 e 2,5%. Trata-se de um pseudoalcaloide do grupo das xantinas (Figura 2) identificado como 1,3,7-trimetilxantina, cuja estrutura contém um esqueleto de purina, sendo a substância estimulante mais utilizada e mais estudada no mundo. A sua aplicação é direcionada ao consumo na forma de bebidas energéticas, chás e principalmente café. Também pode ser utilizada na indústria farmacêutica para a formulação de alguns medicamentos, como por exemplo, os antigripais (JESZKA-SKOWRON; ZGOLA-GRZESKOWIAK; GRZESKOWIAK, 2015; TOCI; FARAH; TRUGO, 2006).

Figura 2 – Estrutura química da cafeína

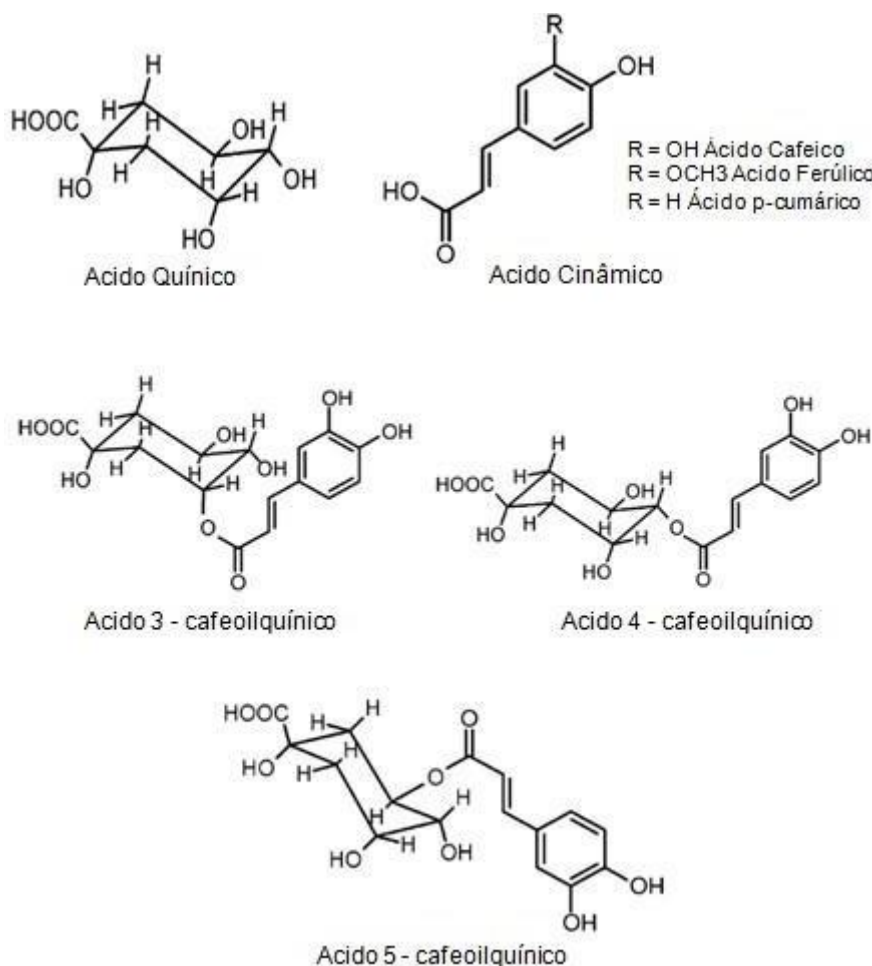


Fonte: adaptado de JESZKA-SKOWRON; ZGOLA-GRZESKOWIAK; GRZESKOWIAK, 2015.

Outra classe de substâncias de grande relevância presente no café é a dos compostos fenólicos, que contribuem para o sabor e aroma da bebida. Nos frutos são responsáveis pela adstringência. Estão presentes nos grãos verdes e torrados, assim como em outras partes da planta. O interesse por essas substâncias está relacionado à suas funções biológicas, principalmente no que diz respeito à atividade antioxidante (ABRAHÃO et al, 2008; CLIFFORD et al, 2008; JAISWAL et al, 2012).

Os fenólicos do café são representados principalmente pelos ácidos clorogênicos e seus isômeros, formados essencialmente pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos derivados do ácido cinâmico: ácido cafeico e felúrico ou *p*-cumárico. Esses grupos são ácidos cafeoilquínicos, ácidos dicafeoilquínicos, feruloilquínico, ácido *p*-cumaroilquínico e ácido cafeoilferuloilquínicos. A figura 3 demonstra os três isômeros derivados do ácido quínico e cafeico. O isômero majoritário no café é o ácido-5-cafeoilquínico (CLARKE; MACRAE, 1989; JESZKA-SKOWRON; ZGOLA-GRZESKOWIAK; GRZESKOWIAK, 2015; LUDWIG et al, 2014).

Figura 3 – Estruturas químicas dos ácidos clorogênicos e derivados



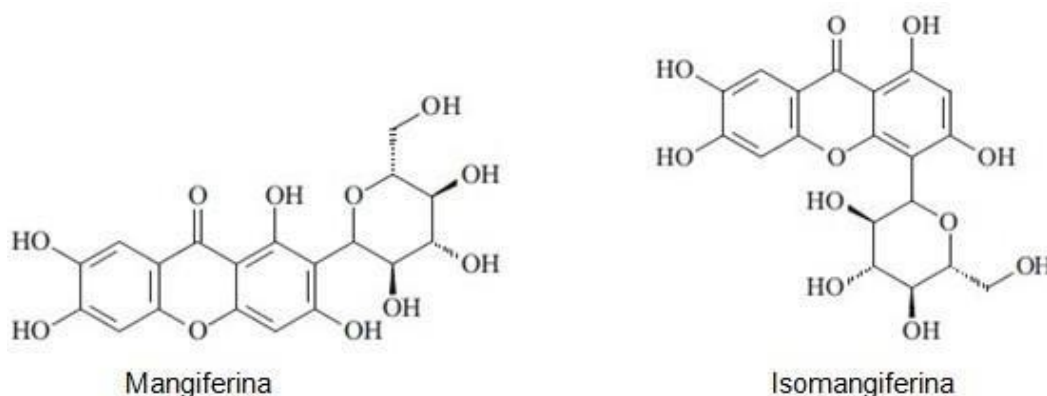
Fonte: adaptado de JESZKA-SKOWRON; ZGOLA-GRZESKOWIAK; GRZESKOWIAK, 2015.

Além dos ácidos clorogênicos, o café apresenta outras substâncias com propriedades terapêuticas importantes, que têm sido alvo de estudos. A mangiferina

foi encontrada em diversas espécies de café, e acumula-se especialmente nas folhas, estando presente nos frutos em menores quantidades. Trata-se de uma substância fenólica com diversas atividades farmacológicas como antiviral, antibacteriana, analgésica, anti-inflamatória, antioxidante e imunomodulatória (CAMPA et al, 2012; CAMPOS-ESPARZA; SÁNCHEZ-GÓMEZ; MATUTE, 2009; BARRETO et al, 2008; PARDO-ANDREU et al, 2008).

A mangiferina (1,3,6,7-tetra-hidroxi-xantona-C2- $\beta$ -glicosídeo), isolada pela primeira vez da mangueira (*Mangifera indica* L.), família Anacardiaceae, é uma xantona C-glicosilada altamente resistente a hidrólise (CAMPA et al, 2012; BARRETO et al, 2008; TREVISAN et al, 2016). Nas folhas de café, foi identificada pela primeira vez na espécie *Coffea pseudozanguebariae* (TALAMOND et al, 2008). A figura 4 demonstra sua estrutura química.

Figura 4 – Estrutura química da mangiferina e seu isômero



Fonte: Adaptado de TREVISAN et al, 2016

## 2.5 GRÃOS DE CAFÉ

Os grãos imaturos caracterizam-se por apresentar cheiro similar ao feijão verde. São constituídos de cafeína, ácidos clorogênicos e trigonelina, oligossacarídeos, polissacarídeos, proteínas, lipídeos e minerais, dentre outros. O teor de carboidratos presente no óleo do café verde varia de 50 a 60%, sendo representados pela sacarose, celulose, substâncias pécicas e polissacarídeos de alto peso molecular (AZEVEDO et al, 2008; CLARKE, MACRAE, 1989).

Com relação à fração lipídica do café verde, esta pode variar de 7 a 17%. É constituída essencialmente de triacilgliceróis, representando 75%, além de ácidos graxos livres, cujo teor é similar aos óleos vegetais comuns. A fração insaponificável é composta de esteróis, tocogerois, fosfatídeos, ceramidas, entre outros componentes minoritários (FERRARI et al, 2010; PERRONE et al, 2008).

As propriedades biológicas do óleo de café têm sido demonstradas em diversos estudos. Evidenciou-se atividade antioxidante, devido ao teor elevado de ácidos clorogênicos (PERRONE et al, 2008). Outra aplicação do óleo de café é sua utilização no tratamento do câncer. Neste último caso, comprovou-se ação quimioprotetora de alguns componentes, como a cafeína e os polifenóis, incluindo os ácidos clorogênicos (FERRAZZANO et al, 2009). Os diterpenos cafestol e kahweol também podem estar relacionados ao efeito quimioprotetor (MURIEL, ARAUZ, 2010).

Por possuir uma série de compostos bioativos, como cafeína e ácidos fenólicos, os grãos imaturos passaram a ter diversas aplicações na indústria farmacêutica, especialmente devido às substâncias antioxidantes presentes. Utiliza-se o óleo de café verde, o qual é obtido a partir da prensa de grãos não torrados, na manipulação de cremes e pomadas formuladas para o tratamento de diversas doenças, como da psoríase, eczemas, além de combater o envelhecimento da pele (ABRAHÃO et al, 2010; FERRARI et al, 2010).

Alguns estudos têm indicado que o extrato de café verde é efetivo no combate ao diabetes e à hipertensão arterial, apesar da maioria das pesquisas realizadas ainda serem direcionadas para o consumo da bebida. Essa ação anti-hipertensiva parece estar relacionada a fatores vasorreativos produzidos e liberados pelo endotélio vascular (PALMER et al, 1995). Com relação aos efeitos metabólicos sobre o organismo humano, estes já estão bem estabelecidos, através da associação inversa entre o consumo de café e o risco de diabetes (DICKSON et al, 2015).

Por outro lado, a resposta da utilização do café sobre a hipertensão, doença coronariana e arritmia cardíaca ainda é controversa, pois se evidenciou o aumento da pressão sanguínea, das concentrações circulantes de noradrenalina e verificou-se um aumento da rigidez arterial, e uma ação prejudicial sobre a vasodilatação do endotélio e sobre o pré-condicionamento isquêmico (ALVES, CASAL, OLIVEIRA, 2009; RIKSEN, RONGEN, SMITS, 2009).

Em contrapartida, um estudo demonstrou que o consumo agudo de café verde proporcionou a estabilização da glicose no sangue 30 minutos após a ingestão de uma refeição, o que seria favorável para os casos de *diabetes mellitus*. Além disso, observou-se redução da uracemia, fundamental para diminuição dos riscos cardiovasculares, uma vez que altas concentrações de ácido úrico foram identificadas como fator de risco cardiovascular (JÁCOME et al, 2009).

A cafeína e os compostos fenólicos, especialmente os ácidos clorogênicos, presentes nos grãos de café verde, desempenham um importante papel no controle do peso, sendo utilizados como suplementos alimentares. Atuam reduzindo a gordura visceral e o peso corporal, por meio da lipólise, além de exercer efeitos preventivos contra diversas doenças degenerativas (CAMPOS-ESPARZA; SÁNCHEZ-GÓMEZ; MATUTE, 2009; DICKSON et al, 2015; DZIKI et al, 2015; SHIMODA, SEKI, AITANI, 2006)

O café é uma bebida de grande popularidade, consumida mundialmente, com aroma e sabor característicos, o que atrai diversos consumidores. Sua qualidade está diretamente relacionada às propriedades sensoriais apresentadas. Durante a torração dos grãos, ocorrem mudanças de natureza física e química, que desencadeiam centenas de reações, como por exemplo, reações de hidrólise, desidratação, oxidação e catálise, liberando gases e formando compostos aromáticos (ABRAHÃO et al 2008; FARAH et al 2006). As principais alterações oriundas da torração ocorrem devido a transformações de substâncias que estão presentes naturalmente no café verde; geração de compostos derivados da reação de *Maillard*, caramelização de carboidratos e pirólise de compostos orgânicos (CLARKE; MACRAE, 1989).

O processo de torração consiste no aquecimento dos grãos a 200- 240°C por 10-15 minutos. Estes mudam da cor verde no grão cru para várias tonalidades de marrom no grão torrado, com redução do seu peso e aumento de volume. Tais mudanças podem ser atribuídas à reação de *Maillard*, que ocorre durante o processo de torração, a qual influencia não só a cor e o aroma da bebida, mas também é conhecida por interferir na estabilidade oxidativa de muitos alimentos processados e desempenhar um importante papel como fator protetor da saúde, por meio da formação de substâncias com propriedades antioxidantes (ILLY, VIANI, 1995; MACRAE, 1989; O'BRIEN, MORRISSEY, 1989).

A torração dos grãos promove diversas alterações nos compostos presentes no café: os açúcares, em particular a sacarose, irão atuar como precursores de aroma e sabor, originando várias substâncias como os furanos, aldeídos e ácidos carboxílicos; a trigonelina irá formar com sua degradação térmica os pirrois, que são fundamentais para o aroma do café e conferem desde notas de pão e caramelo à de carne bovina; a cafeína possui um característico amargor, que contribui para o sabor e aroma do café; os ácidos clorogênicos, após serem degradados pela torração, geram lactonas e substâncias fenólicas, as quais também conferem o amargor, e, no caso dos ácidos fenólicos, estes são responsáveis pela adstringência da bebida (TOCI, FARAH, TRUGO, 2006; TRUGO, MOREIRA, DE MARIA, 1999).

Os compostos fenólicos são de grande interesse, em função de seus efeitos antioxidantes, e estão presentes no café torrado em grandes quantidades. Além da atividade antioxidante, estudos demonstraram que os fenólicos apresentam diversas propriedades, como anti-inflamatória (DOS SANTOS et al, 2006), antiviral (ZHU et al, 1999) e antimutagênica (STICH, ROSIN, BRYSON, 1982). Constatou-se também a diminuição dos níveis séricos de glicose e aumento da sensibilidade à insulina após o consumo de ácidos clorogênicos e produtos de sua degradação durante a torração (SHEARER et al, 2003).

Nesse contexto, verifica-se um aumento considerável de estudos sobre o café, correlacionando as substâncias presentes com suas atividades biológicas no combate a diversas doenças. Avaliou-se a relação entre o consumo da bebida e a incidência do câncer de próstata, demonstrando sua ação antitumoral (SHAFIQUE et al, 2012). A diminuição da incidência da doença de Parkinson (SÄÄKSJÄRVI et al, 2008) e o papel neuroprotetor na doença do Alzheimer (MAIA, DE MENDONÇA, 2002) também foram associados ao seu consumo.



## 2.6 SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DO CAFÉ

Considerando que o café é uma das principais commodities comercializadas no mundo, sua produção e consumo em larga escala levam a geração de uma enorme quantidade de resíduos, como folhas e cascas, que necessitam de um destino adequado (OIC, 2016; SOCCOL, 2002).

A quantidade de casca de café gerada durante o processamento equivale ao total de grãos beneficiados. Apesar da grande quantidade de resíduos gerados no meio agrícola e agroindustrial, apenas uma pequena parcela é aproveitada, devido ao desconhecimento do potencial energético e pela falta de equipamentos apropriados para sua utilização (MAGALHÃES et al, 2008; PANDEY et al, 2000).

Os resíduos gerados do tratamento das cerejas de café são a polpa pelo processo da via úmida e a casca na via seca. Sabe-se que 80% do café produzido no Brasil provem da via seca e que a produção em 2017 pode ultrapassar 45 milhões de sacas. Esses valores indicam a geração de uma grande quantidade de resíduos, e considerando a evolução dos processos ambientais na gestão dos resíduos, torna-se fundamental a reutilização e otimização dos subprodutos do café (CONAB, 2017; MURTHY, NAIDU, 2012; PANDEY et al, 2000; SILVA, 2011).

Para minimizar o impacto ambiental, resíduos como a casca e a polpa podem ser utilizados como matérias-primas para a produção de bioprodutos de maior valor agregado como etanol, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e cogumelos, em função do teor significativo de açúcares, utilizado como substrato por fungos e leveduras em diversos bioprocessos. Além disso, o aproveitamento da borra de café, gerada no processo industrial do café solúvel, pode ser empregado como fonte de energia, sendo viável para a produção de biodiesel (PANDEY et al, 2000; SANTOS, 2010; SILVA, 2011).

Após a extração das sementes de café por alta pressão, obtém-se um resíduo denominado torta. Esta pode ser reaproveitada na produção de cosméticos, gerando um produto de alto valor agregado, além dos benefícios sua utilização, já que esses resíduos apresentam uma grande quantidade de substâncias bioativas, com destaque para os compostos fenólicos, pelas suas propriedades antioxidantes, além de fotoprotetoras. Adicionalmente, apresentam efeito emoliente em função dos ácidos graxos (ALVAREZ; RODRIGUEZ, 2000; PERRONE et al, 2008).

Além da borra e da casca do café, as folhas também podem ser utilizadas para fins terapêuticos, em função dos compostos bioativos presentes. Após a colheita e beneficiamento dos grãos, as folhas se tornam um resíduo com alto potencial farmacológico. Existem poucos estudos sobre sua utilização, apesar de já ter sido evidenciado um alto conteúdo de substâncias fenólicas, responsáveis por exercer diversas funções no organismo, dentre elas, a atividade antioxidante (CAMPA et al, 2012; MONDOLOT et al, 2006; MURTHY, NAIDU, 2012; SALGADO et al, 2008; TREVISAN, et al 2016).

### **2.6.1 Folhas de café**

As folhas de café podem ser consideradas como resíduos do beneficiamento dos grãos. Tendo em vista que o Brasil é um dos maiores produtores de café do mundo, a geração desse resíduo é bastante representativa. Além disso, o processo mais popular de colheita do café é a derrça, onde ocorre a retirada dos frutos das árvores de uma só vez, o que aumenta o volume de resíduo gerado, pois as folhas e pedaços de galhos são removidos junto com o café. Nesse, sentido, o estudo das propriedades biológicas das folhas, bem como do seu reaproveitamento é de suma importância, pois, como os grãos têm maior valor agregado, a utilização das folhas passa a ser uma alternativa na busca de substâncias bioativas (CAMPA et al, 2012; OIC, 2016; MURTHY, NAIDU, 2012; SILVA, 2011; TREVISAN, et al 2016).

A maioria das espécies apresenta folhas persistentes, isto é, continuam na planta após o amadurecimento ou envelhecimento das flores. Possuem pedicelo curto. Este corresponde a uma estrutura originada da modificação do caule, responsável pela sustentação e condução da seiva para as flores. No caule, as folhas são opostas e cruzadas e apresentam margens ligeiramente onduladas. No ramo plagiotrópico, as folhas são opostas e no mesmo plano (DAVIS et al, 2006; WINTGEN, 2013).

As lâminas foliares do cafeeiro são onduladas e delgadas, com forma entre elíptica e lanceolada. Possuem camadas de células externas epidérmicas que são revestidas por ceras cuticulares (cutina, cera, polissacarídeos) que ajudam a reduzir as perdas de água e proteger o tecido foliar. Nas folhas, ocorrem as principais reações metabólicas e as alterações fisiológicas. A avaliação do estado nutricional

das plantas, geralmente é realizada pela análise foliar (ALVES, GUIMARÃES, 2010; DAVIS et al, 2006).

Com relação à coloração, as folhas novas apresentam-se verde claras ou bronzeadas (Figura 5), e verde escuras quando maduras. Possuem forma elíptica com a lâmina superior brilhante e a lâmina inferior sem brilho. Esta última, apresenta em média 200 células estomáticas por mm<sup>2</sup> para a variedade *C. arabica* (DAMATTA, 2004; WINTGEN, 2013).

Figura 5 – Folhas de *Coffea arabica* L.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

As folhas do cafeeiro apresentam quantidades elevadas de compostos fenólicos, fundamentais para a proteção do vegetal contra pragas e outros agentes nocivos, pois exercem efeitos antioxidantes e antibacterianos. Dentre as substâncias fenólicas descritas, os ácidos clorogênicos são as mais representativas, estando presentes em quantidades superiores nas folhas da variedade *C. arabica*, em comparação com outras espécies. Os principais isômeros encontrados são os ácidos cafeoilquínico (ACQ), o ácido feruloilquínico (AFQ), o ácido dicafeoilquínico (diACQ), que apresentam comprovada ação antioxidante. Destaca-se o ACQ, principalmente o isômero 5-ACQ nessa espécie (CAMPA et al, 2012; RAMIRO, GUERREIRO-FILHO, MAZZAFERA, 2006; SALGADO et al, 2008).

O conteúdo de compostos fenólicos acumulados nas folhas justificam os efeitos benéficos do seu consumo na forma de chá, pois exercem ação protetora contra os radicais livres, que estão associados ao aparecimento de diversas doenças crônico-degenerativas. Entretanto, a infusão das folhas de café é pouco

difundida no Brasil, onde a forma de consumo prevalente é da bebida obtida a partir dos grãos torrados. A infusão das folhas é mais comum em países da África e Ásia (ABRAHÃO et al, 2010; ESQUIVEL; JIMÉNEZ, 2012; CAMPA et al, 2012; FERRAZZANO et al, 2009; LUDWIG et al, 2014; TREVISAN et al, 2016).

Pesquisas utilizando extrato etanólico das folhas de *C. arabica* demonstraram sua atividade antioxidante, além do efeito inibitório sobre a peroxidação lipídica e sobre a agregação plaquetária (SIMÕES, 2014). Nesse sentido, o estudo aprofundado dos extratos das folhas do café pode contribuir para a obtenção de fontes alternativas de obtenção compostos bioativos, com potencial aplicação na indústria farmacêutica, que ainda utiliza como matéria-prima principalmente os grãos verdes (DICKSON et al, 2015; DZIKI et al, 2015; FERRARI et al, 2010; SÁNCHEZ-GÓMEZ; MATUTE, 2009).

Além dos ácidos clorogênicos presentes nas folhas de *C. arabica*, outros compostos fenólicos, como a mangiferina, são importantes para a proteção do vegetal contra pragas e doenças, em função dos efeitos antioxidante e antimicrobiano. Esse metabólito tem despertado o interesse da comunidade científica por apresentar efeitos benéficos no controle da obesidade, além de desencadear no organismo efeitos hipoglicemiantes, hipolipemiantes, antioxidante, anti-inflamatório, imunomodulatório, antitumoral, neuroprotetor e hepatoprotetor (BARRETO et al, 2008; BHOWMIK et al, 2009; CAMPA et al, 2012; CAMPOS-ESPARZA; SÁNCHEZ-GÓMEZ; MATUTE, 2009; GARRIDO et al, 2004; PARDO-ANDREU et al, 2008; RIBEIRO et al, 2007; TREVISAN et al, 2016).

## 2.7 ASPECTOS GERAIS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 2.7.1 Mecanismos de defesa antioxidante

As substâncias antioxidantes atuam em baixas concentrações nos organismos, inibindo ou retardando a oxidação de diversos substratos e, dessa forma, protegem os sistemas biológicos contra efeitos nocivos dos radicais livres. Esses radicais são moléculas altamente instáveis, com meia vida curtíssima e quimicamente muito reativas, pois possuem um ou mais elétrons desemparelhados, necessitando completar seus pares de elétrons para se estabilizarem. Ao reagirem com uma

molécula adicional, geram outro radical livre, iniciando uma reação em cadeia (FRANKLIN et al, 2009; LOPÉS-ALACON, DENICOLA, 2013; ROVER JÚNIOR et al, 2001).

A maioria dos radicais livres é derivada do oxigênio, nitrogênio e enxofre, originando as espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e espécies reativas de enxofre (ERE). As ERO são produzidas em quantidades mais significativas e incluem diversas espécies radicalares, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroperoxila ( $HO_2^*$ ), peroxila ( $^*OH$ ) e óxido nítrico (NO). Outras espécies intermediárias, como o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e ácido hipocloroso (HClO) também são capazes de formar radicais livres no organismo (CAROCHO, FERREIRA, 2013; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; LOPÉS-ALACON, DENICOLA, 2013).

Há dois mecanismos de defesa antioxidante desencadeada no organismo: o primeiro corresponde à inibição da formação de radicais livres capazes de desencadear a etapa de iniciação ou autoxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperoxídeos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete. O segundo está relacionado à eliminação de radicais importantes na fase de propagação, como hidroperoxila e peroxila, por meio da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre (CAMPOS-ESPARZA; SÁNCHEZ-GÓMEZ; MATUTE, 2009; CAROCHO, FERREIRA, 2013; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; SOOBRAATTEE et al, 2005).

### **2.7.2 Substâncias relacionadas com a atividade antioxidante**

As substâncias antioxidantes são amplamente encontradas no reino vegetal, e sua atividade está relacionada principalmente ao conteúdo de compostos fenólicos, que têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipo-oxigenase *in vitro*. A atividade antioxidante desses metabólitos deve-se, principalmente, às suas propriedades redutoras e estrutura química. Atuam como sequestradores de radicais livres e, em alguns casos, como quelantes de metais,

tanto na etapa de iniciação quanto no desencadeamento do processo oxidativo. Uma característica importante neste processo é que os produtos intermediários formados pela ação das substâncias fenólicas são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático presente nessas estruturas (CAMPOS-ESPARZA; SÁNCHEZ-GÓMEZ; MATUTE, 2009; CAROCHO, FERREIRA, 2013; FRANKLIN et al, 2009; HASLAM, 1996; LOPÉS-ALACON, DENICOLA, 2013; SOOBRAATTEE et al, 2005).

As substâncias fenólicas originam-se do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Formam-se em condições de estresse do vegetal, como nas infecções, ferimentos e radiações UV. Estruturalmente, apresentam anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e por isso, são multifuncionais. Enquadra-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoicos e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (MATKOWSKI, 2008; SOOBRAATTEE et al, 2005; SOUSA et al, 2007).

No café torrado, além das substâncias fenólicas contribuírem para sabor e aroma, elas também apresentam propriedades farmacológicas e fisiológicas importantes. Estudos demonstraram que a atividade antioxidante nos frutos de café está associada principalmente a esses metabólitos. Além disso, correlacionam-se com a prevenção do fotoenvelhecimento, pois são capazes de inibir processos de degradação da pele causados pela radiação ultravioleta. Neste caso, extratos de plantas com teores significativos de compostos fenólicos têm se mostrado muito eficazes, pois exibem atividades antioxidante, fotoprotetora e anti-inflamatória (ABRAHÃO et al, 2010; CUNHA et al, 2004; FARAH, DONANGELO, 2006).

Os ácidos clorogênicos constituem os principais compostos fenólicos não voláteis encontrados no café. Apresentam propriedades funcionais relevantes na neutralização de radicais livres (CLIFFORD, 1999; PERRONE et al, 2008). Pesquisas comprovaram a atividade antioxidante dos ácidos clorogênicos presentes nos grãos verdes e torrados, assim como da bebida. Dentre os ácidos fenólicos, o ácido cafeico é considerado um dos mais importantes, pois faz parte do ácido-5-cafeoilquínico, um dos isômeros mais representativos do café (ABRAHÃO et al, 2010; FARAH, DONANGELO, 2006; GORNAS et al, 2016).

Estudos *in vitro* utilizando plasma humano verificaram que outras substâncias fenólicas presentes no café, além dos ácidos clorogênicos e cafeico, também contribuem para a atividade antioxidante da bebida, como os ácidos *m*-cumárico e dihidrofelúrico. Constatou-se que o efeito protetor contra danos oxidativos de alguns metabólitos da cafeína como o 1,3,7- ácido trimetilferúlico e, especialmente o 1- ácido metilferúlico, foi sete vezes mais elevado do que o ácido cafeico, demonstrando, dessa forma, sua capacidade em sequestrar os radicais livres e, de maneira eficaz, reduzir o nível celular de ERO, além de aumentar a resistência das lipoproteínas a lipoperoxidação e inibir danos oxidativos ao DNA (GÓMEZ-RUIZ, LEAKE, AMES, 2007; SOMOSA et al, 2003).

A atividade antioxidante do café também é atribuída à presença de cafeína, trigonelina, produtos da reação de *Maillard* e compostos voláteis como furanos e pirróis presentes na bebida. O efeito da cafeína foi testado por pesquisadores em microsomas de fígado de ratos e apresentou efetiva inibição sobre a peroxidação lipídica. Sua ação antioxidante foi semelhante a da glutatona e significativamente maior do que do ácido ascórbico (DEL CASTILLO, AMES, GORDON, 2002; GÓMEZ-RUIZ, LEAKE, AMES, 2007; TRUGO, MOREIRA, DE MARIA, 1999).

Estudos apontam também para outros compostos fenólicos eficazes no combate ao estresse oxidativo presentes nas folhas do café, como a mangiferina (CAMPA et al, 2012 ; TREVISAN et al, 2016) . Esse metabólito foi caracterizado em pesquisas realizadas com extratos das folhas de manga, sendo purificado, isolado e testado frente a diversos ensaios antioxidantes, como o sequestro do radical DPPH• e o poder de redução do ferro. Os resultados demonstraram que a mangiferina apresentou atividade antioxidante superior em comparação com outras substâncias fenólicas, em todos os sistemas antioxidantes testados, atribuindo-se, portanto, a atividade antioxidante desses extratos, principalmente ao alto teor de mangiferina, um dos compostos fenólicos majoritários nas folhas dessa planta (BARRETO et al, 2008; RIBEIRO et al, 2007).

### 2.7.3 Métodos utilizados na determinação da atividade antioxidante

Há diversos métodos para a determinação da atividade antioxidante, sendo o mecanismo de reação, as espécies-alvo, as condições reacionais e a forma de expressão dos resultados variáveis, de modo que a atividade antioxidante de um produto natural pode não ser concluída com base em um único modelo de teste. Neste caso, a associação de mais de um método é recomendada (ALAN et al, 2013; CAROCHO, FERREIRA, 2013; LOPÉS-ALACON, DENICOLA, 2013).

O ensaio do sequestro do radical DPPH• é um dos mais utilizados em amostras de plantas, pela praticidade e menor custo. Seu mecanismo de ação baseia-se na capacidade de uma substância reduzir o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH.), de coloração púrpura, para 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, por meio da transferência de um átomo de hidrogênio. Essa reação é mensurada espectrofotometricamente, pelo decréscimo da absorvância no comprimento de onda de 517 nm (KRISHNAIAH et al, 2011; LOPÉS-ALACON, DENICOLA, 2013; MENSOR et al, 2001).

Outros ensaios utilizados na pesquisa da atividade antioxidante são o poder de redução do ferro e a co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. O primeiro mede a capacidade de uma amostra doar elétron ao ferro, reduzindo-o de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ . A reação é visualizada pela mudança de coloração de amarela para azul, sendo os valores de absorvância, medidos no comprimento de onda de 700 nm, diretamente proporcionais ao poder de redução da amostra (CAROCHO, FERREIRA, 2013; KRISHNAIAH et al, 2011; OYAZU, 1986).

O ensaio de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico avalia a capacidade de uma substância inibir ou prevenir a oxidação do  $\beta$ -caroteno pelo sequestro dos radicais livres produzidos na oxidação do ácido linoleico. Na presença de ERO e  $O_2$ , o ácido linoleico forma radicais peroxila, que reagem com o  $\beta$ -caroteno, oxidando-o e diminuindo a sua quantidade no meio. A reação é visualizada por meio da perda da coloração alaranjada do sistema, sendo mensurada pela diminuição da absorvância, no comprimento de onda próximo de 470 nm, com leituras intercaladas de 15 minutos, até o tempo total de aproximadamente 2 horas (ALVES et al, 2010; KOLEVA et al, 2002).



## 2.8 ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA ANTI-INFLAMATÓRIA

### 2.8.1 Mecanismos de defesa anti-inflamatória

A inflamação corresponde à resposta protetora imediata que ocorre nos tecidos quando há lesão ou destruição celular. Trata-se de um evento fisiológico do organismo com o intuito de combater lesões teciduais causadas por traumas mecânicos, radiação, calor, frio e outros agentes nocivos, como substâncias químicas ou ainda por agentes biológicos (fungos, bactérias, vírus ou protozoários). A resposta inflamatória objetiva eliminar a causa inicial da lesão celular, assim como as células e tecidos necróticos, e iniciar o processo de reparo (BILATE, 2007; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; SHERWOOD, TOLIVER- KINSKY, 2004).

Durante a inflamação, mediadores químicos são produzidos pelo organismo em resposta a um agente nocivo. Este é percebido inicialmente por células residentes, especialmente os macrófagos, estando envolvidos também células dendríticas, mastócitos e outros tipos celulares. Essas células secretam citocinas e outras moléculas para regular a resposta inflamatória (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; O'NEILL, 2006; REUTER et al, 2010).

Os principais mediadores envolvidos são o óxido nítrico (NO); moléculas de adesão (moléculas de adesão intercelular (ICAM)-1, moléculas de adesão vascular (VCAM)-1 e Selectina-E); lipídeos derivados dos eicosanoides (prostaglandinas (PG) E<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>); leucotrienos (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>); citocinas (fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ ), interleucinas (IL) 1 $\beta$ , IL-6 e IL-10); quimiocinas, entre outros, que coordenam os eventos de alterações vasculares inflamatórias e o recrutamento de células (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; O'NEILL, 2006).

O processo inflamatório pode ser agudo ou crônico, podendo apresentar efeitos sistêmicos positivo ou negativo dependendo da resposta do organismo. De maneira geral, a inflamação aguda é altamente benéfica, pois trata-se uma defesa primária contra infecções e um grande estímulo no processo de cura. Inicia-se rapidamente e apresenta curta duração, variando de minutos a poucos dias. Tem como sintomas característicos a exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas e acúmulo de leucócitos, com predomínio de neutrófilos (FLOWER, PERRETTI, 2005; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009).

A inflamação crônica tem caráter insidioso, é de duração mais longa, variando de dias a anos. Evidencia-se um influxo de linfócitos e macrófagos, com proliferação vascular e fibrose, podendo ocorrer efeitos deletérios, pois no processo crônico há uma reação inflamatória contínua, isto é, ocorre por um tempo prolongado, sendo capaz de lesar tecidos normais. Geralmente, a inflamação crônica manifesta-se após a inflamação aguda. Diferentes patologias, como Alzheimer, câncer e distúrbios cardíacos estão associadas a processos inflamatórios (FLOWER, PERRETTI, 2005; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009).

O mecanismo inflamatório também pode ser explicado por meio de três fases distintas que descrevem a cascata de eventos. A primeira delas corresponde à fase aguda, caracterizada por vasodilatação localizada e aumento da permeabilidade vascular. Posteriormente, na fase subaguda, predomina-se a infiltração leucocitária e células fagocitárias. Por fim, na fase crônica, destaca-se a proliferação celular, com a ocorrência de degeneração tissular e de reparação fibrótica. Nesse processo, vários mediadores estão envolvidos, como complementos, cininas, fibrinolíticos e coagulantes estimulados juntamente com a ativação de fagócitos e das células endoteliais (KUNDU, SURH, 2008; REUTER et al, 2010).

A histamina e a serotonina são os primeiros a serem liberados durante a inflamação, sendo considerados mediadores pré-formados. Ficam armazenados em grânulos e são responsáveis pela vasoconstrição inicial, além de atuar em conjunto com outros mediadores, causando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. As prostaglandinas são sintetizadas a partir de um precursor primário, o ácido araquidônico, que é liberado de fosfolípidos das membranas celulares pela ação da fosfolipase A2, em um processo controlado por hormônios e outros estímulos. As prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina são obtidas por meio da ação catalítica das enzimas ciclo-oxigenases (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Quando a inflamação é desencadeada, vários mediadores atuam sequencialmente: as quimiocinas realizam quimiotaxia de leucócitos; as enzimas plasmáticas, como bradicinina e fibrinopeptídeos, aumentam a permeabilidade vascular; a plasminina degrada coágulos em produtos quimiotáticos e ativa proteínas do sistema complemento e seus derivados, como anafilatoxinas que induzem degranulação de mastócitos e a consequente liberação de histamina; as opsoninas

induzem a opsonização de micro-organismos, facilitando a fagocitose; os mediadores lipídicos como tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos participam do processo de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular; e as citocinas induzem efeitos locais, tais como indução da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas (BILATE, 2007; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; O'NEILL, 2006).

Outro mediador envolvido no processo inflamatório são as espécies reativas do oxigênio (ERO), um tipo de radical livre derivado do oxigênio produzido pelos leucócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos. Atuam na destruição de micro-organismos e outras substâncias durante a inflamação e defesa do hospedeiro. São produzidas nos fagossomas e fagolisossomas dos leucócitos por um processo similar à respiração mitocondrial, conhecido como surto respiratório (ou surto oxidativo), onde uma enzima da membrana do fagossoma catalisa a geração de superóxido, que é convertido em  $H_2O_2$  e, posteriormente, a um composto hipoclorito altamente reativo pela enzima mieloperoxidase (MPO), presente nos leucócitos (CAROCHO, FERREIRA, 2013; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

O óxido nítrico (NO) é outro radical livre reativo produzido pelos leucócitos e outras células. Ele pode reagir com o  $O_2\bullet$  e formar um composto altamente reativo, o peroxinitrito, que também participa da lesão celular. Quando a produção de ERO aumenta, ou os sistemas de remoção são ineficientes, observa-se a formação excessiva desses radicais livres que leva a uma condição chamada de estresse oxidativo, aumentada nos processos inflamatórios (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; REUTER et al, 2010; ROVER JÚNIOR et al, 2001).

## **2.8.2 Substâncias relacionadas com a atividade anti-inflamatória**

Anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais (AINES) são largamente utilizados para controlar os processos inflamatórios. No entanto, apresentam diversos efeitos deletérios ao organismo, sendo os AINES os principais responsáveis por danos no fígado e no trato gastrointestinal. Os anti-inflamatórios esteroidais são capazes de suprimir de forma potente as vias imune e inflamatória. Porém, o uso prolongado desses agentes pode causar importantes efeitos adversos, além de estar associado ao aparecimento de diversas doenças, como diabetes, hipertensão arterial, osteoporose, cataratas, suscetibilidade a infecções, entre outras (BILATE,

2007; FLOWER, PERRETTI, 2005; O'NEILL, 2006; WALJEE et al, 2016).

Nesse sentido, verifica-se a necessidade de novas substâncias com menores efeitos colaterais e custo, o que tem aumentado o número de estudos de produtos naturais com propriedades anti-inflamatórias, pela grande biodiversidade da flora nacional, por ser uma fonte importante de substâncias biologicamente ativas, pelo uso crescente dos fitoterápicos e sua importância nos cuidados primários à saúde (DEEPA, RENUKA, 2014; GURIB-FAKIM, 2006; OMS, 2002).

No reino vegetal, a atividade anti-inflamatória pode estar relacionada com diversas classes de substâncias, como os terpenos, lignanas, taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas e cumarinas. No caso dos grãos de café, os principais compostos envolvidos no controle, tanto dos processos inflamatórios, como também exercendo ação antioxidante, são os ácidos clorogênicos, cafeína, cafestol, kahweol e trigonelina. Essas substâncias interferem na cascata inflamatória na medida em que diminuem a formação de mediadores da inflamação, principalmente pela inibição de enzimas como a fosfolipase A2, lipo-oxigenases e ciclo-oxigenases, reduzindo a formação de prostanoídes e leucotrienos (COSTA et al, 2012; DEEPA, RENUKA, 2014; FROST-MEYER; LOGOMARCINO, 2012; GOMES et al, 2008).

A ação anti-inflamatória de um dos diterpenos do café, o kahweol, foi demonstrada em um estudo *in vivo*, pela inibição da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e da proteína quimiotática para monócitos 1 (MCP-1). Adicionalmente, verificou-se a ação angiogênica deste composto, bem como a potencial aplicação em terapias antitumorais do café não filtrado. Em outro estudo, comprovou-se a ação anti-inflamatória do extrato aquoso de café, o qual foi atribuído aos flavonoides e outras substâncias antioxidantes, especialmente os compostos fenólicos (CÁRDENAS, QUESADA, MEDINA, 2011; MOREIRA et al, 2013).

Pesquisas utilizando modelos animais demonstraram as atividades antiedematogênica e antinociceptiva dos ácidos clorogênicos, as quais foram atribuídas à inibição da síntese e da liberação periférica de mediadores como oTNF- $\alpha$  e NO. Ensaio *in vitro* determinaram a atividade de compostos fenólicos, obtidos do extrato metanólico de grãos de café verde sobre a lipo-oxigenase (LOX), uma enzima envolvida na cascata inflamatória, cuja inibição impede a formação de leucotrienos. Esta via tem sido bastante investigada por ser alvo de fármacos anti-inflamatórios (DOS SANTOS et al, 2006; GAWLIK-DZIKI et al, 2014).

### 2.8.3 Métodos utilizados na determinação da atividade anti- inflamatória

A atividade anti-inflamatória dos produtos naturais pode ser avaliada por vários métodos, como por exemplo, utilizando o modelo de edema de orelha em camundongos, o qual se fundamenta na aplicação de agentes flogísticos e posterior pesagem dos fragmentos de orelha, comparando com o controle negativo. Dentre estes modelos, citam-se os seguintes métodos: edema de orelha induzidos por óleo de cróton, ácido araquidônico, fenol, capsaicina e histamina. Posteriormente, os fragmentos de orelha podem ser submetidos à análise histopatológica para avaliação dos parâmetros de inflamação, como infiltração de leucócitos e vasodilatação (CRUMMEY et al, 1987; GÁBOR, RÁZGA, 1992; LIM, PARK, KIM; 2004; SCHIANTARELLI et al, 1982; YOUNG et al, 1984).

O modelo mais utilizado para estudar o processo inflamatório cutâneo é a indução de edema na orelha de camundongos, pois consiste em um método rápido, simples e que requer pouca quantidade de substâncias, além de permitir resultados reprodutíveis. No que diz respeito à sua aplicação farmacológica, esse modelo induzido por diferentes agentes flogísticos possibilita uma variedade de modelos de inflamação cutânea apropriados para a avaliação de agentes sintéticos, extratos de plantas, bem como substâncias isoladas de plantas (CALIXTO et al, 2004; GÁBOR, 2003).

O óleo de cróton é um potente agente flogístico oriundo da espécie *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae) utilizado na pesquisa da atividade de agentes anti-inflamatórios de uso tópico. É composto por uma mistura de lipídeos, onde o 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) representa um dos principais ésteres de forbol presente no óleo. Quando aplicado topicamente nos camundongos, o TPA promove indução de estresse oxidativo ou produção de espécies reativas de oxigênio, inflamação cutânea, podendo inclusive causar hiperplasia epidermal (BILATE, 2007; CALIXTO et al, 2004; RAHMAN et al, 2008).

A fisiopatogenia do edema induzido pelo TPA, um dos componentes responsáveis pela ação irritante do óleo de cróton, parece ser exercida, entre outros mediadores, pelos produtos da ciclo-oxigenase, histamina e serotonina. A aplicação tópica desse agente está associada à resposta inflamatória, similar a algumas doenças de pele, como a psoríase, além de envolver o estresse oxidativo, a

proliferação e ativação de oncogenes nucleares. Após sua aplicação desencadeia-se uma resposta inflamatória aguda, caracterizada pela vasodilatação, infiltração de leucócitos polimorfonucleares e edema (CALIXTO et al, 2004; RAHMAN et al, 2008; SARAIVA et al, 2011).

O modelo de aplicação tópica utilizando o fenol provoca uma inflamação cutânea semelhante à dermatite de contato. Dessa forma, esse agente flogístico está envolvido na produção de queratinócitos, que liberam mediadores químicos importantes na irritação primária de contato, incluindo citocinas associadas a substâncias pró-inflamatórias, como a IL-1  $\alpha$ , TNF-  $\alpha$  e IL-8 (BILATE, 2007; GÁBOR, 2003; LIM et al, 2004).

A irritação cutânea provocada pelo fenol pode ser explicada pela ruptura da membrana plasmática dos queratinócitos por efeito direto, resultando na liberação da IL-1 $\alpha$  pré-formada, além de outros mediadores inflamatórios como os metabólitos do ácido araquidônico (AA) e de espécies reativas de oxigênio (ERO). Pode haver também a estimulação direta de outros tipos celulares residentes na pele, como células dendríticas, endoteliais e fibroblastos (LIM et al, 2004, SHERWOOD, TOLIVER- KINSKY, 2004).

No modelo utilizando o fenol, as citocinas pró-inflamatórias são estimuladas por um mecanismo diferente daquele observado no modelo de inflamação cutânea induzido pelo óleo de cróton. Neste, a indução das citocinas é feita com a ligação a receptores específicos, por meio de vias dependentes da proteína quinase C (PKC), nas quais envolvem fatores de transcrição nuclear. Entretanto, apesar da distinção do fator desencadeador do processo inflamatório, os metabólitos envolvidos nas duas vias são os mesmos, ou seja, há liberação de AA e ERO (CALIXTO et al, 2004; LIM et al, 2004; SARAIVA et al, 2011).

O modelo utilizando a histamina objetiva avaliar a reação de hipersensibilidade imediata ou do tipo I, comum na urticária. Trata-se de uma amina vasoativa liberada por mastócitos ativados pelas proteínas do complemento C3a e C5a e por leucócitos ativados por anticorpos do tipo IgE (Imunoglobulina E). Está relacionada com a vasodilatação e aumento da permeabilidade celular em resposta a um processo inflamatório. O incremento da permeabilidade vascular permite a entrada de leucócitos e proteínas plasmáticas nos locais da infecção ou da lesão do

tecido. Neste processo, ocorre extravasamento de líquido, resultando na formação do edema (BRAND et al, 2002; SHERWOOD, TOLIVER- KINSKY, 2004).

Além disso, a histamina é capaz de estimular fibras nervosas sensitivas por mecanismos dependentes dos receptores H1 que resulta em prurido, ativando nociceptores que por sua vez liberam neuropeptídeos como a substância P (SP) e peptídeos relacionados ao gene da calcitonina (PRGC). Por meio da via de reflexos axonais, as substâncias liberadas induzem ao aparecimento de edema no local da aplicação. Quando a SP é injetada por via intradérmica em altas concentrações, ocorre a degranulação dos mastócitos causando a sensação desagradável de prurido. Para suprimir esse efeito, utilizam-se antagonistas de receptores H1 e corticosteroides (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; SHERWOOD, TOLIVER- KINSKY, 2004).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar o potencial químico e farmacológico das folhas do café com intuito de elucidar os possíveis benefícios de sua utilização para a saúde e desenvolvimento de novos produtos.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar o teor de fenólicos e flavonoides totais do extrato metanólico e frações obtidas das folhas de *Coffea arabica* L.;
- Determinar o teor de ácido 5-cafeoilquínico e mangiferina do extrato metanólico e frações das folhas de *C. arabica* L. por meio de cromatografia líquida de alta eficiência;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato metanólico e frações obtidas das folhas de *Coffea arabica* L.;
- Investigar a atividade anti-inflamatória tópica do extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* L., usando modelos de edema de orelha induzidos pelo óleo de cróton, fenol e histamina.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

As folhas de *Coffea arabica* L. foram coletadas no Horto da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), município de Juiz de Fora-MG, em janeiro de 2016 (Figura 6). Sua exsicata está depositada no Herbário Leopoldo Krieger do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF, sob o número 66873.

Após a coleta, as folhas foram submetidas à secagem em estufa a 30°C (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Posteriormente, o material vegetal foi triturado em moinho e o pó obtido foi peneirado em tamise nº 18 e pesado, totalizando 411,13g.

Figura 6 - Cafeeiro (*Coffea arabica* L.)



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

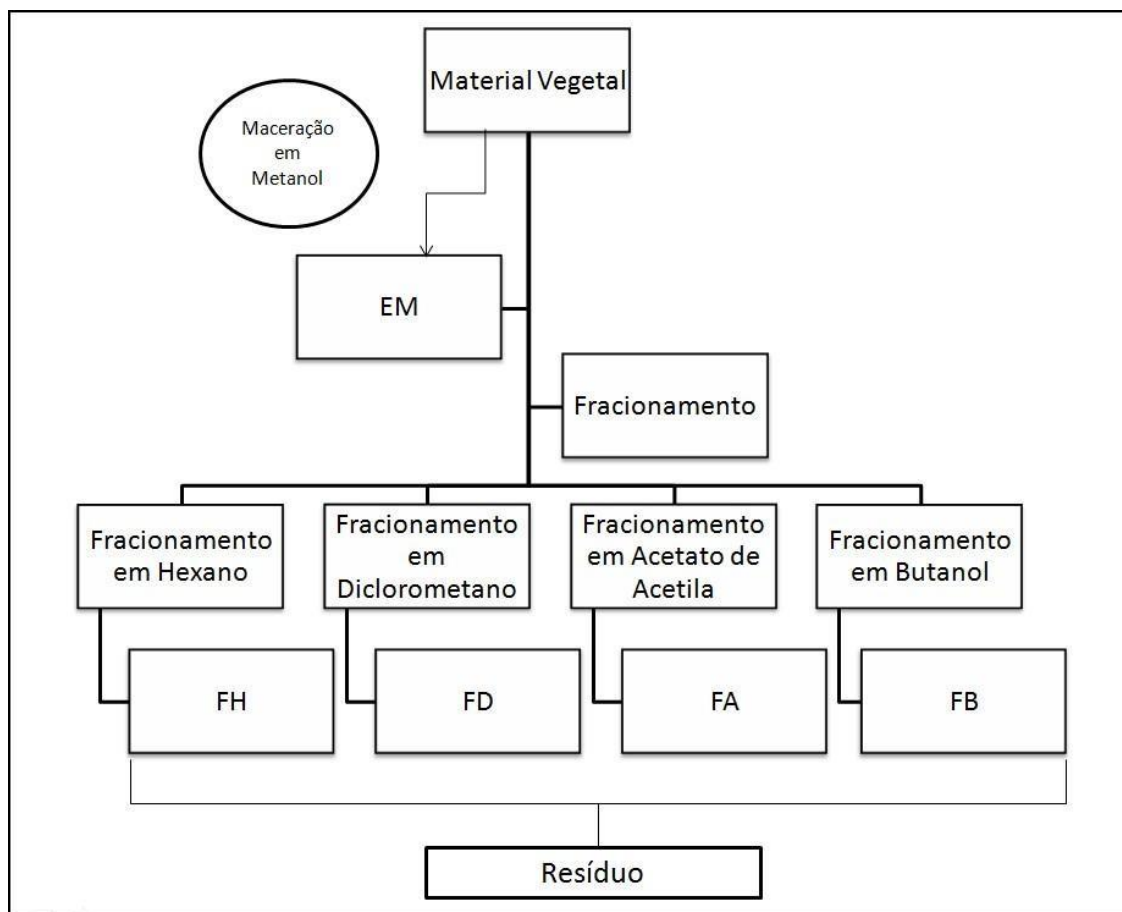
## 4.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO

O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à extração por maceração estática em metanol grau analítico, com renovação do solvente (remaceração), a temperatura ambiente, até seu esgotamento, observado pela limpidez do solvente no recipiente. A cada dois dias, o extrato obtido foi filtrado em papel de filtro comum e, posteriormente, concentrado à pressão reduzida e temperatura não superior a 50°C utilizando-se evaporador rotatório (Rotavapor<sup>®</sup> RII BUCHI, Flawil, Suíça). O solvente remanescente do extrato concentrado foi evaporado em banho-maria a 40° ± 5°C e/ou em dessecador com sílica até observação de uma massa constante do extrato metanólico (EM) (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Ao final desse processo, a quantidade de EM pesada foi de 110,65g.

## 4.3 PROCESSO DE FRACIONAMENTO

Para o processo de fracionamento por partição líquido-líquido em funil de separação, pesou-se 30g do EM, solubilizando-o em água: etanol (9:1) e, em seguida, utilizou-se solventes grau analítico em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol), com o intuito de semipurificar as substâncias presentes de acordo com suas polaridades (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Cada fração proveniente das partições foi filtrada, teve o solvente recuperado em evaporador rotatório (à pressão reduzida e temperatura não superior a 50°C) e permaneceu em banho-maria (40 ± 5°C) e/ou dessecador até a obtenção de uma massa constante das frações hexânica (FH), diclorometânica (FD), em acetato de etila (FA) e butanólica (FB), conforme ilustrado a seguir (Figura 7):

Figura 7 – Fluxograma do processo de extração e fracionamento das folhas de *Coffea arabica* L.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

A determinação do teor de fenólicos totais do extrato metanólico (EM) e frações (FH, FD, FA e FB) das folhas de *C. arabica* foi realizada por espectrofotometria na região do visível utilizando o método de *Folin-Ciocalteu* (SOUSA et al, 2007; SINGLETON, ORTHOFER, LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Preparou-se solução-estoque (SE) de ácido gálico (AG) na concentração de 1mg/mL em água deionizada. A partir desta solução, foram feitas seis diluições em água deionizada nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL. Transferiu-se para tubos de ensaio, em triplicata, 1mL de cada diluição e 5mL de reagente de *Folin-Ciocalteu* a 10% (v/v). A mistura foi homogeneizada e, após 8 minutos, foram adicionados 4 mL de carbonato de sódio a 7,5% (m/v). Preparou-se o branco nas

mesmas condições das amostras, contendo 1 mL de água deionizada e os mesmos volumes das soluções do Reagente de *Folin- Ciocalteu* e do carbonato de sódio. Após 2 horas a temperatura ambiente, foi realizada a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 763 nm, utilizando o branco para zerar o equipamento.

A partir das leituras obtidas para o padrão de AG, elaborou-se a curva de calibração com as médias das absorvâncias de cada concentração por meio da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a equação da reta e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

Com relação às amostras, prepararam-se soluções-estoque (SE) do extrato e frações das folhas da seguinte forma: EM e FB na concentração de 500 µg/mL, 1000 µg/mL para a FH e FD e 100 µg/mL para a FA. Em todas as soluções utilizou-se solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 4% (v/v), água deionizada como solvente e banho ultrassônico com aquecimento por 30 minutos para solubilização. As SE foram filtradas em papel de filtro para retirada de material insolúvel. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram transferidas, em triplicata, para tubos de ensaio, aos quais foram adicionados os mesmos reagentes descritos para o padrão do AG. Adicionalmente, preparou-se um branco para cada amostra, contendo os mesmos reagentes, com exceção da solução do reagente de *Folin- Ciocalteu*. Após duas horas a temperatura ambiente, realizou-se a leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 763 nm, utilizando o branco para zerar o equipamento. O teor de fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra a curva padrão do ácido gálico, sendo expresso em gramas equivalentes de AG por 100 gramas de amostra (g EAG/100g).

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

O teor de flavonoides totais do extrato metanólico (EM) e frações (FH, FD, FA e FB) das folhas de *C. arabica* foi determinado por meio de método espectrofotométrico (SOBRINHO et al, 2008). Utilizou-se como substância padrão a rutina, da qual se preparou uma solução estoque (SE) na concentração de 0,5 mg/mL em etanol, transferindo-se alíquotas de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 µL desta SE para tubos de ensaio, em triplicata. Em seguida, adicionou-se 400 µL de etanol

P.A., 120 µL de ácido acético P.A., 2 mL de piridina a 20% (v/v) e 500 µL de cloreto de alumínio hexahidratado a 8% (m/v). Os volumes dos tubos foram ajustados para 5mL com água destilada. Após 30 minutos procedeu-se a leitura espectrofotométrica em 420nm. Os dados foram submetidos à análise de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, sendo calculada a equação da reta e o  $R^2$ .

As amostras (EM e frações) foram preparadas na concentração de 500µg/mL e submetidas à semi-purificação, transferindo uma alíquota de 5 mL da solução de cada amostra para tubos de ensaio. Em seguida, adicionou-se 2 mL de clorofórmio P.A. e 3 mL de água destilada. Centrifugou-se a 3000 rpm por 2 minutos. Ao final deste processo, a fase orgânica foi desprezada e uma alíquota de 400µL de cada amostra, em triplicata, foi transferida para tubos de ensaio, adicionando os mesmos reagentes utilizados para o preparo da rotina e, posteriormente, após 30 minutos, realizou-se a leitura em 420 nm. Os resultados foram expressos em gramas equivalentes de rutina por 100 gramas de amostra (g ER/100g).

#### 4.6 IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE ÁCIDO CLOROGÊNICO E MANGIFERINA

A quantificação dos teores de ácido clorogênico e mangiferina foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se o cromatógrafo modelo Waters®. O equipamento é constituído por uma bomba binária (Waters® 1525), detector de foto diodo (Waters® 2998) e injetor automático (Waters® 2707). A análise cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa de sílica C18 modelo Promosil (Agela Technologies®) de 150 mm x 4,6 mm com partículas de 5 µm.

Os reagentes utilizados foram metanol grau HPLC (J.T. Baker, EUA), água deionizada ultrapurificada em sistema Milli-Q (Millipore®) e ácido acético grau HPLC (J.T. Baker, EUA). Todos os solventes foram filtrados em membrana de 0,45 µm com o auxílio de um sistema acoplado a bomba de vácuo e degaseificados durante 15 minutos em banho de ultrassom a 45 °C. Antes das injeções todas as amostras e padrões foram centrifugados por 5 minutos a 10000 rpm e filtrados em filtros de 0,45 µm acoplados a seringas. Os padrões de ácido clorogênico (pureza ≥95%) e mangiferina (pureza ≥98%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

A fase móvel foi preparada com água ultrapurificada e ácido acético na proporção 98:2 (Solvente A), e metanol, água e ácido acético na proporção 90:5:5 (Solvente B). A coluna foi equilibrada por 2 minutos com a fase móvel, composta 82% do solvente A e 18% do solvente B. Após a injeção (50 µL) do extrato, frações e padrões, a eluição dos compostos ocorreu com um gradiente de concentração dos solventes de forma que a concentração do solvente B aumentou de 18% para 25% em 2 minutos e de 25% para 36% em 13 minutos, retornando a 18 % de B e permanecendo nessa condição por 10 minutos. O fluxo de eluição foi de 0,6 mL/minuto e a coluna foi mantida a 40 °C em forno de aquecimento.

O extrato (EM) e as frações (FA e FB) foram diluídos em água/metanol (95:5 v/v) e o ácido clorogênico e a mangiferina em 100% de metanol. A curva de calibração dos padrões foi elaborada a partir do preparo das soluções nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL para o padrão de ácido clorogênico, e nas concentrações de 30, 90, 180, 240 e 300 µg/mL para o padrão de mangiferina. As amostras foram analisadas em triplicatas na concentração de 5 mg/mL.

A leitura dos padrões de mangiferina e ácido clorogênico, representado neste estudo pelo ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ), do extrato metanólico e frações foi realizada no comprimento de onda 330 nm. Após a análise cromatográfica, os dados coletados processados utilizando o software Empower®3.

## 4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 4.7.1 Método do Sequestro do Radical DPPH•

A atividade antioxidante do extrato metanólico (EM) e frações (FH, FD, FA e FB) das folhas de *C. arabica* foi avaliada por meio do método espectrofotométrico utilizando o radical livre DPPH•, denominado 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (MENSOR et al, 2001). Prepararam-se soluções estoque do extrato metanólico e das frações a 5 mg/mL em etanol P.A., e do padrão de rutina na concentração de 0,5 mg/mL. A partir das soluções estoques, foram realizadas diluições em etanol, obtendo-se diferentes concentrações.

Para a realização do teste, transferiu-se para tubos de ensaio, alíquotas de 2,5 mL das respectivas amostras, em triplicata, adicionando em seguida 1 mL da solução de DPPH a 0,03 mM. Após 30 minutos de reação protegida da luz, verificou-se a capacidade das amostras em reduzir o 2,2-difenil-1-picril hidrazila em 2,2-difenil-1-picril hidrazina observado pela mudança da cor púrpura para amarela. Essa mudança de cor foi detectada pela diminuição da absorbância no comprimento de onda de 518 nm. Preparou-se também o branco das amostras e da rotina, adicionando-se 2,5 mL das respectivas soluções e 1,0 mL de etanol. Para o controle negativo, transferiu-se 2,5 mL de etanol e 1,0 mL da solução de DPPH para tubos de ensaio.

A partir das leituras espectrofotométricas, determinou-se porcentagem de atividade antioxidante (%AA) que corresponde à quantidade de DPPH reduzida pelas amostras, utilizando a seguinte fórmula:

$$\%AA = 100 - \left[ \frac{(Abs\ amostra - Abs\ branco\ da\ amostra)}{(Abs\ controle - Abs\ branco\ do\ controle)} \right] \times 100$$

*Abs amostra*: absorbância da amostra; *Abs branco da amostra*: absorbância do branco das amostras;  
*Abs controle*: absorbância do controle negativo; *Abs branco do controle*: absorbância do branco do controle negativo.

Os valores da %AA foram utilizados na construção dos gráficos, sendo esta representada pela ordenada, e a abscissa correspondeu à concentração da amostra (em µg/mL). Calcularam-se as equações da reta e o R<sup>2</sup> através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Posteriormente, determinou-se a concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>), expressa em µg/mL, substituindo o y da equação por 50.

#### 4.7.2 Método do Poder de Redução

O poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) foi determinado por meio de método espectrofotométrico (OYAZU, 1986). Prepararam-se soluções estoque do extrato metanólico (EM) e frações (FH, FD, FA e FB) das folhas de *C. arabica* e do padrão de rutina (controle positivo), utilizando solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 4% (v/v) nas amostras, água destilada como solvente e banho ultrassônico por 30 minutos para solubilização, e posterior filtragem para remoção do material insolúvel. A partir das soluções estoque, foram feitas diluições em triplicata, transferindo-se

diferentes volumes para tubos de ensaio, completando o volume para 1 mL de água, obtendo-se diferentes concentrações. Em seguida, adicionou-se 3,0 mL de tampão fosfato de potássio 200  $\mu$ M, pH 6,6 e 3,0 mL de solução de ferricianeto de potássio a 1% (m/v) aos tubos de ensaio, que foram incubados a 50 °C por 20 minutos. Após a incubação, adicionou-se 3,0 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% (m/v) aos tubos, homogeneizou-os. Retirou-se uma alíquota de 2,5 mL de cada amostra e do padrão, transferindo para tubos de ensaio, nos quais foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico a 0,1% (m/v). O branco das amostras foi preparado nas mesmas condições das amostras e do padrão, com os mesmos reagentes, exceto as soluções das amostras, as quais foram substituídas por água destilada.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 700 nm. Foram construídos gráficos para cada uma das triplicatas das amostras e do padrão, onde a abscissa correspondeu à concentração final no tubo de reação (em  $\mu$ g/mL), e a ordenada à absorbância corrigida pelo branco, e calculadas as equações e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) através de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Os valores da concentração efetiva 50% ( $CE_{50}$ ) foram calculados em  $\mu$ g/mL, substituindo-se o y da equação por 0,5.

#### **4.7.3 Método da co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico**

Para a realização da atividade antioxidante pelo teste da co-oxidação do  $\beta$ -caroteno, preparou-se uma solução de  $\beta$ -caroteno (1,0mg) em clorofórmio (5,0 mL). Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 1,0mL dessa solução, 25  $\mu$ L de ácido linoleico e 200 mg de Tween 40. O clorofórmio foi evaporado a vácuo em rotavaevaporador, a temperatura de 40°C. Em seguida, acrescentou-se ao balão, lentamente e sob agitação constante, 50 mL de água destilada oxigenada por borbulhamento de ar por 15 minutos. A emulsão obtida ( $\beta$ -caroteno/ácido linoleico) foi preparada imediatamente antes do experimento (KOLEVA et al, 2002).

Preparam-se soluções estoque a partir do extrato metanólico (EM) e frações das folhas de *C. arabica* (FH, FD, FA e FB), na concentração de 250  $\mu$ g/mL. Os controles positivos hidroxitolueno butilado (BHT), rutina e quercetina foram preparadas na concentração de 25  $\mu$ g/mL. Todas as amostras foram solubilizadas



com etanol e colocadas em banho ultrassônico aquecido a 40-45°C por 30 minutos.

A cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços, foram adicionados 250 µL da emulsão β-caroteno/ácido linoleico e 30 µL da diluição das amostras ou dos controles positivos, em triplicata. O branco constituiu-se em 280 µL de etanol e o controle negativo em 250 µL da emulsão acrescidos de 30 µL de etanol.

Foram realizadas leituras das absorvâncias em leitor de microplacas no comprimento de onda 492 nm imediatamente ( $t_0$ ) e em intervalos de 15 minutos até 105 minutos ( $t_{105}$ ), obtendo-se ao final oito leituras ( $t_0$ ,  $t_{15}$ ,  $t_{30}$ ,  $t_{45}$ ,  $t_{60}$ ,  $t_{75}$ ,  $t_{90}$  e  $t_{105}$ ). Durante os intervalos, a placa foi incubada em banho-maria a 50°C.

A partir das leituras obtidas, determinou-se a porcentagem de inibição da oxidação do β-caroteno, ou porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (%I) pela seguinte equação:

$$\%I = \left[ \frac{(A \text{ controle } t_0 - A \text{ controle } t_{105}) - (A \text{ amostra } t_0 - A \text{ amostra } t_{105})}{(A \text{ controle } t_0 - A \text{ controle } t_{105})} \right] \times 100$$

*A controle* corresponde à absorvância do controle negativo e *A amostra* ao extrato (EM), frações (FH, FD, FA e FB) e referências (BHT, rutina e quercetina) nos tempos 0 ( $t_0$ ) e 105 ( $t_{105}$ ).

## 4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

### 4.8.1 Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados camundongos Swiss albinos machos (*Mus musculus*, com idade entre 45-55 dias e peso de 25-30 g) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Os testes foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFJF. Os animais foram mantidos a temperatura ambiente (25±4 °C), em gaiolas de plástico com dimensões de 47 x 34 x 18 cm, não ultrapassando oito animais por gaiola. Receberam ração (Nuvilab Roedores - Nuvital Nutrients, Colombo, Brasil) e água *ad libitum*. É importante salientar que foi respeitada uma fase clara/escuro de 12 horas. Além disso, antes do início dos experimentos os animais foram mantidos no laboratório por um período de pelo menos 1 hora para adaptação. O cuidado e a experimentação animal seguiram as diretrizes para cuidados e uso de animais de laboratório em pesquisa biomédica do

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais/UFJF sob o número 027/2016.

#### **4.8.2 Métodos utilizados na avaliação da atividade anti-inflamatória**

A atividade anti-inflamatória tópica do extrato metanólico (EM) das folhas de *Coffea arabica* L. foi avaliada pelo modelo de edema de orelha em camundongos. Os agentes flogísticos, o extrato e os compostos foram dissolvidos em um volume de 20 µL de acetona e aplicados na face interna da orelha direita de cada camundongo. Na orelha esquerda de cada animal foi aplicado 20 µL de acetona (veículo). Cada ensaio foi constituído por cinco grupos, todos com oito indivíduos (n = 8): controle negativo (solução salina a 0,9%), controle positivo (dexametasona e/ou dexclorfeniramina) , usada na dose de 0,1 mg/orelha, e o EM em três diferentes concentrações de 0,1 mg/orelha, 0,5 mg/orelha e 1,0 mg/orelha. Para minimizar variações referentes às técnicas, os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador.

O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos, calculada pela diferença da medida realizada após a indução do edema por aplicação do agente flogístico e a medida basal, realizada antes da sua aplicação. A espessura da orelha foi medida utilizando um micrômetro digital (DIGIMESS<sup>®</sup>, IP40). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha e a sua espessura foi registrada em micrômetro (µm).

A pesagem dos fragmentos realizou-se após a morte dos animais. Estes foram eutanizados com uma dosagem de cetamina (240 mg/kg) e xilazina (45 mg/kg). Posteriormente, discos de 6 mm de diâmetro das orelhas direita e esquerda foram removidos com o auxílio de um punch metálico (Richter). Os fragmentos obtidos foram pesados em balança analítica (AY220, Shimadzu) e calculou-se o edema por meio da diferença de peso (mg) entre as orelhas direita e esquerda (não inflamada), sendo os resultados expressos como média ± E.P.M. das diferenças dentro de cada grupo (CALIXTO et al, 2004; GÁBOR, 2003).

#### *4.8.2.1 Método do edema da orelha induzido pelo óleo de cróton*

O edema foi induzido na orelha direita de camundongos pela aplicação tópica de 20 µL de óleo de croton 2,5% (v/v, diluído em acetona) (SCHIANTARELLI et al, 1982). O EM, a solução salina (controle negativo) e a dexametasona (controle positivo) foram aplicados topicamente, simultaneamente com o óleo de cróton. O aumento da espessura da orelha foi medido após 6 e 24 horas da indução da inflamação. Posteriormente, os animais foram eutanasiados e realizou-se a pesagem dos fragmentos. O edema foi avaliado conforme o item 4.8.2. Separou-se um fragmento de cada grupo para a determinação dos marcadores inflamatórios (mieloperoxidase, N-acetil-β-D-glucosaminidase). Do mesmo modo, um fragmento de cada grupo foi reservado para a análise histopatológica, sendo conservados em formaldeído 10% (v/v).

#### *4.8.2.2 Método do edema de orelha induzido pelo fenol*

Investigou-se a atividade anti-inflamatória do EM utilizando o modelo de inflamação cutânea causado pelo fenol (um agente irritante) que foi administrado após a aplicação de uma solução de 10% (v/v) de fenol em acetona (20 µL/orelha) na orelha direita de camundongos (LIM et al, 2004). Após 15 minutos de sua aplicação, realizou-se o tratamento tópico com o EM, salina e dexametasona na orelha direita, e acetona na orelha esquerda. O edema da orelha foi avaliado 2 horas após a aplicação do fenol conforme o item 4.8.2.

#### *4.8.2.3 Método do edema de orelha induzido pela histamina*

O efeito do EM sobre a reação de hipersensibilidade de tipo imediata foi avaliado utilizando o modelo de edema de orelha induzido pela histamina (BRAND et al, 2002). Diferentemente dos agentes flogísticos anteriores, que foram administrados topicamente, a histamina foi aplicada por via intradérmica, utilizando um volume de 5 µL (100 mg/mL em solução salina), na região ventral das orelhas direitas. Ressalta-se que os animais foram previamente anestesiados intraperitonealmente com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg). O EM, salina,

polaramine<sup>®</sup> e dexametasona foram aplicadas topicamente na região dorsal da orelha direita, e na orelha esquerda aplicou-se acetona. Noventa minutos após o desafio com o agente flogístico, os animais foram sacrificados e o edema avaliado quanto ao aumento da espessura da orelha dos camundongos e da massa (mg) dos fragmentos, de acordo com o item 4.8.2.

#### 4.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os fragmentos das orelhas dos camundongos (discos de 6 mm) obtidos do modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton foram conservados em formol 10%. Para o preparo das lâminas histopatológicas, as amostras foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) em um período de 16 horas e conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. Em seguida, o material foi desidratado, emblocado em parafina, seccionado em cortes de 5 µm em micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. A infiltração de leucócitos, o edema e espessura da epiderme foram avaliados em áreas representativas com aumento de 100x e/ou 200x. Nesses mesmos aumentos, foram realizadas fotografias dos cortes histológicos utilizando microscópio acoplado a câmera fotográfica digital, modelo OLYMPUS<sup>®</sup>, BX-41.

#### 5.0 DETERMINAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi determinada com o intuito de estabelecer a presença de leucócitos polimorfonucleares nos tecidos (BRADLEY et al, 1982; YOUNG et al, 1984). Fragmentos de tecidos retirados no modelo de edema de orelha induzida pelo óleo de cróton foram adicionados a 750 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e triturados por cerca de 45s a 0 °C. O homogenato obtido foi decantado em microtubos e adicionado a 750 µL do tampão fosfato de sódio. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtubos e centrifugada a 12000 x g a 4°C por 15 minutos, utilizando o sobrenadante para a análise.

Adicionou-se 25  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, em triplicata, em microplaca de 96 poços. Em seguida, foram inseridos em cada poço 25  $\mu\text{L}$  de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), cuja concentração final foi de 1,6 mM em DMSO. Posteriormente, acrescentou-se 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio na concentração de 0,003% v/v em tampão fosfato de sódio pH 5,4. A microplaca foi incubada a 37°C por 5 minutos. Posteriormente, interrompeu-se a reação, adicionando em cada poço 100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a 4 M a 4°C. As medidas das absorbâncias foram realizadas em leitor de microplaca (THERMOPLATE<sup>®</sup>, TP-READER) no comprimento de onda de 450 nm, sendo os resultados expressos DO/mg de tecido.

### 5.1 DETERMINAÇÃO DA N-ACETIL- $\beta$ -D-GLICOSAMINIDASE

Avaliou-se a atividade da enzima n-acetil- $\beta$ -d-glicosaminidase (NAG) para determinar a presença de leucócitos mononucleares no tecido (SANCHEZ, MORENO, 1999). Os fragmentos de tecidos retirados no modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton foram adicionados a 750  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e triturados por cerca de 45s a 0 °C. O homogenato obtido foi decantado em microtubos e adicionado a 750  $\mu\text{L}$  do tampão fosfato de sódio. Amostras de 1,5 mL foram colocadas em microtubos e centrifugadas a 12000 x g a 4°C por 15 minutos, obtendo-se o sobrenadante.

A determinação da NAG foi realizada em triplicata em microplaca de 96 poços. Em cada poço foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e 100  $\mu\text{L}$  de p-nitrofenil-acetamida- $\mu$ -D-glicopiranosídeo (2,24 mM) dissolvido em tampão de citrato 0,1 M (pH 4,5). A microplaca foi incubada durante 10 minutos a 37° C. Em seguida, a reação foi interrompida adicionando-se 100  $\mu\text{L}$  de tampão de glicina 0,2 M (pH 10,6). As medidas das absorbâncias foram feitas em leitor de microplaca (THERMOPLATE<sup>®</sup>, TP-READER) no comprimento de onda de 405 nm, sendo os resultados expressos em DO/mg de tecido.

## 6.0 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos nos ensaios da atividade antioxidante e dosagem de fenólicos e flavonoides foram demonstrados através da média  $\pm$  desvio padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para medir o grau de significância para  $p < 0,05$ .

Os resultados da atividade anti-inflamatória investigada por diversos modelos foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de múltipla comparação de Newman Keuls. Foram considerados valores de  $p$  menores do que 0,001 ( $p < 0,001$ ) como indicativos de significância, devido ao maior rigor deste experimento.

Utilizou-se o programa estatístico Graphpad Prism versão 5.01 para avaliar os dados.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

Ao final do processo de secagem das folhas de *Coffea arabica* L., obteve-se 411,13 g de material vegetal. Após a extração por maceração estática em metanol e secagem em rotaevaporador e banho-maria, foram obtidos 110,65g de extrato metanólico (EM), equivalente a um rendimento de extração de 26,91%.

O processo de fracionamento de 30g do EM, que foi ressuspendido em uma solução hidroalcolica (9:1) e, posteriormente, submetido à partição com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol), gerou uma massa e rendimento descritos na tabela 1:

Tabela 1 - Rendimento das frações obtidas por partição do extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* L.

Frações	Massa (g)	Rendimento (%)
FH	4,07	13,56
FD	1,17	3,90
FA	2,71	9,03
FB	2,46	8,20

FH: fração hexânica; FD: fração diclorometânica; FA: fração em acetato de etila; FB: fração butanólica.  
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

De acordo com a tabela 1, observa-se que o maior rendimento foi atribuído à fração hexânica (FH), possivelmente pelo fato da maior retenção de matéria graxa presente no extrato (CECHINEL FILHO, YUNES, 1998; NAIDU, et al, 2008). Apesar do rendimento superior da FH, as atividades biológicas demonstradas no presente estudo foram associadas principalmente à fração em acetato de etila (FA).

## 7.2 TEORES DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS

Os teores de fenólicos e flavonoides do extrato metanólico (EM) e frações (FH, FD, FA e FB) das folhas de *Coffea arabica* L. foram determinados a partir das curvas de calibração do ácido gálico e rutina, respectivamente. Após análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtiveram-se as equações da reta dos padrões, sendo  $y = 0,0117x - 0,0011$ , com coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9978$  para o ácido gálico, e  $y = 0,024x + 0,0016$  com  $R^2 = 0,9974$  para a rutina.

A partir da equação da reta dos padrões, os teores de fenólicos e flavonoides totais das folhas de *C. arabica* foram calculados e estão descritos nas tabelas 2 e 3. Os valores de fenólicos variaram de 1,65 a 20,60 g EAG/100g; e os flavonoides de 0,26 a 14,96 g ER/100g. Todas as amostras foram significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ). A fração diclorometânica (FD) apresentou o menor teor de fenólicos e a fração hexânica (FH) o menor teor de flavonoides. Já a fração em acetato de etila (FA) exibiu a maior concentração de compostos fenólicos e flavonoides, sendo superior ao EM e às demais frações.

Tabela 2 – Teor de fenólicos totais em gramas equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de amostra (g EAG/100g)

Extrato ou Fração	Teor de Fenólicos Totais (g EAG/100g)
FA	20,60 ± 0,39 <sup>a</sup>
FB	13,20 ± 0,19 <sup>b</sup>
EM	12,95 ± 0,06 <sup>c</sup>
FH	2,33 ± 0,05 <sup>d</sup>
FD	1,65 ± 0,01 <sup>e</sup>

FA: fração em acetato de etila; FB: fração butanólica; EM: extrato metanólico; FH: fração hexânica; FD: fração diclorometânica. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si, após ANOVA seguida de teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR



Tabela 3 - Teor de flavonoides totais em gramas equivalentes de rutina por 100 gramas de amostra (g ER/100g)

Extrato ou Fração	Teor de Flavonoides totais (g ER/100g)
FA	14,96 ± 0,05 <sup>a</sup>
FD	1,00 ± 0,69 <sup>b</sup>
FB	0,94 ± 0,01 <sup>c</sup>
EM	0,34 ± 0,10 <sup>d</sup>
FH	0,26 ± 0,17 <sup>e</sup>

FA: fração em acetato de etila; FD: fração diclorometânica; FB: fração butanólica; EM: extrato metanólico; FH: fração hexânica. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si, após ANOVA seguida de teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os resultados corroboram com outras pesquisas e evidenciam a eficiência do processo de extração com metanol, bem como a utilização de outros solventes polares para a obtenção das substâncias fenólicas (DOMINGUES JÚNIOR et al, 2012; RAMALAKSHM, KUBRA, RAO, 2008).

Além disso, constatou-se que o extrato e as frações das folhas possuem teores elevados dessas substâncias.

Verifica-se que além do processo de extração, o solvente utilizado interfere de forma significativa no teor de fenólicos. A extração por meio da maceração estática com metanol e, posteriormente, o fracionamento com solventes em ordem crescente de polaridade, foi capaz de extrair um conteúdo significativo dessas substâncias. Os solventes mais polares, especificamente o acetato de etila e butanol, foram os mais eficientes na extração. Quando se compara com pesquisas que utilizaram o método de percolação com álcool a 70%, o teor de substâncias fenólicas obtida das folhas de café foi de 6,8g EAG/100g, valores estes inferiores aos encontrados neste estudo (NAIDU et al, 2008; RAMALAKSHM, KUBRA, RAO, 2008; SIMÕES, 2014).

A extração com metanol visa obter o maior número de substâncias, com base na sua capacidade de aumentar a permeabilidade celular, favorecendo a extração e separação das substâncias de alta, média e baixa polaridade, sendo considerado um solvente bastante eficaz para este processo (CECHINEL FILHO, YUNES, 1998; NAIDU, et al, 2008; RAMALAKSHM, KUBRA, RAO, 2008).

Posteriormente, quando o extrato é submetido ao processo de fracionamento por partição líquido-líquido, utilizando solventes em ordem crescente polaridade (hexano, diclorometano acetato de etila e butanol), objetiva-se a separação dos constituintes por classes químicas. Na fração hexânica espera-se encontrar substâncias como esteroides e terpenos; na fração diclorometânica flavonoides metoxilados, lactonas, triterpenos; na fração em acetato de etila é comum a presença de flavonoides, xantonas e substâncias fenólicas em geral. Na fração butanólica espera-se obter os flavonoides glicosilados, taninos e saponinas (CECHINEL FILHO, YUNES, 1998; RUSAK et al, 2008).

Devido ao caráter mais polar do acetato de etila em relação aos solventes utilizados anteriormente (hexano e diclorometano), espera-se obter a maior quantidade de substâncias fenólicas e flavônicas neste solvente. Logo, a FA apresentou os maiores teores de fenólicos e flavonoides, em relação ao extrato metanólico e às demais frações, uma vez que esses metabólitos possuem caráter mais polar (CECHINEL FILHO, YUNES, 1998; NAIDU, et al, 2008).

A investigação de substâncias fenólicas nas folhas de café é mais direcionada para a avaliação de mecanismos de defesa do vegetal a fatores externos, resistência à infecção por patógenos e infestação por pragas, bem como ao estudo dos estádios fenológicos do cafeeiro, da síntese de fenólicos e outras substâncias importantes para o crescimento da planta, e da variação desses compostos de acordo com as fases fenológicas e com o clima. São escassas pesquisas para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos que utilizam as folhas do café (CAMPA et al, 2012 ; DOMINGUES JÚNIOR et al, 2012; MONDOLOT et al, 2006 ; RAMIRO, GUERREIRO-FILHO, MAZZAFERA, 2006; SALGADO et al, 2008).

Atualmente, os estudos de bioprospecção dos grãos verdes de café para aplicação na área farmacêutica procuram investigar a sua composição química e as substâncias com propriedades farmacológicas presentes. Além disso, para o desenvolvimento de um produto farmacêutico, o estudo dos processos de extração e purificação dos princípios ativos é de suma importância. Verifica-se que o óleo de café verde é largamente utilizado na indústria de cosméticos e farmacêuticos devido às propriedades emolientes, emulsificantes,

modificadoras de viscosidade, agentes de propagação, além de sua ação antioxidante. O extrato de café verde é comumente direcionado à produção de cápsulas (AZEVEDO et al, 2008; FERRARI et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2014; XU et al, 2015).

Em uma pesquisa que avaliou o conteúdo de substâncias fenólicas em relação à produção de café, fenologia e clima, os valores encontrados variaram de 13,9 g equivalentes de ácido tânico/100g nas folhas maduras a 17,4g equivalentes de ácido tânico /100g nas jovens. Essa variação pode estar associada à idade fenológica do cafeeiro, como também ao método de extração utilizado, onde as folhas foram moídas e colocadas em nitrogênio líquido. Apesar da substância fenólica utilizada como referência do estudo citado ser diferente do presente estudo, ao se comparar os teores de fenólicos, observa-se que FA apresentou resultados satisfatórios, indicando que as folhas possuem teores elevados de substâncias fenólicas (SALGADO et al, 2008).

Nos grãos de café da espécie *C. arabica* os valores de fenólicos encontrados variaram entre 4,77 a 5,43 g EAG/100g nos grãos verdes e 4,51 a 4,53g EAG/100g nos grãos torrados (ABRAHÃO et al, 2010). Em outros estudos constatou-se um menor teor nos grãos verdes, variando de 3,6 a 4,1 g EAG/100g (ALI et al, 2012). Resultados superiores em ambos os grãos foram obtidos quando se substituiu a água pelo etanol no processo extração. Neste caso, o teor de compostos fenólicos foi de 6,84g EAG/100g para os grãos verdes e 6,99g EAG/100g para os grãos torrados (MOREIRA, 2013).

É importante considerar que a maioria dos ensaios de determinação de compostos ativos dos grãos verdes e, principalmente, os torrados emprega o extrato aquoso, devido ao elevado consumo da bebida. Entretanto, quando se utiliza outros solventes para extração, verifica-se a obtenção de uma maior quantidade de compostos fenólicos. No caso da aplicação dos grãos verdes na área farmacêutica e cosmética, solventes como, por exemplo, o etanol, é utilizado para obtenção dos constituintes de interesse com um maior rendimento. Do mesmo modo, o acetato de etila possibilitou no presente estudo uma extração mais eficiente das substâncias fenólicas (MOREIRA, 2013; NAIDU et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2014; RAMALAKSHM, KUBRA, RAO, 2008).

Os valores de fenólicos encontrados neste trabalho foram superiores aos demonstrados em diversas pesquisas realizadas com os resíduos de café, como a casca, a polpa e a borra. No processo de extração desses resíduos com acetona: água (80:20 v/v), utilizando Shaker obteve-se um conteúdo de fenólicos de 15,9g EAG/100g, 7,28g EAG/100g e 7,72 g EAG/100g, para a casca, polpa e borra, respectivamente (PALOMINO GARCÍA, DEL BIANCHI, 2015). Em um estudo que empregou o ultrasson no processo de extração película prateada do café, denominada silverskin, o teor de compostos fenólicos foi de 1,61g EAG/100g. Neste caso, o solvente de extração utilizado foi água acidificada com ácido fórmico a 1% (BRESCIANI et al, 2014).

Nos grãos de café extraídos em solução aquosa foram encontrados valores de flavonoides de 0,43 g equivalentes de quercetina / 100g (g EQ/100g) nos grãos verdes e 0,48 g EQ/100g nos torrados. Quando se substituiu a água pelo etanol no processo de extração o teor de flavonóides obtido foi de 0,38 g EQ/100g nos grãos verdes e 0,57 g EQ/100g nos grãos torrados (MOREIRA, 2013). Apesar de o presente estudo ter utilizado como referência a rutina como padrão, o teor de flavonóides obtido no EM foi similar aos teores obtidos nos grãos. Entretanto, a FA apresentou resultados superiores, demonstrando a influência do solvente no processo de extração (NAIDU, et al, 2008; RAMALAKSHM, KUBRA, RAO, 2008).

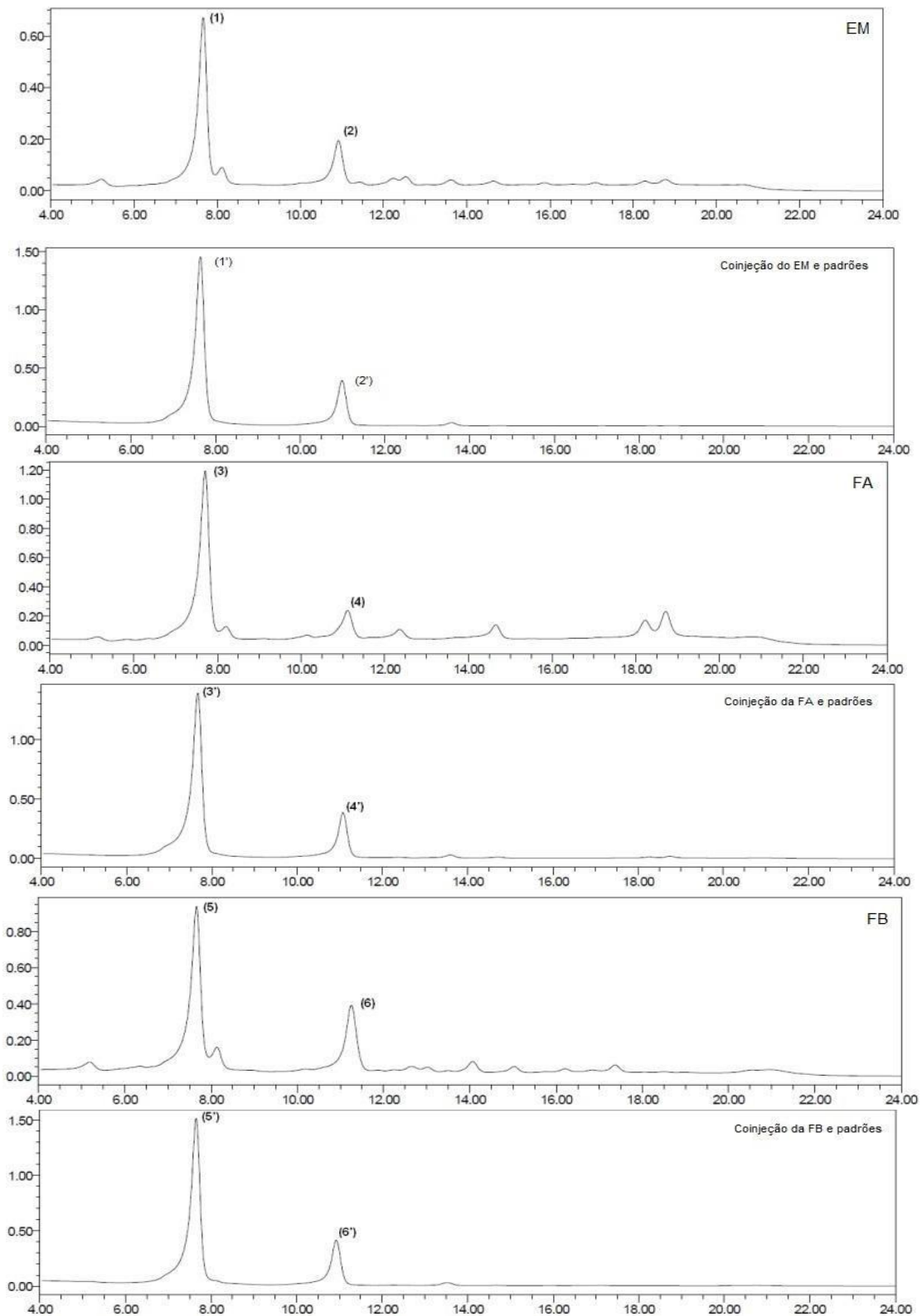
O teor de flavonoides totais, do mesmo modo que os fenólicos totais foram superiores na FA. O estudo de flavonoides nas folhas de café ainda é escasso, sendo as pesquisas mais direcionadas para a investigação dos derivados dos ácidos fenólicos, os quais constituem os principais compostos fenólicos do café. São representados pelos ácidos clorogênicos, cafeico, cumárico e ferúlico, presentes em quantidades significativas nos grãos de café verde e torrados, assim como na própria bebida. Além disso, estudos correlacionam a composição de fenólicos, principalmente os ácidos clorogênicos, com a atividade antioxidante exibida pelo café (ABRAHÃO et al., 2010; GORNAS et al, 2016; JESZKA-SKOWRON, STANISZ, PEÑA, 2016; KUCERA et al, 2016; MOREIRA et al, 2013; RAMIRO, GUERREIRO-FILHO, MAZZAFERA, 2006).

### 7.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO ÁCIDO 5-CAFEOILQUÍNICO E MANGIFERINA

A identificação do ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) e mangiferina no extrato metanólico (EM) e nas frações em acetato de etila (FA) e butanólica (FB) das folhas de *Coffea arabica* L. foi realizada por meio das análises cromatográficas, sendo confirmada pelo tempo de retenção das substâncias, pelos espectros e pela coinjeção dos padrões de 5-ACQ e mangiferina.

A figura 8 demonstra os cromatogramas do EM e frações e da coinjeção das amostras com os padrões (5-ACQ e mangiferina) no comprimento de onda de 330 nm. Os espectros de ultravioleta (UV) das duas substâncias identificadas neste estudo, o 5-ACQ e a mangiferina, estão representados na figura 9.

Figura 8 - Cromatogramas do extrato metanólico e frações e da coinjeção das amostras com os padrões de 5-ACQ e mangiferina

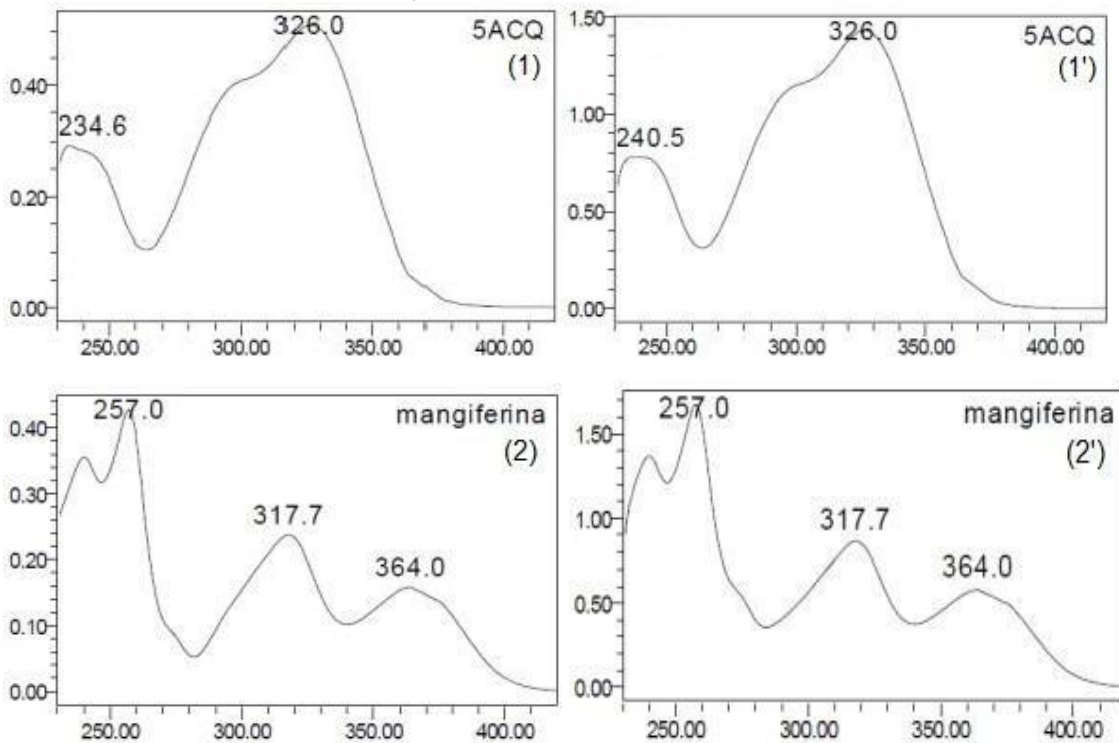


(1), (3) e (5): picos do 5-ACQ identificados no EM, FA e FB, respectivamente; (2), (4) e (6): picos da mangiferina identificados EM, FA e FB, respectivamente; (1'), (3') e (5'): coinjeção do padrão de 5-ACQ com o EM, FA e FB, respectivamente; (2'), (4') e (6'): coinjeção do padrão de mangiferina com o EM, FA e FB, respectivamente.

EM: extrato metanólico; FA: fração em acetato de etila; FB: fração butanólica.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 9 – Espectros ultravioleta dos picos 1 e 2 do cromatograma do extrato metanólico e da coinjeção com os padrões de 5-ACQ e mangiferina



Espectro do 5-ACQ identificado no EM; (1'): espectro da coinjeção do EM com o padrão de 5-ACQ; (2) espectro da mangiferina identificada no EM e (2'): espectro da coinjeção do EM com o padrão de mangiferina. EM: extrato metanólico.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

De acordo com a figura 8, observa-se que houve um aumento da área dos picos após a coinjeção com os padrões de 5-ACQ e mangiferina. Do mesmo modo, o sinal dos espectros na coinjeção do EM com os padrões aumentou significativamente em 330nm (Figura 9). Assim como demonstrado no espectro de UV do EM, nas frações (FA e FB) também houve o aumento de sinal dos espectros quando se realizou a coinjeção com os padrões.

Com relação ao tempo de retenção (TR) dos padrões, constatou-se que o mesmo coincidiu com o tempo de retenção das amostras. O padrão de 5-ACQ apresentou TR de 7,668 minutos. Similarmente, no EM o 5-ACQ foi identificado no TR de 7,662, a FA de 7,707 e a FB de 7,662. Na coinjeção do EM, FA e FB com o TR do 5-ACQ foi de 7,642, 7,667 e 7,651 minutos, respectivamente.

Para o padrão de mangiferina, observou-se um TR foi de 11,139 minutos. Nas amostras, também de forma semelhante, os TR foram de 10,914, 11,113 e 11,253 para o EM, FA e FB, respectivamente. A coinjeção da

mangiferina com o EM, FA e FB exibiu um TR de 10,985, 11,074 e 10,926 minutos, respectivamente.

Depois de identificados nas amostras, os teores de 5-ACQ e mangiferina do extrato metanólico (EM) e frações (FA e FB) das folhas de *C. arabica* foram quantificados a partir das curvas de calibração dos respectivos padrões. Após análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, obtiveram-se as equações da reta, sendo  $y = 92400x - 1790000$ , com coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9952$  para o 5-ACQ; e  $y = 37300x + 193000$  com  $R^2 = 0,9995$  para a mangiferina.

Os teores de 5-ACQ e mangiferina do EM, FA e FB estão descritos na tabela 4. Os valores de 5-ACQ variaram de 2,29 a 5,50 g/100g de extrato; e a mangiferina de 1,46 a 4,00 g/100g. Todas as amostras foram significamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ). A FB apresentou o maior teor de 5-ACQ, seguida da FA. Em relação à mangiferina, a FB foi a fração majoritária, apresentando o maior teor de mangiferina em relação às demais amostras.

Tabela 4 – Teor de 5- ACQ e mangiferina do extrato metanólico e frações das folhas de *Coffea arabica* L.

Extrato ou Fração	5-ACQ (g/100g de extrato)	Mangiferina (g/100g de extrato)
EM	2,29 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,46 ± 0,00 <sup>a</sup>
FA	4,83 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,90 ± 0,03 <sup>b</sup>
FB	5,50 ± 0,03 <sup>c</sup>	4,00 ± 0,00 <sup>c</sup>

EM: extrato metanólico; FA: fração em acetato de etila; FB: fração butanólica. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si, após ANOVA seguida de teste de Tukey para  $p < 0,05$ .  
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O teor de 5-ACQ no EM, de 2,29g/100g de extrato foi inferior ao encontrado em outros estudos, que foi equivalente a 3,23g/100g nas folhas (CAMPA et al, 2012). Neste caso, a extração foi realizada com metanol e água 80:20, por meio de sonicação por 20 minutos, diferente do presente estudo, que utilizou maceração estática com metanol. No entanto, os valores da FA e FB foram superiores ao teores encontrados em pesquisas anteriores. A diferença entre o EM e as frações pode ser justificada pela eficiência dos solventes mais polares em extrair os compostos fenólicos (CECHINEL FILHO, YUNES, 1998; NAIDU et al, 2008; RAMALAKSHM, KUBRA, RAO, 2008).



Nos grãos verdes, pesquisas determinaram os teores de 5-ACQ variando entre 3,59 e 3,91 g/100g (MONTEIRO, FARAH, 2012). Em outro estudo obtiveram-se valores de 2,9 a 3,4g/100g (MEHARI et al, 2016). Essa diferença dos teores de 5-ACQ encontrados nos estudos possivelmente se deve à variação dos processos de extração e dos solventes utilizados. Entretanto, mesmo com as variações dos processos de extração, ao se comparar o teor de 5-ACQ dos grãos verdes com as folhas, verifica-se que o conteúdo dessa substância nas folhas é significativamente elevado, viabilizando sua utilização para a obtenção de substâncias bioativas (CAMPA et al, 2012).

O conteúdo de mangiferina determinado no EM e frações das folhas de *C. arabica* foi superior ao encontrado em estudos anteriores, onde se constatou uma concentração nas folhas de 0,566 g/100g. Verificou-se também que o teor presente nas folhas dessa espécie é maior em relação aos seus frutos, que apresentou no estágio 1 de maturação (desenvolvimento do perisperma) valores correspondentes a 0,23g/100g. O pericarpo no estágio 2 (desenvolvimento do endosperma) exibiu um conteúdo menor de mangiferina (0,07g/100g), assim como o pericarpo no estágio 3 (maturação do pericarpo), que apresentou um teor de 0,05g/100g. No endocarpo (pergaminho) ou nos grãos de café verde (semente) a mangiferina ainda não foi detectada, o que torna as folhas uma fonte em potencial dessa substância (CAMPA et al, 2012).

A FB apresentou quantidades mais elevadas de mangiferina quando comparado ao EM e a FA, o que pode ser justificado pela maior eficiência dos solventes mais polares na extração (KULKARNI, RATHOD, 2015). O solvente, juntamente com o processo de extração empregado pode interferir significativamente na concentração de mangiferina. Em um estudo que utilizou o processo de infusão das folhas com água fervente apresentou valores de 0,16g/100g de mangiferina (TREVISAN et al, 2016). Pesquisas que utilizaram o método da extração em água subcrítica demonstraram que a mangiferina é pouco solúvel em solventes altamente polares, como a água, sendo mais solúvel em solventes como o metanol e etanol (KIM et al, 2010). Outros estudos compararam o método convencional com a extração assistida em microondas, verificando que a mistura etanol a 45% foi mais eficiente do que a extração com etanol a 60 e 80% (ZOU et al, 2013).

Outro fator determinante para o acúmulo de mangiferina é com relação à idade das folhas. As mais jovens apresentam maior conteúdo em relação às maduras. Nas folhas jovens foram encontrados valores de 1,11g/100g, reduzindo para 0,92g/100g nas folhas maduras, indicando que os compostos fenólicos acumulam-se nas folhas jovens (CAMPA et al, 2012, SALGADO et al, 2008).

#### 7.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O potencial antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH• do extrato metanólico e frações das folhas de *Coffea arabica* L. estão demonstrados na Tabela 5. As amostras apresentaram um valor de CE<sub>50</sub> entre 7,47 ± 0,12 e 122,76 ± 1,38, correspondendo o menor valor à fração em acetato de etila (FA) e o maior, à fração diclorometânica (FD).

Não houve diferença significativa entre a FA e o padrão de rutina (p < 0,05), demonstrando que a FA é tão eficaz quanto a rutina, na inibição do radical livre DPPH•. As demais amostras foram significativamente diferentes entre si (p < 0,05). A FA foi a mais ativa entre as amostras avaliadas, pois apresentou a menor CE<sub>50</sub> (7,47 ± 0,12 µg/mL), inibindo o radical livre DPPH• com uma menor concentração.

Tabela 5 – Concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) do extrato metanólico e frações das folhas de *Coffea arabica* L. pelo método do sequestro do radical DPPH•

Amostra ou referência	CE <sub>50</sub> (µg/mL)
Rutina	7,07 ± 0,13 <sup>a</sup>
FA	7,47 ± 0,12 <sup>a</sup>
EM	19,80 ± 0,06 <sup>b</sup>
FB	35,41 ± 0,56 <sup>c</sup>
FH	50,48 ± 0,77 <sup>d</sup>
FD	122,76 ± 1,38 <sup>e</sup>

FA: fração em acetato de etila; EM: extrato metanólico; FB: fração butanólica; FH: fração hexânica; FD: fração diclorometânica. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si, após ANOVA seguida de teste de Tukey para p < 0,05.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O potencial antioxidante pelo método do poder de redução do ferro (FRAP) do extrato metanólico e frações das folhas de *C. arabica* estão

descritos na Tabela 6. As amostras foram significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ). Os resultados indicam um valor de  $CE_{50}$  entre  $4,67 \pm 0,02$  e  $71,90 \pm 0,22$ , correspondendo o menor valor à fração em acetato de etila (FA) e o maior, à fração diclorometânica (FD), respectivamente. A FA apresentou a menor  $CE_{50}$  ( $4,67 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ ), sendo mais eficaz na redução dos íons  $\text{Fe}^{3+}$ . Em contrapartida, a FD exibiu o menor potencial antioxidante, pois apresentou a maior  $CE_{50}$  ( $71,90 \pm 0,22$ ). Como esperado, a rutina, o controle positivo, demonstrou uma expressiva ação antioxidante. No entanto, é importante destacar que FA foi cerca de duas vezes mais ativa do que a rutina.

Tabela 6 – Concentração efetiva 50% ( $CE_{50}$ ) do extrato metanólico e frações das folhas de *Coffea arabica* L. pelo método do poder de redução do ferro

Amostra ou referência	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
FA	$4,67 \pm 0,02^a$
Rutina	$11,02 \pm 0,19^b$
EM	$17,77 \pm 0,03^c$
FB	$19,56 \pm 0,12^d$
FH	$42,56 \pm 1,00^e$
FD	$71,90 \pm 0,22^f$

FA: fração em acetato de etila; EM: extrato metanólico; FB: fração butanólica; FH: fração hexânica; FD: fração diclorometânica. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si, após ANOVA seguida de teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os dois ensaios antioxidantes descritos elucidaram que o extrato metanólico e as frações das folhas de *C. arabica* apresentam um grande potencial antioxidante, sendo a FA a mais promissora, com  $CE_{50}$  de  $7,47 \mu\text{g/mL}$  no ensaio do sequestro do radical  $\text{DPPH}^\bullet$  e  $4,67 \mu\text{g/mL}$  no FRAP. O EM apresentou resultados similares em ambos os métodos, sendo  $19,80 \mu\text{g/mL}$  no sequestro do radical  $\text{DPPH}^\bullet$  e  $17,77 \mu\text{g/mL}$  no FRAP. Estudos anteriores já evidenciaram as propriedades antioxidantes nas folhas de café, utilizando o teste do sequestro do radical  $\text{DPPH}^\bullet$  no extrato etanólico. Neste caso, a  $CE_{50}$  encontrada foi de  $60 \mu\text{g/mL}$  (RAMALAKSHM, KUBRA, RAO, 2008; SIMÕES, 2014).

A menor  $CE_{50}$  exibida pela FA nos ensaios do sequestro do radical  $\text{DPPH}^\bullet$  e do FRAP pode ser justificada pelo alto conteúdo de substâncias fenólicas e flavônicas retidas nesta fração, as quais sabidamente possuem

propriedades antioxidantes e quelantes. Em se tratando de um solvente com maior polaridade, verifica-se um maior rendimento e uma extração mais eficiente desses metabólitos, que conferem às folhas do café suas propriedades terapêuticas, tornando-a uma fonte natural de substâncias antioxidantes (MOREIRA et al, 2013; RAMALAKSHM, KUBRA, RAO, 2008, GÓMEZ-RUIZ, LEAKE, AMES, 2007).

A atividade antioxidante pelo método de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico do extrato metanólico e frações das folhas de *C. arabica* está descrita na Tabela 7. Os resultados indicam que o extrato metanólico (EM) apresentou o maior potencial antioxidante, sendo capaz de inibir a peroxidação lipídica em  $52,49 \% \pm 0,52$ , seguida da fração hexânica (FH), com percentual de inibição de  $49,19 \pm 1,10$  e da fração em acetato de etila (FA), com  $47,51\% \pm 0,32$ . Além disso, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o EM e o padrão de quercetina, assim como entre a FH e a quercetina, indicando que a atividade antioxidante do EM e da FH foi similar a este padrão. A FA apresentou atividade semelhante ao padrão de rutina, não havendo diferença significativa entre as frações hexânica e acetado de etila no que se refere ao potencial antioxidante.

Diferentemente dos ensaios do sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> e do FRAP, o método de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico demonstrou uma atividade antioxidante considerável das frações mais apolares, representada pela FH, que foi uma das mais eficazes na inibição da peroxidação lipídica. Isso ocorreu possivelmente devido à presença de substâncias lipofílicas presentes nessa fração, tendo em vista que o meio reacional desse ensaio é uma emulsão, predominando, portanto, compostos de baixa polaridade. Essas substâncias tendem a permanecer na interface óleo-água da emulsão, onde ocorre a peroxidação lipídica, exercendo mais facilmente sua ação antioxidante através da inibição da propagação da lipoperoxidação, neutralizando os radicais peroxila formados com o processo de oxidação (ALVES et al, 2010; KOLEVA et al, 2002).

Tabela 7 – Percentual de inibição da peroxidação lipídica do extrato metanólico e frações das folhas de *Coffea arabica* L. pelo método de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

Amostra ou referência	% Inibição da peroxidação lipídica
BHT	59,66 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>
EM	52,49 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>
Quercetina	50,81 $\pm$ 0,66 <sup>b</sup>
FH	49,19 $\pm$ 1,10 <sup>bc</sup>
FA	47,51 $\pm$ 0,32 <sup>cd</sup>
Rutina	45,83 $\pm$ 0,50 <sup>d</sup>
FD	37,62 $\pm$ 1,01 <sup>e</sup>
FB	32,87 $\pm$ 0,50 <sup>f</sup>

BHT: hidroxitolueno butilado; FA: fração em acetato de etila; EM: extrato metanólico; FB: fração butanólica; FH: fração hexânica; FD: fração diclorometânica. Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si, após ANOVA seguida de teste de Tukey para  $p < 0,05$ .  
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A atividade antioxidante do café tem sido atribuída em diversos estudos aos compostos fenólicos, dentre eles, aos ácidos clorogênicos, que apresentam inúmeras propriedades terapêuticas e farmacológicas, atuando como agentes anti-cariogênicos, antimicrobianos, anti-inflamatórios, anti-mutagênicos, anti-carcinogênicos, anti-hipertensivos, hipoglicemiantes, hepatoprotetores, neuroprotetores, entre outras (CAMPOS-ESPARZA; SÁNCHEZ-GÓMEZ; MATUTE, 2009; DICKSON et al, 2015; DOS SANTOS et al, 2006; FERRAZZANO et al, 2009; MAIA, DE MENDONÇA, 2002; MURIEL, ARAUZ, 2010; PALMER et al, 1995; SÄÄKSJÄRVI et al., 2008; SHEARER et al, 2003; STICH, ROSIN, BRYSON, 1982; ZHU et al, 1999).

Com relação aos grãos torrados ocorre uma redução dos ácidos clorogênicos. Entretanto, a atividade antioxidante da bebida do café não se restringe a esses compostos, estando também correlacionada a outras substâncias produzidas durante o processo de torração (ABRAHÃO et al, 2010).

Os ácidos clorogênicos correspondem ao grupo com maior representatividade na fração fenólica de grãos e folhas de café. Subgrupos dos ácidos clorogênicos já foram identificados, como os ácidos cafeoilquínico (ACQ; 3ACQ, 4ACQ e 5ACQ), ácidos di-cafeoilquínico (diACQ; 3,4diACQ, 3,5diACQ, e 4,5diACQ) e ácidos feruloilquínicos (AFQ; 4AFQ e 5AFQ) (ALONSO-SALCES, GUILLOU, BERRUETA, 2009; CAMPA et al,

2012; DUARTE, PEREIRA, FARAH, 2010 ; MONDOLOT et al, 2006 ; MONTEIRO, FARAH, 2012 ; PERRONE et al, 2008 ; XU et al, 2015).

Outra substância fenólica de grande interesse em produtos naturais é a mangiferina, cuja atividade antioxidante foi verificada em diversos estudos (BARRETO et al, 2008; RIBEIRO et al, 2007). Apesar da maioria dos trabalhos serem direcionados principalmente para a investigação das propriedades terapêuticas desse metabólito na manga (*Mangifera indica* L.), sua presença foi constatada nas folhas do café, indicando, portanto, que estas são fontes de uma diversidade de substâncias bioativas, além dos ácidos clorogênicos, justificando o seu uso no preparo de chás, além da aplicação biotecnológica para o desenvolvimento de novos produtos (CAMPA et al, 2012 ; TALAMOND et al, 2008 ; TREVISAN et al, 2016).

A mangiferina é considerada uma substância natural promissora devido às inúmeras propriedades farmacológicas. Além da atividade antioxidante, esse metabólito foi associado a inúmeros efeitos como anti-inflamatório, antidiabético, anti-alérgico, anti-hiperlipidêmico, anticancerígeno, cardio, hepato, gastro e neuroprotetor (ARAÚJO et al, 2014 ; BARRETO et al, 2008; CAMPOS-ESPARZA; SÁNCHEZ-GÓMEZ; MATUTE, 2009; MURUGANANDAN et al, 2005; PARDO-ANDREU et al, 2008; RODEIRO; DELGADO; GARRIDO, 2014; RIBEIRO et al, 2007, RIVERA et al, 2011).

## 7.5 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

### **7.5.1 Efeito do extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* L. sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton**

A atividade anti-inflamatória do extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* L. (EM) frente ao óleo de cróton está demonstrada na tabela 8. A aplicação desse agente flogístico promoveu um aumento da espessura da orelha após 6 horas da aplicação. Doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha reduziram efetivamente a formação do edema em 22,72, 29,92 e 35,51%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Após 24 horas do tratamento, foi possível observar uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) da espessura do edema nas doses 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, produzindo uma

inibição de 67,02, 71,79 e 79,43% respectivamente, quando comparado ao grupo controle. A dexametasona, o controle positivo, foi ativa em ambos os tempos de avaliação.

Do mesmo modo que a medida da espessura, a massa do edema após 24 horas de indução pelo óleo de cróton sofreu uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha do EM, diminuindo em 60,29, 66,04 e 74,15%, respectivamente, em comparação ao controle negativo. No caso da dexametasona, a atenuação da massa do edema foi de 77,32%.

Tabela 8 - Efeito do extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* L. sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton

Grupo	Dose	Espessura ( $\mu\text{m}$ )				Massa (mg)	
		6h	Inibição (%)	24 h	Inibição (%)	24 h	Inibição (%)
<b>Controle (salina)</b>	20 $\mu\text{L}$ /orelha	203,29 $\pm$ 3,94	-	100,00 $\pm$ 1,69	-	3,26 $\pm$ 0,23	-
	0,1 mg/orelha	157,08 $\pm$ 3,03***	22,72	33,00 $\pm$ 1,14***	67,02	1,29 $\pm$ 0,09***	60,29
<b>EM</b>	0,5 mg/orelha	142,42 $\pm$ 2,48***	29,92	28,21 $\pm$ 0,87***	71,79	1,10 $\pm$ 0,08***	66,04
	1,0 mg/orelha	135,08 $\pm$ 2,04***	33,51	20,54 $\pm$ 0,37***	79,93	0,84 $\pm$ 0,06***	74,15
<b>Dexametasona</b>	0,1 mg/orelha	119,83 $\pm$ 2,14***	41,03	18,00 $\pm$ 0,53***	81,97	0,74 $\pm$ 0,06***	77,32
<b>Basal</b>	-	8,31 $\pm$ 0,66***	-	9,01 $\pm$ 0,19***	-	0,02 $\pm$ 0,01***	-
<b>Veículo (acetona)</b>	20 $\mu\text{L}$ /orelha	12,25 $\pm$ 0,95***	-	11,31 $\pm$ 0,19***	-	0,02 $\pm$ 0,01***	-

Os valores correspondem à média  $\pm$  E. P. M. (n = 8). \*\*\*  $p < 0,001$  diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste Student-Newman-Keuls. EM= extrato metanólico.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

### 7.5.2 Efeito do extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* L. sobre o edema de orelha induzido pelo fenol

A aplicação tópica do fenol induziu a formação do edema, evidenciada pelo aumento da espessura e da massa dos fragmentos (Tabela 9). O EM administrado topicamente foi capaz de reverter esse processo, assim como a dexametasona. O extrato nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha inibiram o aumento da espessura do edema em 37,36, 40,82 e 62,51%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo. A eficácia do extrato também pode ser verificada pela redução da massa do edema em 51,40, 59,14 e 63,57%, nas respectivas doses crescentes. A dexametasona reduziu ambas as medidas do edema ( $p < 0,001$ ).

Tabela 9 - Efeito do extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* L. sobre o edema de orelha induzido pelo fenol

Grupo	Dose	Espessura (µm)	Inibição (%)	Massa (mg)	Inibição (%)
<b>Controle (salina)</b>	20 µL/orelha	173,00±1,74	-	11,88±0,13	-
<b>EM</b>	0,1 mg/orelha	108,33±1,29 <sup>***</sup>	37,96	5,77±0,10 <sup>***</sup>	51,40
	0,5 mg/orelha	102,33±0,95 <sup>***</sup>	40,82	4,85±0,07 <sup>***</sup>	59,14
	1,0 mg/orelha	64,83±0,56 <sup>***</sup>	62,51	4,33±0,09 <sup>***</sup>	63,57
<b>Dexametasona</b>	0,1 mg/orelha	67,50 ± 1,17 <sup>***</sup>	60,95	4,68±0,13 <sup>***</sup>	60,61
<b>Basal</b>	-	3,17±0,23 <sup>***</sup>	-	0,35±0,01 <sup>***</sup>	-
<b>Veículo (acetona)</b>	20 µL/orelha	8,83±0,31 <sup>***</sup>	-	0,40±0,03 <sup>***</sup>	-

Os valores correspondem à média ± E. P. M. (n = 8). <sup>\*\*\*</sup> p < 0,001 diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste Student-Newman-Keuls. EM= extrato metanólico.  
 Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

### 7.5.3 Efeito do extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* L. sobre o edema de orelha induzido pela histamina

A atividade anti-inflamatória tópica do EM após indução pela histamina é apresentada na tabela 10. A aplicação intradérmica de histamina na orelha de camundongos resultou no aumento significativo da espessura e massa da orelha como observado no grupo controle tratado com salina (p < 0,001). Nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha, o EM diminuiu a espessura em 36,48, 60,06 e 74,65% respectivamente, evidenciando um possível efeito anti-edematogênico. Nessas doses crescentes, o EM reduziu a massa do edema em 52,59, 73,00 e 88,03%. A dexametasona inibiu a espessura do edema em 61,89% e a massa em 73,38%.



Tabela 10 - Efeito do extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* L. sobre o edema de orelha induzido pela histamina

Grupo	Dose	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	Inibição (%)	Massa (mg)	Inibição (%)
<b>Controle (salina)</b>	20 $\mu\text{L}$ /orelha	20,54 $\pm$ 0,48	-	4,18 $\pm$ 0,07	-
	0,1 mg/orelha	13,04 $\pm$ 0,34***	36,48	1,98 $\pm$ 0,04***	52,59
<b>EM</b>	0,5 mg/orelha	8,21 $\pm$ 0,27***	60,06	1,13 $\pm$ 0,08***	73,00
	1,0 mg/orelha	5,21 $\pm$ 0,25***	74,65	0,50 $\pm$ 0,03***	88,03
<b>Polaramine<sup>®</sup></b>	0,1 mg/orelha	6,17 $\pm$ 0,72***	69,96	0,45 $\pm$ 0,03***	89,23
<b>Dexametasona</b>	0,1 mg/orelha	7,83 $\pm$ 0,24***	61,89	1,10 $\pm$ 0,04***	73,38
<b>Basal</b>	-	1,00 $\pm$ 0,10***	-	0,03 $\pm$ 0,00	-
<b>Veículo</b>	20 $\mu\text{L}$ /orelha	2,50 $\pm$ 0,13***	-	0,04 $\pm$ 0,00***	-

Os valores correspondem à média  $\pm$  E. P. M. (n = 8). \*\*\*  $p < 0,001$  diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste Student-Newman-Keuls. EM= extrato metanólico.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os resultados indicam que o extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* L. (EM) apresentou efeito anti-inflamatório tópico significativo quando avaliado pelo modelo do edema de orelha em camundongos após indução com óleo de cróton, fenol e histamina. Apesar não haver estudos sobre a investigação dessa atividade nas folhas, o potencial anti-inflamatório dos grãos de café verde foi confirmado em alguns modelos de inflamação, tanto *in vivo* como *in vitro* (CHANDRA et al, 2012; DOS SANTOS et al, 2006; GAWLIK-DZIKI et al, 2014; MOREIRA et al, 2013).

A capacidade de EM em suprimir o efeito do óleo de cróton comprovam seu potencial inibitório sobre o estresse oxidativo, impedindo a formação de espécies reativas de oxigênio, bem como a inflamação cutânea e a hiperplasia epidermal. Analisando o mecanismo de ação desse agente, verifica-se que possivelmente ocorre a ativação da proteína quinase C (PKC), uma vez que o óleo de croton, especificamente o TPA presente em sua composição, mimetiza o ativador natural da enzima, o diacilglicerol, ligando-se em sítios específicos de seu domínio regulatório (BILATE, 2007; CALIXTO et al, 2004; RAHMAN et al, 2008).

A ativação da PKC intensifica a atividade da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), aumentando a liberação de ácido araquidônico (AA) dos fosfolípidios de membrana, o que leva ao aumento dos leucotrienos (LT) e prostaglandinas (PG). Esses metabólitos atuam como mediadores das vias inflamatórias desencadeadas pela atividade das enzimas ciclo-oxigenase (COX) e lipo-

oxigenases (LOX). As prostaciclina e leucotrienos B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), produtos do metabolismo do AA, intensificam a permeabilidade vascular, o que explica a formação de edema durante o processo inflamatório (BRALLEY et al, 2007; GARBOR, 2000; RANG et al, 2012).

Portanto, o edema induzido pelo óleo de cróton está intimamente associado com o aumento no conteúdo de eicosanóides como as PG e LTB<sub>4</sub>. Dessa forma, verifica-se que além dos inibidores de COX e LOX, os antagonistas de LTB<sub>4</sub> também são capazes de inibir o edema induzido por TPA. Esse mecanismo indica que os eicosanóides possuem importante função na inflamação de pele induzida pelo TPA (CALIXTO et al, 2004; RAHMAN et al, 2008; SARAIVA et al, 2011).

O TPA também está relacionado à expressão de citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , as quais participam ativamente no processo inflamatório cutâneo. A IL-1 $\beta$  ativa uma via responsável pela transcrição de genes que promovem a expressão de diversos compostos importantes para o processo inflamatório, como moléculas de adesão, quimiocinas, citocinas secundárias, além das enzimas óxido nítrico sintase e ciclo-oxigenase. O TNF- $\alpha$  também induz a expressão de diversos genes envolvidos na resposta inflamatória cutânea. Além disso, estimula a via de sinalização de transdução, ligada à ativação do Fator de Transcrição Nuclear - Kappa B (NF- $\kappa$ B), produzindo um “feedback” pró-inflamatório positivo (GOMES et al, 2008; KUNDU, SURH, 2008; SHERWOOD, TOLIVER- KINSKY, 2004).

Ao inibir o edema de orelha no modelo utilizando o óleo de cróton, o EM está provavelmente interagindo especificamente com alguma das vias descritas anteriormente. Estudos indicam que os principais compostos presentes no café envolvidos no combate à inflamação são os ácidos clorogênicos. Substâncias como a cafeína e a mangiferina também estão relacionadas com esse processo. Nesse sentido, os extratos de café são um alvo em potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos anti-inflamatórios (DOS SANTOS et al, 2006; FROST-MEYER, LOGOMARCINO, 2012; HODGE et al, 2017; MOREIRA et al, 2013; VITAGLIONE et al, 2010).

O EM também foi capaz de suprimir a ação do fenol e o mecanismo de ação desse agente flogístico está relacionado à interrupção da membrana celular dos queratinócitos, o que leva a liberação de mediadores pré-formados

como IL-1 $\alpha$ , metabólitos do AA e espécies reativas de oxigênio (ERO). Além disso, o fenol é capaz de causar lesão ou estimulação direta de outros tipos celulares residentes na pele, como células dendríticas, fibroblastos e células endoteliais. Nesse sentido, substâncias capazes de inibir o fenol podem ser consideradas potentes agentes no tratamento de dermatite de contato, uma vez que este mimetiza reações cutâneas decorrentes da exposição da pele a diferentes agentes irritantes (GÁBOR, 2003; LIM et al, 2004; MO et al, 2014).

Com relação à histamina, o terceiro modelo de inflamação tópica investigado neste estudo, a eficácia apresentada pelo EM na inibição desse agente flogístico faz com que extrato das folhas de café seja considerado um importante agente no combate à hipersensibilidade do tipo I (BRAND et al, 2002; DEEPA, RENUKA, 2014; SHERWOOD, TOLIVER- KINSKY, 2004).

Considerando que a histamina desencadeia uma resposta edematogênica instantânea, aumentando a vasodilatação e a permeabilidade vascular, compostos capazes de inibi-la e de suprimir a liberação de neuropeptídeos, principalmente da substância P (SP), são agentes promissores no tratamento da urticária. Apesar de haver poucos estudos relacionados às substâncias envolvidas na supressão da histamina, pesquisas verificaram os benefícios dos compostos fenólicos sobre o trato respiratório devido às suas propriedades antialérgicas e anti-inflamatórias (BRAND et al, 2002; FRANOVA et al, 2011).

Em um ensaio *in vivo* demonstrou-se que os grãos de café exibiram atividade antinociceptiva diante da formalina evidenciando sua ação analgésica. Além disso, o tratamento de animais com extratos de café uma hora antes da aplicação de carragenina também elucidou inibição média na terceira hora após o estímulo, sugerindo a ação antiedematogênica do extrato (MOREIRA et al, 2013).

No mesmo estudo citado anteriormente, o extrato de café verde foi superior ao torrado. Tal fato foi associado ao maior teor de ácidos clorogênicos no café verde. Do mesmo modo, verifica-se que as folhas apresentam um maior conteúdo de compostos fenólicos, sendo os ácidos clorogênicos presentes em quantidades superiores nas folhas da variedade *C. arabica*, em comparação com outras espécies, o que justifica o uso dessa espécie (CAMPA et al, 2012; MOREIRA et al, 2013).

Outro composto fenólico associado ao controle dos processos inflamatórios é a mangiferina. Apesar de serem escassos os estudos sobre a atividade anti-inflamatória tópica das folhas de café, esse metabólito já foi investigado em outros vegetais, como na espécie *Mangifera indica* L., da qual obteve-se um extrato a partir da casca, sendo concentrado e evaporado em spray dried, obtendo-se um pó fino marrom que foi utilizado como ingrediente na formulação do VIMAG®. Esse extrato foi caracterizado por diferentes métodos cromatográficos e, após ser dissolvido em água destilada, foi testado em alguns modelos de inflamação. Os resultados dessa pesquisa demonstraram que houve redução significativa do edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico tratadas com esse extrato, cujo componente principal era a mangiferina (GARRIDO et al, 2006).

Diante do potencial farmacológico da espécie *Coffea arabica* L., é fundamental o desenvolvimento de estudos sobre a atividade anti-inflamatória exercida pelas folhas, considerando que elevados teores de substâncias fenólicas estão presentes nas folhas dessa espécie. A utilização do extrato de folhas de café em substituição ao extrato obtido de grãos torna-se uma alternativa promissora, tendo em vista o alto valor agregado que os grãos representam no mercado comercial (CAMPA et al, 2012; FROST-MEYER, LOGOMARCINO, 2012; RIVERA et al, 2011; TALAMOND et al, 2008).

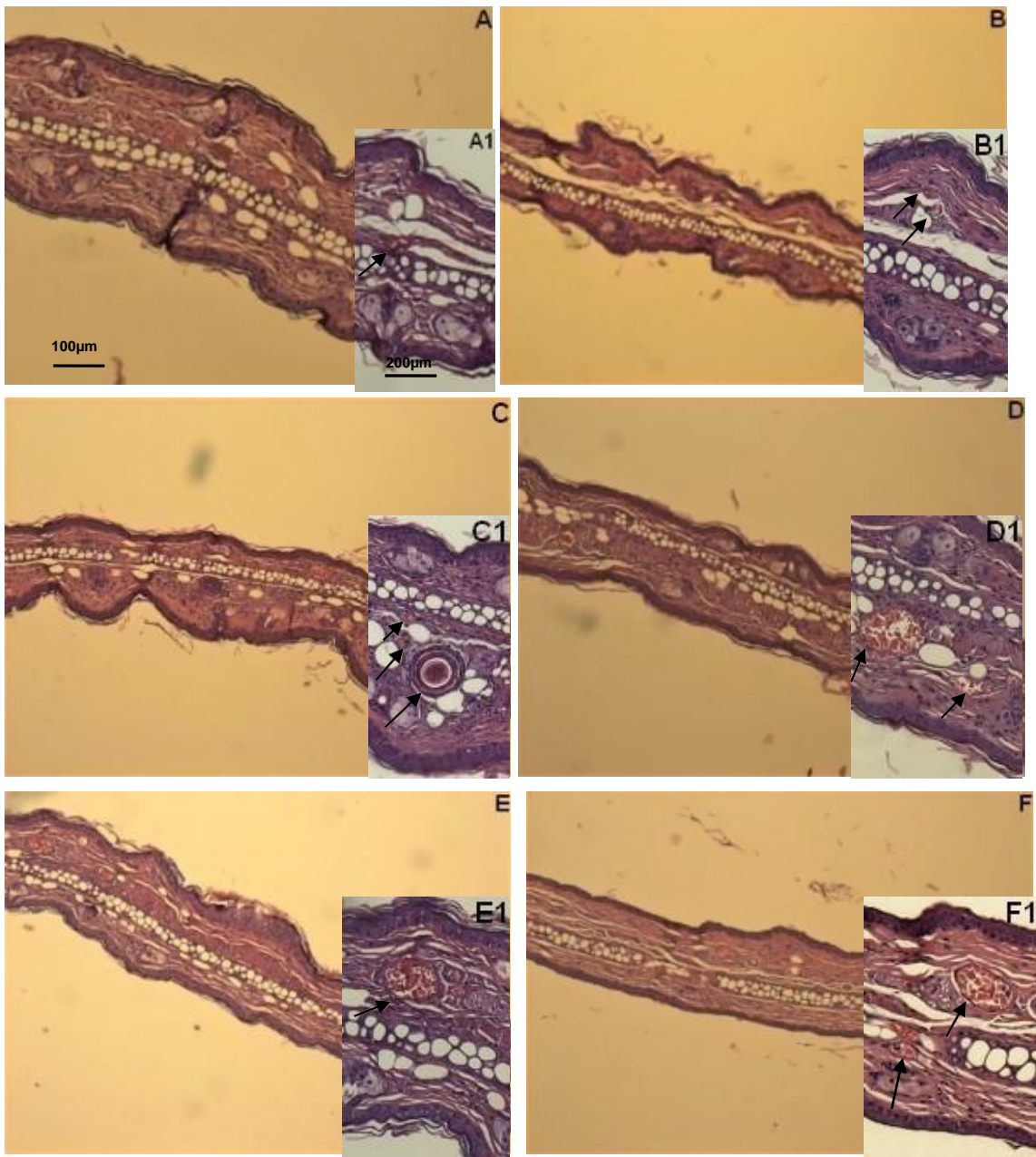
Devem-se considerar também os efeitos adversos quando se investiga novas substâncias anti-inflamatórias. Esses efeitos são comumente associados aos glicocorticóides, utilizados com frequência em doenças inflamatórias cutâneas como eczema, dermatite atópica e seborreica e psoríase, em função da ação modulatória sobre a resposta imune e pela atividade anti-inflamatória. Entretanto, a aplicação contínua desses agentes pode causar irritações locais, hipopigmentação da pele e dermatite de contato. Além disso, pode desencadear efeitos supressores, aumentando o risco de infecções. O uso sistêmico pode favorecer o surgimento de doenças como hipertensão arterial, diabetes, tromboembolismo venoso e fraturas (O'NEILL, 2006; WALJEE et al, 2016).

#### **7.5.4 Análise histopatológica**

Após a aplicação tópica do óleo de cróton, avaliaram-se os parâmetros de inflamação relativos à aplicação de EM. A análise dos cortes histopatológicos das orelhas dos camundongos demonstrou que, após 24 horas da aplicação tópica do óleo de cróton, houve intensa formação de edema, bem como uma pronunciada infiltração de leucócitos polimorfonucleares na derme (Figuras 10A e 10A1), quando comparado ao grupo que recebeu veículo (Figuras 10F e 10F1). A análise histopatológica também revelou que os parâmetros inflamatórios (edema e infiltração leucocitária) foram suprimidos com o tratamento de EM, nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha (Figuras 10C e 10C1, 10D e 10D1, 10E e 10E1), bem como pelo controle positivo (dexametasona) na dose de 0,05 mg/orelha (Figuras 10B e 10B1).

A aplicação do óleo de cróton é capaz de alterar diversos processos incluindo crescimento, diferenciação e morte celular, além da resposta inflamatória. Todos esses efeitos parecem ser provenientes da ativação direta da PKC, conforme elucidado anteriormente (CALIXTO et al, 2004; RAHMAN et al, 2008).

Figura 10 - Análise histopatológica do efeito do extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* L. sobre o edema e infiltrado leucocitário no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica do óleo de cróton



Cortes transversais de orelhas dos camundongos corados com Hematoxilina-Eosina (100x e 200x, escalas de 100  $\mu$ m e 200  $\mu$ m) 24 h após a aplicação do óleo de cróton. (A) e (A1): controle (solução salina); (B) e (B1): dexametasona; (C) e (C1): EM 0,1 mg/orelha; (D) e (D1): EM 0,5 mg/orelha; (E) e (E1): EM 1,0 mg/orelha; (F) e (F1): veículo (acetona). As setas indicam as células polimorfonucleares na derme. EM: extrato metanólico.

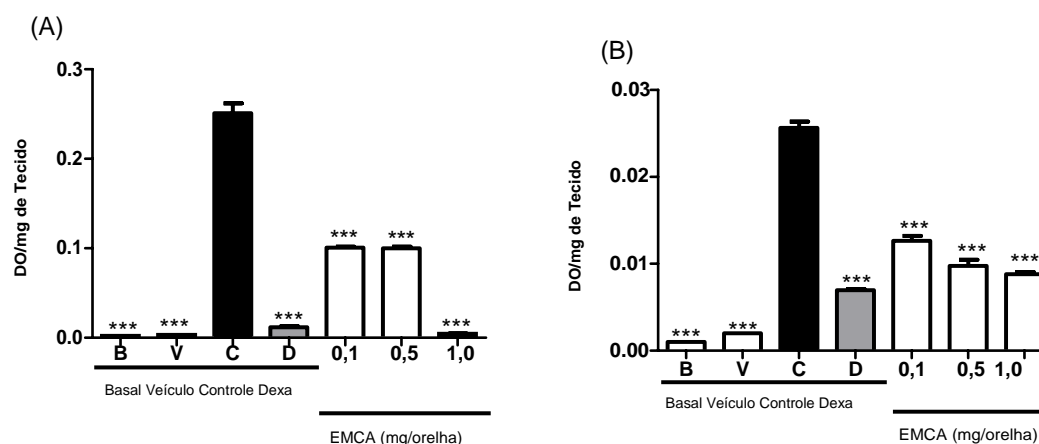
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

### 7.5.5 Efeito do extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* L. sobre as enzimas mieloperoxidase e n-acetil-β-D-glicosaminidase

A administração do óleo de cróton promoveu um aumento considerável da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), quando comparado aos grupos basal e veículo. O tratamento tópico com o EM nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha foi capaz de inibir significativamente a atividade da MPO em 59,80, 60,18 e 98,21%, respectivamente ( $p < 0,001$ ). Verificou-se também que o EM na dose de 1,0 mg/orelha foi tão eficaz na inibição da MPO quanto a dexametasona, cuja inibição da enzima foi de 95,52% (Figura 11A).

A Figura 11B demonstra que o óleo de cróton aumentou significativamente a atividade da n-acetil-β-d-glicosaminidase (NAG) no grupo controle negativo. Nas doses de 0,1, 0,5 e 1,0 mg/orelha de EM ocorreu uma redução da NAG de 50,67, 61,99 e 67,27%, respectivamente, quando comparado com grupo controle. Além disso, constatou-se que as doses de 0,5 e 1,0 mg/orelha do extrato foram tão efetivas na redução da atividade da NAG quanto a dexametasona, que foi capaz de reduzir a atividade da enzima em 72,86% ( $p < 0,001$ ).

Figura 11 – Efeito do extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* L. sobre as enzimas mieloperoxidase e n-acetil-β-d-glicosaminidase



Os valores correspondem à média  $\pm$  E. P. M. (n = 8). (A) Mieloperoxidase; (B) N-acetil-β-D-glicosaminidase. \*\*  $p < 0,01$  ou \*\*\*  $p < 0,001$ , diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste Student-Newman-Keuls.

B= basal; V= veículo; C = controle; D = dexametasona; EM= extrato metanólico.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A MPO é comumente utilizada como um indicativo da presença de polimorfonucleares no foco inflamatório. A supressão dessa enzima

confirmou a capacidade do EM em reduzir a infiltração desses leucócitos para o tecido, o que atesta sua ação anti-inflamatória. Considerando que a infiltração celular seja uma característica marcante da resposta inflamatória cutânea induzida pela aplicação do TPA, evidenciada principalmente pelo acúmulo de neutrófilos, substâncias capazes de reverterem esse processo são capazes de atuar em diversas doenças inflamatórias cutâneas (BILATE, 2007; NÉMETH, MÓCSAI, 2012).

Os polimorfonucleares, especificamente os neutrófilos, são considerados a primeira linha de defesa contra micro-organismos invasores como bactérias, vírus ou fungos, estando presentes em maior abundância no infiltrado inflamatório durante as primeiras 6-24 horas. São fundamentais no controle do processo inflamatório agudo, uma vez que degradam proteínas reconhecidas como estranhas. Esse sistema de defesa caracteriza-se pelo aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO), produzidas pelos leucócitos, particularmente pelos neutrófilos e macrófagos, durante a inflamação e defesa do hospedeiro (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; NÉMETH, MÓCSAI, 2012).

A resposta inflamatória depende do recrutamento e ativação dos leucócitos. Consiste nas seguintes etapas: (1) marginação e rolagem ao longo da parede do vaso; (2) aderência firme ao endotélio; (3) transmigração entre as células endoteliais e (4) migração para os tecidos intersticiais, em direção a um estímulo quimiotático. Esses processos são mediados pela interação entre as moléculas de adesão presentes nas superfícies dos leucócitos e do endotélio, além de haver também a atuação de quimiocinas, as quais modulam a expressão ou a avidéz das moléculas de adesão e estimulam a movimentação direcional dos leucócitos (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; SHERWOOD, TOLIVER- KINSKY, 2004).

Com relação aos ácidos clorogênicos, esses podem estar relacionados à supressão do processo inflamatório, principalmente atuando na diminuição da adesão celular. Considerando que os neutrófilos, apontados como os leucócitos mais numerosos no sangue, respondem mais rapidamente às quimiocinas e aderem mais firmemente às moléculas de adesão, a inibição desse processo irá interferir na ativação das células endoteliais e, conseqüentemente, na



ligação dos leucócitos ao endotélio, diminuindo, portanto, a inflamação aguda (CHANG et al, 2010).

Os neutrófilos também fazem parte da patogenia de algumas doenças inflamatórias crônicas, como, por exemplo, a psoríase, caracterizada pelo acúmulo excessivo de neutrófilos na pele, os quais participam da manutenção do ciclo dessa doença na medida em que interagem com diversas células do tecido por meio da liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, ERO e enzimas proteolíticas. Sendo assim, substâncias que tenham a capacidade de impedir a infiltração leucocitária, são consideradas potenciais ferramentas terapêuticas para o tratamento de processos inflamatórios exacerbados. Uma vez que a cascata do processo inflamatório é interrompida impede-se, portanto, a proliferação celular e possíveis danos celulares. Dentre os principais mediadores envolvidos na lesão tecidual destacam-se as enzimas lisossômicas dos leucócitos, ERO e o óxido nítrico (KUNDU, SURH, 2008; REUTER et al, 2010).

Pesquisas demonstraram que a mangiferina, um polifenol presente nas folhas do café, apresentou atividade contra a MPO (GARRIDO et al, 2004; 2006). O efeito inibitório dos ácidos clorogênicos (ACG) foi elucidado sobre a síntese e liberação de mediadores inflamatórios, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e o óxido nítrico, um radical livre envolvido em muitos processos inflamatórios (DOS SANTOS et al, 2006). Em outro estudo, o ácido cafeico e seus derivados reduziram o influxo de neutrófilos para as patas de animais, o que possivelmente está associado à diminuição dos níveis de interleucina-1 $\beta$ , considerada um importante mediador no recrutamento de leucócitos na resposta inflamatória aguda (DA CUNHA et al, 2004).

A determinação da atividade enzimática, principalmente da MPO, é considerada um marcador quantitativo e sensível de quimiotaxia e infiltração de neutrófilos no processo inflamatório. De fato, a inibição da migração leucocitária é uma estratégia muito eficiente no controle da resposta inflamatória, uma vez que os neutrófilos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e amplificação dessa resposta por meio da liberação de ERO e enzimas. Como resultado, verifica-se que o extrato das folhas de café pode diminuir o dano tecidual causado por enzimas hidrolíticas e algumas

espécies oxidantes (DA CUNHA et al, 2004; FROST-MEYER, LOGOMARCINO, 2012; GARRIDO et al, 2004; 2006).

Quando o processo inflamatório torna-se crônico, observa-se um aumento de mononucleares no infiltrado celular. Nesse caso, a determinação da atividade da NAG é considerada um indicador indireto desse tipo celular, evidenciada principalmente pela presença de macrófagos e mastócitos. Estes, quando ativados, sofrem degranulação promovendo a liberação de mediadores inflamatórios, incluindo aminas bioativas (histamina, serotonina), citocinas, quimiocinas, dentre outros tipos celulares, desencadeando o processo inflamatório (KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004).

A determinação da atividade enzimática da MPO demonstrou que o EM atuou na diminuição do influxo de polimorfonucleares, uma vez que o extrato foi efetivo na supressão da atividade da MPO. Esta fica armazenada nos lisossomas dos neutrófilos (chamados de *grânulos azurófilos*) e, quando liberada, reage com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado pela NADPH oxidase e aumenta o potencial tóxico deste oxidante. Logo, suprimindo a atividade da MPO, é possível otimizar os efeitos adversos oxidativos gerados por essa enzima. Portanto, a inibição da MPO é um indicativo de diminuição do infiltrado de neutrófilos e da atividade anti-inflamatória do extrato das folhas de café (BILATE, 2007; KUNDU, SURH, 2008; SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004).

Verificou-se também uma significativa atividade da NAG, a qual está relacionada à infiltração de leucocitária, cujas células predominantes, os monócitos, migram para o local da lesão, 24-48 horas após o início da inflamação aguda. Atingindo os tecidos, os monócitos transformam-se em macrófagos maiores, apresentando capacidade de fagocitose superior aos macrófagos sanguíneos. Sua ativação pode ser feita pela via clássica, induzida por micro-organismos e/ou endotoxinas, pelos sinais derivados das células T ou por substâncias estranhas. A via alternativa de ativação é desencadeada por citocinas diferentes do interferon gama (IFN- $\gamma$ ), como IL-4 e IL-13, produzidos pelos linfócitos T e outras células, incluindo mastócitos e eosinófilos (CALIXTO et al, 2004; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2009; SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004).

A principal ação dos macrófagos é fagocitar os restos celulares do tecido. Além disso, iniciam o processo de reparo tecidual e estão envolvidos na formação de cicatriz e fibrose. São responsáveis pela liberação de mediadores da inflamação, como citocinas (TNF, IL-1, quimiocinas e outras), eicosanoides e ERO. Essas células são de grande importância para o início e a propagação de todas as reações inflamatórias. Portanto, a inibição da infiltração de mononucleares, evidenciado pela supressão da atividade da NAG, demonstrou o efeito anti-inflamatório apresentado pelo EM, contribuindo para uma possível utilização desse extrato no desenvolvimento de um novo fitoterápico, capaz de combater diversas doenças inflamatórias tópicas, como por exemplo, a psoríase (DA CUNHA et al, 2004; FROST-MEYER, LOGOMARCINO, 2012).

## 8 CONCLUSÕES

O extrato metanólico e frações das folhas de *Coffea arabica* L. apresentaram teores significativos de fenólicos e flavonoides, os quais estão presentes em maior quantidade na fração em acetado de etila.

Os teores de 5-ACQ e mangiferina determinados no extrato metanólico e nas frações em acetado de etila e butanólica demonstram que as folhas de *Coffea arabica* L. são fontes de substâncias bioativas relacionadas a atividades farmacológicas importantes como as atividades antioxidante e anti-inflamatória.

O extrato metanólico e frações das folhas de *Coffea arabica* L. apresentaram atividade antioxidante por meio dos ensaios do sequestro do radical DPPH<sup>•</sup>, do poder de redução do ferro e de co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, com destaque para a fração em acetato de etila nos dois primeiros métodos, e para o extrato metanólico e a fração hexânica no terceiro ensaio. As folhas de *Coffea arabica* L. constituem, portanto, um produto natural promissor no que se refere ao controle dos processos oxidativos.

O extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* L. exibiu atividade anti-inflamatória tópica nos modelos de edema de orelha utilizando diferentes agentes flogísticos (óleo de cróton, fenol e histamina).

As folhas de *Coffea arabica* L. apresentam substâncias fenólicas capazes de exercer efeitos farmacológicos importantes, justificando o seu uso no preparo de chás, bem como a aplicação tecnológica para o desenvolvimento de novos produtos. Além disso, a utilização de uma fonte de baixo custo e de fácil aquisição tornam as folhas de café uma alternativa favorável para o investimento de novas pesquisas.

## REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; SOUSA, R. V.; LIMA, A. R. Atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de café bebida mole. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.1, p.127-133, 2012.

ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 414-420, 2010.

ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; LIMA, A. R.; FERREIRA, E. B.; MALTA, M. R. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial da bebida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.12, p.1799-1804, 2008

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143–152, 2013.

ALONSO-SALCES, R. M.; GUILLOU, C.; BERRUETA, L. A. Liquid chromatography coupled with ultraviolet absorbance detection, electrospray ionization, collisioninduced dissociation and tandem mass spectrometry on a triple quadrupole for the on-line characterization of polyphenols and methylxanthines in green coffee beans. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 23, n. 3, p. 363–383, 2009.

ALVAREZ, A. M. R.; RODRIGUEZ, M. L. G. Lipids in pharmaceutical and cosmetics preparations. **Grassas y aceites**, v. 51, n. 1-2, p. 74-96, 2000.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, J. D.; GUIMARÃES, R. J. Sintomas de desordens fisiológicas em cafeeiro. In: Guimarães, R.J.; Mendes, A.N.G.; Baliza, D.P. (Ed.). **Semiologia do cafeeiro: sintomas de desordens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras: UFLA, 2010. p.169-215.

ALVES, R. C.; CASAL, S.; OLIVEIRA, B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2169-2180, 2009.

ARAÚJO, B. M.; GONÇALVES, R. V.; PELUZIO, M. C. G.; LEITE, J. P. V.; CHAVES, G. S.; LOPES, S. O.; MIRANDA, C. C.; QUEIROZ, J. H. Uso do extrato de folhas de *Mangifera indica* L. e da mangiferina na lesão aterosclerótica em camundongos. APOE<sup>-/-</sup>. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 6, p. 1873-1881, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ (ABIC). Disponível em: <http://www.abic.com.br>. Acesso em 19 de fevereiro 2017.

AZEVEDO, A. B. A.; KIECKBUSH, T. G.; TASHIMA, A. K.; MOHAMED, R. S.; MAZZAFERA, P.; VIEIRA DE MELO, S. A. B. Extraction of Green coffee oil using supercritical carbone dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, n. 2, p. 186-192, 2008.

BARRETO, J.C.; TREVISAN, M. T. S.; HULL, W. E.; ERBEN, G.; BRITO, E. S.; PFUNDSTEIN, B.; WÜRTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; OWEN, R. W. Characterization and quantitation of polyphenolic compounds in bark, kernel, leaves, and peel of mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5599–5610, 2008.

BILATE. A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, n. 2, p. 47-51, 2007.

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**, v. 50, n. 22, p. 6527-6533, 2002.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRAND, C.; TOWNLEY, S. L.; FINLAY-JONES, J. J.; HART, P. H. Tea tree oil reduces histamine-induced edema in murine ears. **Inflammation Research**, v.51, n. 6, p. 283-289, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC nº 13, de 14 de março de 2013. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos, Brasília, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC nº 14, de 14 de março de 2013. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos de Origem Vegetal, Brasília, 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC nº 10, de 10 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais, Brasília, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RE nº 90, de 16 de março de 2004. Determina o Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, Brasília, 2004.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA Nº 971, DE 3 DE MAIO DE 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Brasília, 2006.

BRASIL. **Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação - CIPLAN**. Resolução nº 5 de 08 de março de 1988. Brasília, 1988.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA Nº 886/GM/MS, 20 DE ABRIL DE 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Brasília, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA Nº 533/GM/MS, 28 DE MARÇO DE 2012. Estabelece o elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) Brasília, 2012.

BORÉM, F.M.; SALVA, T.J.G.; DA SILVA, E.A.A. In: BOREM, F.M. (Org.). **Anatomia e composição química do fruto e da semente do cafeeiro**. Pós-colheita do café, Lavras: UFLA, 2008. p. 21-40.

BHOWMIK, A.; KHAN, L. A.; AKHTER, M.; ROKEYA, B. Studies on the antidiabetic effects of *Mangifera indica* stem-barks and leaves on nondiabetic, type 1 and type 2 diabetic model rats. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 4, n. 2, p. 110-114, 2009.

BRESCIANI, L.; CALANI, L.; BRUNI, R.; BRIGHENTI, F.; DEL RIO, D. Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. **Food Research International**, v. 61, p. 196–201, 2014

BURSLEM, D. F. R. P.; GARWOOD, N. C.; THOMAS, S. C. Tropical forest biodiversity—the plot thickens. **Science**, v. 291, n. 5504, p. 291, 606–607, 2001.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin: II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Médica**, v. 70, n. 2, p. 93–103, 2004.

CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. (Orgs.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, p. 297-315, 2001.

CAMARGO, M.B.P. The impact of climatic variability and climate change on arabic coffee crop in Brazil. **Bragantia**, v. 69, n. 1, p. 239–247, 2010.

CAMPA, C.; MONDOLOT, L.; RAKOTONDRAVAO, A.; BIDEL, L. P. R.; GARGADENNEC, A.; COUTURON, E.; LA FISCA, P.; RAKOTOMALALA, J. J.; JAY-ALLEMAND, C.; DAVIS, A. P. A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. **Annals of Botany**, v. 110, n. 3, p. 595–613, 2012.

CAMPOS-ESPARZA, M. R.; SÁNCHEZ-GÓMEZ; M. V., MATUTE, C. Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. **Cell Calcium**, v. 45, n. 4, p. 358–368, 2009.

CÁRDENAS, C.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M.A. Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Properties of Kahweol, a Coffee Diterpene. **Plos One**, v. 6, n. 8, 2011.

CARDOSO, A. P. S. Tecnologia Primária do Café. In: **Café – Cultura e Tecnologia Primária**. Lisboa: II CT, 1994. p. 135-150.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15–25, 2013.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, 1998.

CHANDRA, S.; CHATTERJEE, P.; DEY, P.; BHATTACHARYA, S. Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p.178-180, 2012.

CHANG, W. C.; CHEN, C. H.; LEE, M. F.; CHANG, T.; YU, M. H. Chlorogenic acid attenuated adhesion molecules upregulation in IL-1B-treated endothelial cells. **European Journal of Nutrition**, v. 49, n. 5, p. 267–275, 2010.

CLARKE, R. J.; MACRAE, K. (Ed.) **Coffee chemistry**. London: Elsevier, p. 42-82, v. 1, 1989.

CLAY, J. Coffee. In **World agriculture and the environment**. Island Press, Washington, D.C. p. 69–91, 2004.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence, and dietary burden. **Journal Science Food Agriculture**, v.79, n. 3, p.362-372, 1999.

CLIFFORD, M. N.; KIRKPATRICK, J.; KUHNERT, N.; ROOZENDAAL, H.; SALGADO, P. R. LC-MS<sup>n</sup> analysis of the cis isomers of chlorogenic acids. **Food Chemistry**, v.106, n. 1, p. 379–385, 2008.



COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra Brasileira - Café. Segundo levantamento. v. 4, n. 2, 108 p., 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/> (Acesso em 27/05/2017).

COSTA, G.; FRANCISCO, V.; LOPES, M. C.; CRUZ, M. T.; BATISTA, M. T. Intracellular Signaling Pathways Modulated by Phenolic Compounds: Application for New Anti-Inflammatory Drugs Discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 2876-2900, 2012.

CRUMMEY, A.; HARPER, G. P.; BOYLE, E. A.; MANGAN, F. R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents and Actions**, v. 20, n. 1, p. 69–76, 1987.

CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R.; CUNHA, E. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia**, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 49, p. 50 - 54, 2004.

DA CUNHA, F. M.; DUMA, D.; ASSREUY, J.; BUZZI, F. C.; NIERO, R.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Caffeic Acid Derivatives: In Vitro and In Vivo Anti-inflammatory Properties. **Free Radical Research**, v. 38, n. 11, p. 1241–1253, 2004.

DAMATTA, F. M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2004.

DAVIS, A. P.; GOVAERTS, R.; BRIDSON, D. M.; STOFFELEN, P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, n. 4, p. 465–512, 2006.

DEEPA, M.; RENUKA, D. Potential anti-inflammatory medicinal plants. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 43-49, 2014.

DEL CASTILLO, M. D.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3698–3703, 2002.

DICKSON, J.C.; LIESE, A. D.; LORENZO, C.; HAFFNER, S. M.; WATKINS, S. M.; HAMREN, S. J.; STILES, J. K.; WAGENKNECHT, L. E.; HANLEY, A. J. Associations of coffee consumption with markers of liver injury in the insulin resistance atherosclerosis study. **Gastroenterology**, v. 15, n. 88, 2015.

DOMINGUES JÚNIOR, A.P.; SHIMIZU, M. M.; MOURA, J. C. M. S.; CATHARINO, R. R.; RAMOS, R. A.; RIBEIRO, R. V.; MAZZAFERA, P. Looking for the Physiological Role of Anthocyanins in the Leaves of *Coffea Arabica*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 4, p. 928-937, 2012.

DOS SANTOS, M. D.; ALMEIDA, M. C.; LOPES, N. P.; SOUZA, G. E. P. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**.

v. 29, n. 11; p. 2236-2240, 2006.

DUARTE, G. S. ; PEREIRA, A. A. ; FARAH, A. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. **Food Chemistry**, v.118, n. 3, p. 851–855, 2010.

DZIKI, D. ; GAWLIK-DZIKI, U. ; PECIO, L. ; RÓZYLO, R. SWIECA, M. ; KRZYKOWSKI, A. RUDY, S. Ground green coffee beans as a functional food supplement - Preliminary study. **Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 691- 699, 2015.

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, n. 1-3, p. 110–120, 1996.

ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V.M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 488–495, 2012.

FARAH, A. Coffee as a speciality and functional beverage. In: Paquin, P. **Functional and Speciality Beverage Technology**. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, p. 370-395, 2009.

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

FERNÁNDEZ-PONCE, M. T.; PARJIKOLAEI, B. R.; LARI, H. N.; CASAS, L.; MANTELL, C.; DE LA OSSA, E. J. M. Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from mango leaves using different green techniques: Kinetic and scale up study. **Chemical Engineering Journal**, v. 299, p. 420-430, 2016.

FERRARI, M.; RAVERA, F.; DE ANGELIS, E.; LIVERANI, F. S.; NAVARINI, L. Interfacial properties of coffee oil. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 365, n. 1-3, p. 79–82, 2010.

FERRAZZANO, G.F.; AMATO, I.; INGENITO, A.; DE NATALE, A.; POLLIO, A. Anticariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). **Fitoterapia**, n. 80, v.5, 255-262, 2009.

FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance? **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 5, p. 671-674, 2005.

FRANKLIN, G.; CONCEIÇÃO, L. F. R.; KOMBRINK, E.; DIAS, A. C. P. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. **Phytochemistry**, v. 70, n. 1, p. 60–68, 2009.

FRANOVA, S.; JOSKOVA, M.; SUTOVSKA, M.; NOVAKOVA, E.; ADAMICOVA, K.; PECHANOVA, O.; NOSALOVA, G. The efficiency of polyphenolic compounds on allergen induced hyperreactivity of the airways. **Biomedicine e Preventive Nutrition**, v. 1, n. 4, p. 232–235, 2011.

FROST-MEYER, N. J.; LOGOMARCINO, J.V. Impact of coffee components on inflammatory markers: A Review. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 819-830, 2012.

GÁBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P. G. e WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation protocols**, v. 225, p.129-137, 2003.

GÁBOR, M., RÁZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear o edema induced with capsaicin. **Agents and Actions**, v. 36, n. 1-2, p. 83–86, 1992.

GAWLIK-DZIKI, U.; SWIECA, M.; DZIKI, D.; KOWALSKA, I.; PECIO, L.; DURAK, A.; SECZYK, L. Lipoxigenase inhibitors and antioxidants from green coffee - mechanism of action in the light of potential bioaccessibility. **Food Research International**, v. 61, p. 48–55, 2014.

GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, D.; LEMUS, Y.; DELPORTE, C.; DELGADO, R. Protective effects of a standard extract of *Mangifera indica* L. (VIMANGÒ) against mouse ear edemas and its inhibition of eicosanoid production in J774 murine macrophages. **Phytomedicine**, v. 13, n. 6, p. 412-418, 2006.

GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCÍA, D. LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SELLÉS, A. J.; DELGADO, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANGw). **Pharmacological Research**, v. 50, n. 2, p. 143–149, 2004.

GEORGE, S. G.; RAMALAKSHMI, K.; RAO, L. J. M. A perception on health benefits of coffee. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 5, p. 464-486, 2008.

GLADE, M.J. Caffeine - Not just a stimulant. **Nutrition**, v. 26, n. 10, p. 932–938, 2010.

GLIMN-LACY, J.; KAUFMAN, P.B. **Botany illustrated: introduction to plants, major groups, flowering plant families**. 2. ed. New York: Springer Science, 2006.

GOLE, T.W.; BORSCH, T.; DENICH, M.; TEKETAY, D. Floristic composition and environmental factors characterizing coffee forests in southwest Ethiopia. **Forest Ecology and Management**, v. 255, n. 7, p. 2138-2150, 2008.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C.; MIRA, L.; CORVO, M. L. Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 16, p. 1586-1605, 2008.

GÓMEZ-RUIZ, J.A.; LEAKE, D. S.; AMES, J. M. In Vitro Antioxidant Activity of Coffee Compounds and Their Metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 6962-6969, 2007.

GORNAS, P.; DWIECKI, K.; SIGER, A.; TOMASZEWSKA-GRAS, J.; MICHALAK, M.; POLEWSKI, K. Contribution of phenolic acids isolated from green and roasted boiled-type coffee brews to total coffee antioxidant capacity. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 5, p. 641–653, 2016.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4. ed., p. 187–267, Oxford: Oxford University Press, 2007.

HASLAM, E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

HODGE, A.; LIM, S.; GOH, E.; WONG, O.; MARSH, P. KNIGHT, V.; SIEVERT, W. COURTEN, B. Coffee Intake Is Associated with a Lower Liver Stiffness in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, Hepatitis C, and Hepatitis B. **Nutrients**, v. 9, n. 56, 2017.

ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: the science of quality**. London: Academic, 253 p, 1995.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION (ICO), 2012. Coffee market report - august 2012. Disponível em: <http://dev.ico.org> Acesso em novembro 2015.

IVAN, A. L. M.; CAMPANINI, M. Z.; MARTINEZ, R. M.; FERREIRA, V. S.; STEFFEN, V. S.; VICENTINI, F. T. M. C.; VILELA, F. M. P.; MARTINS, F. S.; ZARPELON, A. C.; CUNHA, T. M.; FONSECA, M. J. V.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI JR, W. A.; CASAGRANDE, R. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 138, p. 124-133, 2014.

JÁCOME, M. A. A.; UEHARA, S. K.; MONTEIRO, W. L. A.; MOREIRA, R. F. A.; DE MARIA, C. A. B.; ROSA, G. Effects of green coffee bean extract in some biomarkers of adult brazilian subjects. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 2, p. 185-190, 2009.

JAISWAL, R.; MATEI, M. F.; GOLON, A.; WITTB, M.; KUHNERT, N. Understanding the fate of chlorogenic acids in coffee roasting using mass spectrometry based targeted and non-targeted analytical strategies. **Food and Function**, v. 3, n. 9, p. 976–984, 2012.

JESZKA-SKOWRON, M.; STANISZ, E.; PEÑA, M.P. Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee. **Food Science and Technology**, v. 73, p. 243-250, 2016.

JESZKA-SKOWRON, M; ZGOLA-GRZESKOWIAK, A.; GRZESKOWIAK, T. Analytical methods applied for the characterization and the determination of

bioactive compounds in coffee. **European Food Research and Technology**, v. 240, p.19–31, 2015.

KLEIN, A. M.; DEWENTER, I. S.; TSCHARNTKE, T. Bee pollination and fruit set of *Coffea arabica* and *C. canephora* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v. 90, n. 1, p. 153–157, 2003.

KOLEVA, I. I.; BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 8-17, 2002.

KUCERA, L.; PAPOUSEK, R.; KURKA, O.; BARTÁK, P.; BEDNÁR, P. Study of composition of espresso coffee prepared from various roast degrees of *Coffea arabica* L. coffee beans. **Food Chemistry**, v. 199, p. 727–735, 2016.

KULKARNI, V. M.; RATHOD, V. K. A novel method to augment extraction of mangiferin by application of microwave on three phase partitioning. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 8-12, 2015.

KUMAR, V., ABBAS, A. K., ASTER, J.C. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**, 8. ed. Philadelphia, PA: Elsevier, 2009.

KUNDU, J. K.; SURH, Y.J. Inflammation: gearing the journey to cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 659, n. 1-2, p. 15-30, 2008.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioprocess Processing**, v. 89, n. 3, p. 217–233, 2011.

LIANG, N.; XUE, W.; KENNEPOLH, P.; KITTS, D. D. Interactions between major chlorogenic acid isomers and chemical changes in coffee brew that affect antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 213, p. 251-259, 2016.

LIM, H., PARK, H., KIM, H. P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 4, p. 442–448, 2004.

LOPÉS-ALACON, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 512 p., 2002.

LORIST, M. M, TOPS, M. Caffeine, fatigue, and cognition. **Brain and Cognition**, v. 53, n. 1, p. 82–94, 2003.

LUDWIG, I.A.; CLIFFORD, M. N.; LEAN, M. E. J.; ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Coffee: biochemistry and potential impact on health. **Food and Function**, v. 5, n. 8, p. 1695–1717, 2014.

MAGALHÃES, L. M.; MACHADO, S.; SEGUNDO, M. A.; LOPES, J. A.; PÁSCOA, R. N. M. J. Rapid assessment of bioactive phenolics and methylxanthines in spent coffee grounds by FT-NIR spectroscopy. **Talanta**, v. 147, p. 460-467, 2016.

MAGALHÃES, E. A.; SILVA, J. S.; SILVA, J. N.; FILHO, D. O.; DORNELES, S. M. L.; MARTIN, S.; DUTRA, L. Casca de café associada à lenha como combustível para aquecimento indireto do ar de secagem, **Revista Brasileira de Armazenagem**, v. 10, p. 66-72, 2008.

MAIA, L.; DE MENDONÇA, A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? **European journal of neurology**, v. 9, n. 4, p. 377-382, 2002.

MARTINS, A.L. **História do Café**. São Paulo: Contexto. 2. ed., 2012.

MATKOWSKI, A. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants – A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 6, p. 548–560, 2008.

MEHARI, B. ; REDI-ABSHIRO, M. ; CHANDRAVANSI, B. S. ; COMBRINCK, S. ; ATLABACHEW, M. ; MCCRINDLE, R. Profiling of phenolic compounds using UPLC–MS for determining the geographical origin of green coffee beans from Ethiopia. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 45, p. 16-25, 2016.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S. SANTOS, T.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MO, J.; PANICHAYUPAKARANANT, P.; KAEWNOPPARAT, N.; SONGKRO, S.; REANMONGKOL, W. Topical Anti-inflammatory Potential of Standardized Pomegranate Rind Extract and Ellagic Acid in Contact Dermatitis. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2014.

MONDOLOT, L.; LA FISCA, P.; BUATOIS, B.; TALANSIER, E.; KOCHKO, A.; CAMPA, C. Evolution in Caffeoylquinic acid content and histolocalization in *Coffea canephora* developing leaves. **Annals of Botany**, v. 98, n. 1, p. 33-40, 2006.

MONTEIRO, E. M. H.; CHIBLI, L. A.; YAMAMOTO, C. H.; PEREIRA, M. C. S.; VILELA, F. M. P.; RODARTE, M. P.; PINTO, M. A. O.; AMARAL, M. P. H.; SILVÉRIO, M. S.; ARAÚJO, A. L. S. M.; ARAÚJO, A. L. A.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O. V. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Sesame Oil and Sesamin. **Nutrients**, v. 6, n. 5, p. 1931-1944, 2014.

MONTEIRO, M. C ; FARAH, A. Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 611-614, 2012.

MOREIRA, M. E. C. ; PEREIRA, R. G. F. A. ; DIAS, D. F. ; GONTIJO, V. S. ; VILELA, F. C.; MORAES, G. O. I.; GIUSTI-PAIVA, A.; SANTOS, M. H. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of roasted and green *Coffea arabica* L. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 466-474, 2013.

MOREIRA, Maria Eliza de Castro. **Avaliação do potencial farmacológico de café (*Coffea arabica* L) verde e torrado**. 2013. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 893-903, 2012.

MURIEL, P.; ARAUZ, J. Coffee and liver diseases. **Fitoterapia**, v. 81, n. 5, p. 297-305, 2010.

MURUGANANDAN, S.; SRINIVASAN, K.; GUPTA, S.; GUPTA, P. K.; LAL, J. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 3, p. 497-501, 2005.

NAIDU, M. M.; SULOCHANAMMA, G.; SAMPATHU, S. R.; SRINIVAS, P. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 377-384, 2008.

NÉMETH, T.; MÓCSAI, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. **Immunology Letters**, v. 143, n. 1, p. 9-19, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2014.

OLIVEIRA, P. M. A.; ALMEIDA, R. H.; OLIVEIRA, N. A.; BOSTYN, S.; GONÇALVES, C. B.; OLIVEIRA, A. L. Enrichment of diterpenes in green coffee oil using supercritical fluid extraction – Characterization and comparison with green coffee oil from pressing. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 95, p. 137-145, 2014.

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

O'NEILL, L. A. J. Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 549-563, 2006.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. 67 p., Ginebra, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE/UNICEF. **Cuidados Primários de Saúde**. Relatório da Conferência Internacional sobre Cuidados Primários da Saúde, Alma-Ata, URSS, 6 a 12 de setembro de 1978. Brasília: Ministério da Saúde, 64 p., 1979.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reactions: Antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucose amine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315, 1986.

PALMER, J. R.; ROSENBERG, L.; RAO, R. S.; SHAPIRO, S. Coffee consumption and myocardial infarction in women. **American Journal of Epidemiology**, v. 141, n. 8, p. 724-731, 1995.

PALOMINO GARCÍA, L. R.; DEL BIANCHI, V. L. Capacidade antioxidante em resíduos da indústria cafeeira. **Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 307-313, 2015.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocess. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 153-162, 2000.

PARDO-ANDREU, G. L.; BARRIOS, M. F.; CURTI, C.; HERNÁNDEZ, I.; MERINO, N.; LEMUS, Y.; MARTÍNEZ, I.; RIANO, A.; DELGADO, R. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on ironinduced oxidative damage to rat serum and liver. **Pharmacological Research**, v. 57, n. 1, p. 79- 86, 2008.

PERRONE, D.; FARAH, A.; DONANGELO, C. M.; PAULIS, T.; MARTIN, P. R. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. **Food Chemistry**, v.106, n. 2, p. 859-867, 2008.

PINTO, C. A.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

RAMALAKSHM, K.; KUBRA, I. R.; RAO, L. J. M. Antioxidant potential of low-grade coffee beans. **Food Research International**, v. 41, n. 1, p. 96-103, 2008.

RAHMAN, S.; BHATIA, K.; KHAN, A. K.; KAUR, M.; AHMAD, F.; RASHID, H.; ATHAR, M.; ISLAM, F.; RAISUDDIN, S. Topically applied vitamin E prevents massive cutaneous inflammatory and oxidative stress responses induced by double application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in mice. **Chemico-Biological Interactions**, v. 172, n. 3, p. 195-205, 2008.

RAMIRO, D. A.; GUERREIRO-FILHO, O.; MAZZAFERA, P. Phenol Contents, Oxidase Activities, and the Resistance of Coffee to the Leaf Miner *Leucoptera coffeella*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, n. 9, p. 1977–1988, 2006.

RANG, H.P., et al. **Farmacologia**. 7. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.



RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

RESENDE, O.; ARCANJO, R. V.; SIQUEIRA, V. C. Influência do tipo de pavimento na secagem do café conilon. **Global Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 26-37, 2009.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2010.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; QUEIROZ, M. E. L. R.; CAMPOS, F. M.; SANT'ANA, H. M. P. Antioxidant in Mango (*Mangifera indica* L.) Pulp. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 62, n. 1, p. 13-17, 2007.

RIKSEN, N. P.; RONGEN, G. A.; SMITS, P. Acute and long-term cardiovascular effects of coffee: Implications for coronary heart disease. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 121, n. 2, p. 185-191, 2009.

RIVERA, D. G.; HERNÁNDEZ, I.; MERINO, N.; LUQUE, Y.; ÁLVAREZ, A.; MARTÍN, Y.; AMADOR, A.; NUEVAS, L.; DELGADO, R. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin reduce the airway inflammation and Th2 cytokines in murine model of allergic asthma. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 10, p. 1336-1345, 2011.

RODEIRO, I.; DELGADO, R.; GARRIDO, G. Effects of a *Mangifera indica* L. stem bark extract and mangiferin on radiation-induced DNA damage in human lymphocytes and lymphoblastoid cells. **Cell Proliferation**, v. 47, n. 1, p. 48-55, 2014.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

RUSAK, G.; KOMES, D.; LILIK, S.; HORZIC, D.; KOVAC, M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 852-858, 2008.

SÄÄKSJÄRVI, K.; KNEKT, P.; RISSANEN, H.; LAAKSONEN, M. A.; REUNANEN, A.; MÄNNISTÖ, S. Prospective study of coffee consumption and risk of Parkinson's disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 908-915, 2008.

SALGADO, P. R.; FAVARIN, J. L.; LEANDRO, R. A.; LIMA FILHO, O. F. Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 4, p.354-359, 2008.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, 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, 2005.

SANCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 877-879, 1999.

SANTOS, D. M. Desenvolvimento de método para obtenção de energia a partir da produção de biodiesel via extração de óleo de borra de pó de café em escala laboratorial. São Paulo, USP (2010). Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de interunidades de Pós-Graduação em Energia, Universidade de São Paulo, 2010.

SANTOS, R. L.; GUIMARAES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n. 4, p. 486-491, 2011.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA.; M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. R.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOMÉ, A. R.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory effects of *Caryocar coriaceum* Wittm. Caryocaraceae fruit fixed oil on mice ear edema induced by diferente irritant agentes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 504-510, 2011.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Arzneimittel-Forschung**, v. 32, n. 3, p. 230–235, 1982.

SHAFIQUE, K.; MCLOONE, P.; QURESHI, K.; LEUNG, H.; HART, C.; MORRINSON, D. S. Coffee consumption and prostate cancer risk: further evidence for inverse relationship. **Nutrition Journal**, v. 11, n. 42, p. 1-7, 2012.

SHAHIDI, F.; CHANDRASEKARA, A. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 1, p.147–170, 2010.

SHEARER, J.; FARAH, A.; PAULIS, T.; BRACY, D. P.; PENCEK, R. R.; GRAHAM, T. E.; WASSERMAN, D. H. Quinides of roasted coffee enhance insulin action in conscious rats. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 11, p. 3529-3532, 2003.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 11, p. 385-405, 2004.

SHIMODA, H.; SEKI, E.; AITANI, M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. **Complementary and Alternative Medicine**, n. 6, v. 9, p. 1-9, 2006.

SILVA, V. **Valorização de Cápsulas de Café e Produção de Biocombustíveis**. Instituto Superior de Engenharia do Porto. Tecnologias de Proteção Ambiental. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), 2011.

SIMÕES, M.H.S. **Caracterização de compostos bioativos e avaliação dos efeitos do extrato hidroetanólico de folhas do cafeeiro (*Coffea arábica*), sobre o perfil lipídico, estresse oxidativo e agragação plaquetária em ratos dislipidêmicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas, MG, 2014.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin – Ciocalteu Reagent, **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, n. 1, p. 200-213, 2005.

SOCOL, C. R., Resíduo de café: um substrato promissor para a produção industrial de bioprodutos com alto valor agregado. In: EMBRAPA-CAFÉ. (Org.). I SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL. 1. ed. BRASILIA: EMBRAPA, v. 1, p. 83-98, 2002.

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

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

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**, v. 95, n. 2-3, p. 119-128, 1982.

TALAMOND, P.; MONDOLOT, L.; GARGADENNEC, A.; KOCHKO, A.; HAMON, S.; FRUCHIER, A.; CAMPA, C. First report on mangiferin (C-glucosyl-xanthone) isolated from leaves of a wild coffee plant, *Coffea pseudozanguebariae* (Rubiaceae). **Acta Botanica Gallica**, v. 155, n. 4, p. 513-519, 2008.

TEIXEIRA, A. L.; PRADO, P. E. R.; DIAS, K. O. G.; MALTA, M. R.; GONÇALVES, F. M. A. Avaliação do teor de cafeína em folhas e grãos de acessos de café Arábica. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, p. 129-137, 2012.

TOCI, A.; FARAH, A.; TRUGO, L. C. Efeito do processo de descafeinação com diclorometano sobre a composição química dos cafés arábica e robusta antes e após a torração. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 965-971, 2006.

TREVISAN, M. T. S.; ALMEIDA, R. F.; SOTO, G.; VIRGINIO FILHO, E. M.; ULRICH, C. M.; OWEN, R. W. Quantitation by HPLC-UV of Mangiferin and Isomangiferin in Coffee (*Coffea arabica*) Leaves from Brazil and Costa Rica After Solvent Extraction and Infusion. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 9, p. 2649-2655, 2016.

TRUGO, L. C.; MOREIRA, R. F.; DE MARIA, C. A. B. Componentes voláteis do café torrado. Parte I: compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 209-217, 1999.

VACLAVIK, L.; VACLAVIKOVA, M.; BEGLEY, T. M.; KRYNITSKY, A. J.; RADER, J. I. Determination of multiple mycotoxins in dietary supplements containing green coffee bean extracts using ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4822-4830, 2013.

VAN DER VOSSSEN, H.; BERTRAND, B.; CHARRIER, A. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. **Euphytica**, v. 204, n. 2, p. 243-256, 2015.

VITAGLIONE, P.; MORISCO, F.; MAZZONE, G.; AMORUSO, D. C.; RIBECCO, M. T.; ROMANO, A.; FOGLIANO, V.; CAPORASO, N.; D'ARGENIO, G. Coffee reduces liver damage in a rat model of steatohepatitis: The underlying mechanisms and the role of polyphenols and melanoidins. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1652-1661, 2010.

WALJEE, A. K.; WIITALA, W. L.; GOVANI, S.; STIDHAM, R.; SAINI, S.; HOU, J.; FEAGINS, L. A.; KHAN, N.; GOOD, C. B.; VIJAN, S.; HIGGINS, P. D. R. Corticosteroid Use and Complications in a US Inflammatory Bowel Disease Cohort. **Plos One**, v. 11, n. 6, p. 1-14, 2016.

WINTGEN, J. N. Coffee; growing, processing, sustainable production; a guidebook for growers, processors, traders, and researchers, 2. ed. **Reference and Research Book News**, v. 28, n. 5, 2013.

XU, H.; WANG, W.; LIU, X.; YUAN, F.; GAO, Y. Antioxidative phenolics obtained from spent coffee grounds (*Coffea arabica* L.) by subcritical water extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 946-954, 2015.

YOUNG, J. M.; SPIRES, D. A.; BEDORD, C. J.; WAGNER, B.; BALLARON, S. J.; DE YOUNG, L. M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, n. 4, p. 367-371, 1984.

YOSHIDA, L. M. **Extração de solúveis do café torrado**. 2005. 198 f.  
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de  
Uberlândia, Uberlândia, 2005.

ZHU, K.; CORDEIRO, M. L.; ATIENZA, J.; ROBINSON JR, W. E.; CHOW, S.  
A. Irreversible inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by  
dicaffeoylquinic acids. **Journal of Virology**, v. 73, n. 4, p. 3309-3316, 1999.

ZOU, T.; WU, H.; LI, H.; JIA, Q.; SONG, G. Comparison of microwave-assisted  
and conventional extraction of mangiferin from mango (*Mangifera indica* L.)  
leaves. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 20, p. 3457-3462, 2013.