

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**DEBORAH DE ALMEIDA BAUER GUIMARÃES**

**INFLUÊNCIA DE EXTRATOS DE CAFÉ SUBMETIDOS A DIFERENTES NÍVEIS DE  
TORRA EM LINHAGEM CELULAR HUMANA DE ADENOCARCINOMA DE  
PRÓSTATA**

**RIO DE JANEIRO – RJ**

**2018**

DEBORAH DE ALMEIDA BAUER GUIMARÃES

**INFLUÊNCIA DE EXTRATOS DE CAFÉ SUBMETIDOS A DIFERENTES NÍVEIS DE  
TORRA EM LINHAGEM CELULAR HUMANA DE ADENOCARCINOMA DE  
PRÓSTATA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

RIO DE JANEIRO – RJ

ABRIL/2018

Ficha Catalográfica

d963

de Almeida Bauer Guimarães, Deborah  
INFLUÊNCIA DE EXTRATOS DE CAFÉ SUBMETIDOS A  
DIFERENTES NÍVEIS DE TORRA EM LINHAGEM CELULAR  
HUMANA DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA / Deborah de  
Almeida Bauer Guimarães. -- Rio de Janeiro, 2018.  
81f.

Orientador: Anderson Junger Teodoro.

Coorientador: Otniel Freitas-Silva.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do  
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação  
em , 2018.

1. Café. 2. Ácidos Clorogênicos. 3. Câncer de  
Próstata. 4. Antioxidante. I. Junger Teodoro,  
Anderson, orient. II. Freitas-Silva, Otniel,  
coorient. III. Título.

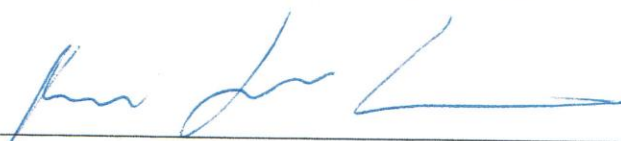
Deborah de Almeida Bauer Guimarães


INFLUÊNCIA DE EXTRATOS DE CAFÉ SUBMETIDOS A DIFERENTES NÍVEIS DE  
TORRA EM LINHAGEM CELULAR HUMANA DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA

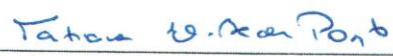
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Aprovado em 06/04/2018

BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Anderson Junger Teodoro (Orientador)  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Otniel Freitas-Silva (Co-orientador)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (PPGAN)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Tatiana El-Bacha Porto  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (INJC)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Ricardo Felipe Alves Moreira  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (PPGAN)

## DEDICATÓRIAS

Dedico essa conquista a Deus. Pois tudo o que fizer, sempre será para honrar o nome dEle.

À minha família, meus pais José Mauro e Cátia Alina, meus irmãos Ana Carolina e Guilherme, que sempre foram os meus melhores incentivadores.

Ao meu cunhado Leonardo, que tanto tem orgulho do que faço.

À minha sobrinha, que está por chegar.

Ao Vagner, que durante todo esse tempo foi um grande incentivador e financiador desse sonho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua infinita misericórdia, por sustentar-me e me permitir chegar até aqui. Sem Ele, eu nada seria.

Aos meus, meus pais José Mauro e Cátia Alina, e meus irmãos Ana Carolina e Guilherme. Vocês são a principal razão por eu não ter desistido no caminho. Nos dois últimos anos enfrentamos câncer, aneurismas, Parkinson, um montão de cirurgias e outras surpresas mais. Tem sido intenso, pesado sim! Mas temos vencido porque estamos juntos. Juntos na fé. Essa dissertação cursou com desafios para nós desde o processo de seleção do concurso. Na madrugada da minha prova de apresentação de pré-projeto, foi o momento em que quase perdermos um soldado nessa batalha. Mas, ao mesmo tempo, fez a apresentação ser mais fácil, pois minha cabeça não estava presente. Os planos de Deus são inexplicáveis mesmo, né Pai?!

Ao Vagner, gostaria que você soubesse que ter você ao meu lado nessa jornada foi muito importante. Seu apoio e amor foram um dos pilares para que eu ficasse firme até o fim. Obrigada por aguentar meu péssimo humor nos dias difíceis e acordar muito mais cedo para me ajudar a chegar à EMBRAPA. Detenho-me aqui, porque não é possível listar todo seu esforço em somar e tornar o caminho menos pesado.

Ao meu cunhado Léo, que saudade de você! Obrigada por sempre orgulhar-se do que eu faço, mesmo não compreendendo muito.

Aos meus sogros Dione e Luiz pela pronta ajuda e apoio sempre.

Ao meu orientador Anderson, obrigada por ter aberto as portas para que eu pudesse ingressar no caminho que mais amo: a ciência. Pelo conhecimento, pelos anos de orientação, pela paciência e incentivo. A gratidão e respeito pelo Pesquisador Anderson é infinita.

Ao meu coorientador Otniel, que mostrou-se solícito e cooperou para a elaboração desse projeto.

Ao meu amigo Joel, JooL! Sou muito grata por tudo que aprendi com você, e pelo auxílio sempre!

Aos meus colegas e amigos de laboratório, obrigada por tudo que aprendi com cada um. Saibam que vocês marcaram a minha vida. Não citarei nomes para não cometer injustiças, mas aos que ainda fazem parte do lab, ou mesmo aos que seguiram outros caminhos, obrigada. Vocês são demais!

Aos que auxiliaram-me na empreitada EMBRAPA: Jeane, Alexandra, Henriqueta, Filipe, Cinthia, Érika, Selma, Filé, Willian, Regina, Isabela e aos que indiretamente também colaboraram. Em especial, Nathalia Jordão e Raí, que me auxiliaram na seleção dos 10 quilos de grãos de café utilizados nessa pesquisa. À equipe do Pesquisador Ronoel, que contribuiu com análises de cromatografia e a Pesquisadora Sidnéia que contribuiu na análise de sólidos totais das amostras.

Ao serviço de RI da UNIRIO e Red Macro, que me proporcionaram uma bolsa de estudos para uma vivência incrível, a mobilidade acadêmica durante o meu mestrado. A professora Liliana Angel e a coordenadora do PPGEDU que me fizeram não desistir dessa oportunidade em meio às dificuldades que surgiram nesse processo de internacionalização.

Aos meus queridíssimos “*chicos argentinos*”, a experiência com foi sensacional! Aprendi com vocês sobre técnica sim! Mas muito mais sobre relações pessoais. “*Los extraño e los quiero mucho! Chicos, gracias! Muchas gracias por todo*”.

À CAPES, FAPERJ e UNIRIO que financiaram e possibilitaram a produção dessa dissertação.

Ao PPGAN e a Prof<sup>a</sup>/Coordenadora Édira pelo apoio.

**Nota:** Esses agradecimentos foram reescritos, pois os agradecimentos originais foram perdidos, infelizmente. Eles haviam sido redigidos durante o processo de elaboração dessa pesquisa. Visto que o meu desejo era que eles expressassem exatamente o que cada pessoa representou para esse projeto, com a emoção do momento. Desse modo, peço desculpas me esqueci de agradecer a alguém.

## **EPIGRAFE**

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem sucedidos”.

Provérbios 16:3

“Desde que dediquei meu futuro ao Senhor, uma série de milagres começou a acontecer em minha vida”.

Contrabandista de Deus



## RESUMO

O café é uma das bebidas mais consumidas no mundo e uma importante *commoditie* para o Brasil e para mercado mundial. É um fruto com diversos compostos que desempenham funções no organismo humano, e seu consumo vem sendo discutido na prevenção de diversas doenças crônicas. O câncer é uma doença crônica multifatorial e cada vez mais é associado a hábitos alimentares; o câncer de próstata é o tipo de tumor mais prevalente na população masculina em todo mundo, sendo uma doença multifatorial, com complexas interações. Estratégias preventivas de utilização de alimentos funcionais com compostos quimiopreventivos, parece contribuir atuando com mecanismos de ação antioxidante e antiangiogênicos. O objetivo desse estudo foi de agregar à literatura mais informações sobre o consumo de café, avaliando a atividade antioxidante; e elucidar o potencial de extratos solúveis obtidos a partir de grãos verdes de café robusta através do efeito na proliferação, ciclo celular e apoptose sobre a linhagem de carcinoma de próstata humano (DU-145), mediante processamento dos grãos de café. Após a elaboração e secagem de extratos aquosos de grãos de café, foram realizadas análises de colorimetria, quantificação de aminoácidos, cafeína e açúcares por HPLC e o teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu. A atividade antioxidante foi avaliada através dos métodos DPPH, FRAP, ABTS e ORAC. A linhagem de próstata DU-145 foi cultivada em RPMI, suplementado com HEPES, soro fetal bovino, Penicilina e Estreptomicina, sob atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e incubadas com diferentes concentrações dos extratos (25 a 5000 µM) por 24 horas. As análises de viabilidade celular, ciclo celular e apoptose foram realizadas através do método MTT e por citometria de fluxo. Os resultados evidenciaram que durante a torra houve consumo de sacarose e frutose; com redução da asparagina, da atividade antioxidante e de compostos fenólicos totais. A variável secagem, interferiu nos aspectos físicos-químicos e também na ação biológica dos extratos produzidos. Os extratos de café liofilizados promoveram um aumento percentual de células na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, seguida de diminuição na fase G<sub>2</sub>/M após 24 horas de tratamento, sendo ainda capazes de induzir apoptose nas células de carcinoma de próstata. Neste sentido, os extratos solúveis de café mostraram-se inibidores do crescimento celular, promotores de modulação de ciclo celular e capazes de aumentar a morte em células de carcinoma de próstata DU-145; sugerindo um efeito regulador nessa linhagem, dependente do tipo de torra, secagem e dose utilizada.

Palavras-chave: Café; Ácidos Clorogênicos; Câncer de Próstata; Antioxidante.

## **ABSTRACT**

### **INFLUENCE ON HUMAN PROSTATE CANCER CELLS OF COFFEE EXTRACTS FROM GRAIS SUBJECT TO DIFFERENT LEVELS OF COFFEE ROASTING**

Coffee is one of the most consumed beverages in the world and an important commodity for Brazil and for the world market. It is a fruit with several compounds that perform functions in the human body, and its consumption has been discussed in the prevention of various chronic diseases. Cancer is a chronic multifactorial disease and is increasingly associated with eating habits; prostate cancer is the most prevalent type of cancer in the male population worldwide, being a multifactorial disease with complex interactions. Preventive strategies for the use of functional foods with chemopreventive compounds seem to contribute with mechanisms of antioxidant and antiangiogenic action. The aim of this study was to add to the literature more information about coffee consumption, evaluating the antioxidant activity; and to elucidate the potential of soluble extracts obtained from green beans of robust coffee through the effect on proliferation, cell cycle and apoptosis on the human prostate carcinoma (DU-145) line by processing the coffee beans. After preparation and drying of aqueous extracts of coffee beans, colorimetric, amino acid, caffeine and sugar quantification analyzes were performed by HPLC and the total phenolic compounds content by the Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity was evaluated through the DPPH, FRAP, ABTS and ORAC methods. The DU-145 prostate was cultured in RPMI supplemented with HEPES, fetal bovine serum, Penicillin and Streptomycin under 5% CO<sub>2</sub> at 37° C and incubated with different concentrations of the extracts (25 to 5000 µM) for 24 hours. Cell viability, cell cycle and apoptosis analyzes were performed using the MTT method and flow cytometry. The results evidenced that during the roast there was consumption of sucrose and fructose; with reduction of asparagine, antioxidant activity and total phenolic compounds. The drying variable interfered in the physical-chemical aspects and in the biological action of the extracts produced. Lyophilized coffee extracts promoted a percentage increase of cells in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase, followed by decrease in the G<sub>2</sub>/M phase after 24 hours of treatment, and still capable of inducing apoptosis in prostate carcinoma cells. Accordingly, soluble coffee extracts proved to be inhibitors of cell growth, modulation of cell cycle promoters and capable of enhancing the death in prostate carcinoma cells DU-145; suggesting a regulatory effect in this lineage, depending on the type of roast, drying and dose used.

**Keywords:** Coffee; Chlorogenic Acids; Prostate Cancer; Antioxidant.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma de produção industrial de café solúvel. ....	28
Figura 2: Fluxograma das modificações do padrão alimentar brasileiro segundo a Pesquisa de Orçamento Familiar Brasileiro e impacto dos novos hábitos na saúde. ....	30
Figura 3: Compostos naturais do café visando as características de células tumorais e resumo dos efeitos anticancerígenos de algumas moléculas presentes no café. ....	33
Figura 4: Grãos e pó de café verde, torrados, tempo e temperatura segundo cada tipo de torra...	37
Figura 5: Representação espacial de cores na escala de cores CIELAB. ....	38
Figura 6: Fluxograma de produção da torra, processo de obtenção pó de café bruto, extração aquosa e secagem por liofilização e atomização. ....	46
Figura 7: Conteúdo de cafeína nos extratos de café secos por liofilizador e <i>spray drier</i> . ....	48
Figura 8: Conteúdo de aminoácidos nos extratos de café verde e torrado secos por liofilização e <i>spray drier</i> . ....	50
Figura 9: Conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos solúveis de café robusta. ....	52
Figura 10: Potencial Antioxidante dos extratos de café solúveis secos por Liofilização pelas metodologias antioxidantes de ABTS, DPPH, ORAC e FRAP. ....	53
Figura 11: Potencial Antioxidante dos extratos de café solúveis secos por atomização pelas metodologias antioxidantes de ABTS, DPPH, ORAC e FRAP. ....	53
Figura 12: Percentual de inibição de viabilidade relativo ao controle de linhagem celular tumoral prostática (DU-145) pelo método de MTT, após 24 horas de tratamento com os extratos de café Liofilizados (25-5000 µg/mL). ....	54
Figura 13: Percentual de inibição de viabilidade relativo ao controle de linhagem celular tumoral prostática (DU-145) pelo método de MTT, após 24 horas de tratamento com os extratos de café atomizados (25-5000 µg/mL). ....	55
Figura 14: Efeito dos extratos de café verde e torrado secos por liofilização (A) e atomização (B) na viabilidade de linhagem celular de câncer de próstata (DU-145) controle e tratamentos 2500 e 5000 µg/mL visualizadas em microscópio óptico. ....	56
Figura 15: Efeito dos extratos de café liofilizado e atomizado sobre a viabilidade celular da linhagem DU-145 após 24 horas de tratamento. Células visualizadas em microscópio óptico não tratadas (CT) e pós-tratamento nas concentrações de 2500 e 5000µg/mL. ....	57

Figura 16: (A) Efeito dos extratos de café secos por liofilização e *spray drier* por citometria de fluxo com os marcadores Anexina-V FITC e Iodeto de Propídio (PI). (B) Percentual de aumento de apoptose relativa ao controle na linhagem de câncer de próstata (DU-145), após 24 horas de tratamento com extratos de café secos por liofilização e *spray drier*. ..... 59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química de grãos de café verde e torrado das principais variedades comercializadas (g/100g de base seca).....	22
Tabela 2: Teor de ácidos clorogênicos em grãos de café verde, expresso em g%, matéria seca. .	23
Tabela 3: Conteúdo de sólidos totais das soluções de café a 50% medidos através de quantificação de extrato seco e ° Brix. ....	47
Tabela 4: Coordenadas de cor (L*a* b*) dos extratos secos de café robusta. ....	48
Tabela 5: Conteúdo de açúcares nos extratos de café verde e torrado secos por liofilizador e <i>spray drier</i> . ....	49
Tabela 6: Conteúdo de aminoácidos nos extratos de café verde e torrado secos por liofilização e <i>spray drier</i> . ....	51
Tabela 7: Efeito dos extratos de café secos por liofilização e <i>spray drier</i> (2500 e 5000µg/mL) na progressão do ciclo celular em linhagem celular de tumor prostático maligno (DU-145) após 24 horas de tratamento.....	58
Tabela 8: Efeito dos extratos de café secos por liofilização e <i>spray drier</i> (2500 e 5000µg/mL) na programação de morte das células da linhagem câncer de próstata humano após 24 horas de tratamento. ....	60

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>µg/mL</b>	Micrograma por mililitro
<b>µmol</b>	micromol
<b>aa</b>	Aminoácido
<b>AAPH</b>	Iniciador radical azo (2,2'-azinobis(2-amidinopropano) dihidrocloro).
<b>ABTS</b>	Radical ácido (2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin 6-sulfônico)
<b>ALA</b>	Alanina
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ARG</b>	Arginina
<b>ASP</b>	Asparagina
<b>AUC</b>	Área em baixo da curva
<b>CGA</b>	Ácidos clorogênicos
<b>CIELAB</b>	Coordenadas de cores do Hunter Lab
<b>DCNT</b>	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, deoxyribonucleic acid)
<b>DPPH</b>	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<b>DU-145</b>	Linhagem tumoral maligna de próstata humana
<b>EROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ET</b>	Equivalente de trolox
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, fluorescein isothiocyanate)
<b>FRAP</b>	Capacidade ferri-redutora
<b>g</b>	Gramma
<b>G<sub>0</sub></b>	Estado de quiescência das células durante o ciclo celular
<b>G<sub>1</sub></b>	Primeira fase do ciclo celular
<b>G<sub>2</sub></b>	Segunda fase do ciclo celular
<b>GLU</b>	Glutamina
<b>GLY</b>	Glicina
<b>HIS</b>	Histidina

<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, High performance liquid chromatography)
<b>ILE</b>	Isoleucina
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>LC</b>	Extrato solúvel de café robusta torra claro, seco por liofilização
<b>LE</b>	Extrato solúvel de café robusta torra escura, seco por liofilização
<b>LEU</b>	Leucina
<b>LM</b>	Extrato solúvel de café robusta torra média, seco por liofilização
<b>LV</b>	Extrato solúvel de café robusta verde, seco por liofilização
<b>LYS</b>	Lisina
<b>M</b>	Fase de Mitose do DNA durante o ciclo celular
<b>min</b>	Minutos
<b>MTT</b>	(brometo de 3-[4,5dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio)
<b>NCI</b>	Nacional Cancer Institute
<b>nm</b>	Nanômetros
<b>ORAC</b>	Capacidade de absorção de radical de oxigênio
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada (do inglês, phosphate buffered saline)
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>PHE</b>	Fenilalanina
<b>PI</b>	Iodeto de Propídio (do inglês, Propidium iodide)
<b>PRO</b>	Prolina
<b>PS</b>	Penicilina e estreptomicina
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>RPMI</b>	meio de cultura de células (do inglês, Roswell Park Memorial Institute medium)
<b>S</b>	Fase de replicação do DNA durante o ciclo celular
<b>SBF</b>	Soro bovino fetal
<b>SC</b>	Extrato solúvel de café robusta torra clara, seco por atomização
<b>SE</b>	Extrato solúvel de café robusta torra escura, seco por atomização
<b>SER</b>	Serina
<b>SM</b>	Extrato solúvel de café robusta torra média, seco por atomização

<b>SV</b>	Extrato solúvel de café robusta verde, seco por atomização
<b>TEAC</b>	Capacidade antioxidante equivalente de trolox
<b>Temp.</b>	Temperatura
<b>THR</b>	Treonina
<b>TPTZ</b>	Reagente 2,3,5-cloreto trifeniltetrazolium
<b>TYR</b>	Tirosina
<b>VAL</b>	Valina



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	21
2.1	COMPOSTOS DO CAFÉ .....	21
2.2	COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ.....	22
2.2.1	Cafeína.....	23
2.2.2	Trigonelina .....	23
2.2.3	Diterpenos.....	24
2.2.4	Ácidos clorogênicos .....	25
2.3	PRODUÇÃO E PROCESSAMENTO DOS GRÃOS.....	26
2.3.1	Produção de café solúvel .....	27
2.4	CONSUMO DE CAFÉ.....	29
2.5	CAFÉ E CÂNCER.....	32
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	OBJETIVO GERAL .....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
4	MÉTODOS.....	36
4.1	MATÉRIA PRIMA E PRODUÇÃO DOS EXTRATOS .....	36
4.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS.....	37
4.2.1	Quantificação de sólidos totais e sólidos solúveis dos extratos aquosos de café.....	37
4.2.2	Coordenadas colorimétricas dos extratos secos de café .....	37
4.2.3	Caracterização dos extratos secos por HPLC .....	38
4.2.3.1	<i>Determinação de cafeína .....</i>	38
4.2.3.2	<i>Determinação de açúcares.....</i>	39
4.2.3.3	<i>Determinação de aminoácidos.....</i>	39
4.3	DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS .....	39
4.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	39
4.4.1	Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH.....	40
4.4.2	Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS <sup>•+</sup> .....	40
4.4.3	Análise determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do Ferro (FRAP).....	41

4.4.4	Ensaio de atividade antioxidante pelo método de ORAC .....	41
4.5	ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS DE CAFÉ.....	42
4.5.1	Cultura de células e protocolo de tratamento .....	42
4.5.2	Viabilidade celular pelo método de MTT.....	43
4.5.3	Viabilidade celular em hemocitômetro.....	43
4.5.4	Avaliação da influência dos extratos no ciclo celular .....	44
4.5.5	Avaliação da influência dos extratos na morte celular.....	44
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	44
5	RESULTADOS .....	45
5.1	EXTRAÇÃO E PRODUÇÃO DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE CAFÉ .....	45
5.2	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	47
5.2.1	Teor de sólidos nos extratos aquosos de café.....	47
5.2.2	Colorimetria dos extratos solúveis atomizados e liofilizados .....	47
5.2.3	Quantificação da cafeína por HPLC.....	48
5.2.4	Quantificação dos açúcares por HPLC.....	49
5.2.5	Quantificação dos aminoácidos por HPLC .....	49
5.3	TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS SECOS DE CAFÉ	51
5.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS SECOS DE CAFÉ .....	52
5.5	EFEITOS DOS EXTRATOS SECOS DE CAFÉ EM LINHAGEM DE CÂNCER DE PRÓSTATA .....	54
5.5.1	Efeito dos extratos secos de café na viabilidade celular.....	54
5.5.2	Efeito dos extratos de café na quantificação celular em hemocitômetro .....	55
5.5.3	Efeito dos extratos secos de café no ciclo celular .....	57
5.5.4	Efeito dos extratos secos de café na morte celular .....	58
6	DISCUSSÃO .....	61
7	CONCLUSÕES .....	70
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

O café é uma bebida com ação bioativa tradicionalmente consumida e cada vez mais explorada pela população brasileira e mundial. O Brasil é um dos maiores produtores de café no mundo; um dos poucos países que produz as duas principais espécies, *C. arabica* e *C. canilon*. No país, há dez estados produtores contudo, Minas Gerais e Espírito Santo são os mais relevantes na produção. O café robusta capixaba destaca-se em qualidade quando comparado aos grãos produzidos em outras regiões do Brasil e tende a angariar o mercado de consumo (ABIC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ, 2016).

A variedade de café robusta representa uma menor fração no mercado brasileiro tanto para o cultivo quanto para o consumo. Isso é devido às características de sabor que essa variedade apresenta. Todavia, o café robusta melhor preparado pode fornecer *blends* de qualidade superior, além de apresentar diferenças importantes de qualidade na colheita e pós-colheita. A espécie *C. conilon*, também é capaz de oferecer um café superior em teor de ácidos clorogênicos quando comparado ao *C. arábica* (FARAH *et al.*, 2006). Essa característica positiva se dá pela capacidade mais elevada de adaptação a modificações climáticas e resistência a pragas, fator fundamental para a produção de compostos com função de defesa para a planta e com função biológica em humanos.

Os alimentos de origem vegetal têm sido cada vez mais estudados por apresentarem diversos compostos com função bioativa no organismo humano. O reforço para uma alimentação saudável surge em *guidelines* da Organização Mundial de saúde (OMS) (WHO, 2013, 2017), assim como em publicações nacionais do Ministério da Saúde (BRASIL, 2013; INCA, 2015). Esse apelo é cada vez mais frequente, pois a população mundial é acometida por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) de forma exponencial.

As DCNT são geradas por diversos fatores como pré-disposição genética e fatores ambientais. Hábitos alimentares podem ser peça chave no silenciamento ou super expressão de genes ligados a desfechos como hipertensão, diabetes, alzheimer, doenças cardiovasculares, isquemias, câncer entre outros. Alimentos como estratégia de saúde pública para a prevenção da incidência de doenças como o câncer, reforçam o papel fundamental de uma nutrição de qualidade. Modificações no padrão de consumo alimentar, com crescente preferência da grande

população por alimentos de alta densidade calórica e baixo conteúdo nutricional são notadas em âmbito mundial; ainda assim existem alguns alimentos presentes diariamente na mesa do brasileiro que podem trazer benefícios à saúde (BRASIL, 2017; IBGE, 2011).

O café do tipo robusta ainda necessita ganhar espaço no campo, na mesa e na literatura científica. Há uma escassez de dados que exploram a capacidade *in vitro* dessa variedade, de forma desassociada de *blends* de café. Desse modo, justifica-se a realização de pesquisas direcionadas ao estudo isolado de café robusta e seu efeito sobre a saúde, para melhor compreensão das características individuais da espécie.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 COMPOSTOS DO CAFÉ

Sendo o Brasil o maior produtor e exportador, o café é a segunda *commoditie* mais comercializada e uma das bebidas mais consumidas mundialmente.

A planta de café produz frutos com polpa doce e fina, em cujo interior encontram-se duas sementes, que são os grãos de café, base para utilização na indústria cafeeira (HALAL, 2008).

Segundo TOLEDO, (1997 Apud (TOCI, 2006)) a composição química do café cru depende da espécie, da variedade em questão e de outros fatores como práticas agrícolas, grau de maturação do fruto do café, processamento primário e condições de estocagem.

O grão de café (café verde) possui além de uma grande variedade de minerais, aminoácidos, lipídeos como triglicerídeos e ácidos graxos livres, açúcares, polissacarídeos e uma vitamina do complexo B, a niacina (vitamina B3).

Os ácidos clorogênicos (CGA) são os mais importantes antioxidantes e apresentam-se em maior quantidade no café, na proporção de até 14% (em peso seco), cafeína e trigonelina também são outros dois compostos de importância na matriz do café. Os principais CGA são: ácidos cafeoilquínicos, dicafeoilquínicos, feruloilquínicos, p-cumaroilquínicos e ésteres mistos dos ácidos cafeico e ferúlico com ácido quínico, com pelo menos três isômeros por grupo. (ABIC, 2015; FARAH; DONANGELO, 2006). Segundo NOGUEIRA E TRUGO (2003), a trigonelina, os ácidos clorogênicos e a cafeína são encontrados na bebida do café, pois são facilmente solubilizados em água quente. Considerando a existência de uma variação dos teores dos diversos compostos presentes nessa bebida, é observada uma grande influência pelos processos utilizados em sua cadeia produtiva e preparo de consumo. A Tabela 1 mostra a variação de macronutrientes e minerais entre as espécies de café verde e torrado mais cultivadas.

**Tabela 1:** Composição química de grãos de café verde e torrado das principais variedades comercializadas (g/100g de base seca).

	Café Arábica		Café Robusta	
	Verde	Torrado	Verde	Torrado
Minerais	3,0-4,2	3,0-4,5	4,0-4,5	4,6-5,0
Carboidratos	56,0-63,0	24,0-42,5	42,0-54,0	25,0-40,5
Proteínas	11,0-13,0	13,0-15,0	11,0-13,0	13,0-15,0
Lipídios	12,0-18,0	14,5-20,0	9,0-13,0	11,0-16,0

Adaptado de CLARKE e MACRAE (1987).

## 2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFÉ

A qualidade das bebidas de café está altamente relacionada ao conteúdo dos compostos químicos dos grãos de café. Os grãos de café cru são ricos em compostos bioativos, destacando-se os ácidos clorogênicos, a trigonelina, a cafeína, os tocoferóis e os diterpenos. O perfil desses compostos é principalmente influenciado por aspectos genéticos, como espécies e variedades, e fisiológicos, como o grau de maturação assim como o processamento (FARAH, 2009; RODRIGUES, 2013). Uma combinação complexa desses compostos químicos determina as características sensoriais de bebidas. A Tabela 2 mostra como o teor de ácidos clorogênicos é diferente nas variedades de café.

Na infusão de café, o conteúdo dos compostos bioativos é dependente principalmente da formulação dos *blends* de grãos de café cru e do processo de torra onde são formados os produtos da reação de *Maillard*, as lactonas de ácido clorogênico e o ácido nicotínico (trigonelina+ácidos fenólicos menores) (MONTEIRO; TRUGO, 2005; RODRIGUES, 2013).

**Tabela 2:** Teor de ácidos clorogênicos em grãos de café verde, expresso em g%, matéria seca.

Variedade de café	Ác.	Ác.	Ác.	Ács. Clorogênicos Totais (g%)
	Cafeoilquínico (g%)	Feruloilquínico (g%)	Dicafeoilquínico (g%)	
<i>C.arabica</i>	5,76	0,25	0,87	6,88
<i>C. arabica</i> (Angola)	4,94	0,55	1,05	6,53
<i>C. arabica</i> var. Boubon (Brasil)	4,2	0,28	0,77	5,25
<i>C. canephora</i> var. Robusta	6,07	0,69	1,21	7,98
<i>C. canephora</i> var. Robusta (Angola)	4,20	0,64	1,33	6,63
<i>C. canephora</i> var. Robusta (Brasil)	7,42	0,95	1,09	9,47

Adaptado de FARAH e DONANGELO (2006).

### 2.2.1 Cafeína

A cafeína é um alcaloide farmacologicamente ativo, com efeito no sistema nervoso central, pertencente ao grupo das xantinas e suas principais fontes alimentares são café, mate e guaraná. É inodora e possui sabor amargo característico, contribuindo com uma nota de amargor importante para o sabor e aroma da bebida do café (MONTEIRO; TRUGO, 2005).

Os teores desse alcaloide na bebida são influenciados pelo tipo e também pelo processo utilizado no seu preparo, durante a torrefação é perdida uma pequena quantidade de cafeína. O café robusta apresenta maior quantidade de cafeína em relação à variedade arábica. No café torrado a percentagem de cafeína determinada sobre a matéria seca aumenta em até 10% pela perda de água e por degradação de outros componentes da matéria seca (HALAL, 2008).

### 2.2.2 Trigonelina

A trigonelina é uma N-metil betaína, importante para o sabor e aroma do café, com potencial terapêutico como um agente hipoglicêmico e neuroprotetor e também tem efeitos

anticancerígenos (JESZKA-SKOWRON; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK; GRZEŚKOWIAK, 2015). No entanto, neste momento a sua utilização como um agente anticancerígeno é controversa (LUDWIG et al., 2014a). Esse composto contribui para o aroma por meio da formação de produtos de degradação durante a torra e, entre esses produtos, estão as piridinas e o N-metilpirrol (MONTEIRO; TRUGO, 2005).

No processo de degradação da trigonelina são formados diversos compostos voláteis, como as piridinas e pirróis, que vão contribuir para o aroma do café. Além disso, durante a demetilação da trigonelina ocorre a formação de ácido nicotínico, substância ausente no café e formada durante a torrefação. Após a torra dos grãos, a trigonelina remanescente da degradação térmica influencia no sabor amargo da bebida (HALAL, 2008).

### 2.2.3 Diterpenos

Caveol e cafestol são os principais componentes da fração lipídica insaponificável em grãos de café verde e torrado. Esses compostos estão provavelmente relacionados à tolerância contra os estresses oxidativos causados por variação de temperatura, atuando como estabilizadores de membrana. Os grãos de café arábica (*C. arabica*) apresentam majoritariamente cafestol e caveol na fração lipídica, enquanto *C. canephora* (café robusta) apresenta mais cafestol e teores mínimos ou inexistência de caveol (IVAMOTO et al., 2017).

Os diterpenos do café são comumente associados com propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas e antioxidantes na saúde humana (CHU et al., 2011). Foi relatado que palmitatos de cafestol e de caveol são capazes de aumentar a atividade da glutathione S-transferase (GST), um grupo de enzimas multifuncionais que atuam na defesa das células contra o estresse oxidativo (LAM; SPARNINS; WATTENBERG, 1982). Apresentam ainda, atividade anti-inflamatória por meio da inibição da produção de óxido nítrico e inibição de óxido nítrico sintetase induzido, que são responsáveis pelo excesso de óxido nítrico em células inflamatórias, podendo ser a causa de lesões inflamatórias (KIM et al., 2004).

Apesar dos diversos efeitos benéficos descobertos, o caveol e o cafestol quando consumidos em doses elevadas apresentam o efeito negativo de aumentar a taxa do colesterol no



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

#### 2.2.4 Ácidos clorogênicos

Os ácidos clorogênicos são descritos como uma família de ésteres que formam um conjunto de cinco grupos principais de compostos fenólicos e seus isômeros, formados, principalmente, pela esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos derivados do ácido cinâmico: o ácido cafeico (CA), o ferúlico (FA), ou o *p*-cumárico (*p*-CoA) (CLIFFORD, 2000). Esses grupos são: ácidos cafeoilquínicos (CQA), dicafeoilquínicos (diCQA), feruloilquínicos (FQA), *p*-cumaroilquínicos (CoQA), com pelo menos três isômeros principais em cada classe, e cafeoilferuloilquínicos (CFQA). São mais os abundantes polifenóis presentes no café são os ácidos clorogênicos, e o ácido 5-cafeoilquínico é o principal variante. Consumo de 5 xícaras de café pode proporcionar cerca de 1 g de ácido clorogênico (STALMACH *et al.*, 2009).

Devido ao apelo de saúde sobre os ácidos clorogênicos que vem acontecendo nos últimos anos, a ciência vem buscando entender os efeitos desses ácidos e de que forma eles podem agir. O processo de torra está intimamente relacionado com a disponibilidade e o conteúdo desses compostos. Em torras mais suaves, eles podem manter-se parcialmente intactos, mas produzem invariavelmente alguns dos compostos voláteis responsáveis pelo aroma característico do café torrado, como: 2- metoxi-4-vinilfenol, 2- metoxi-4-etilfenol e guaiacóis (TSUKUI; OIGMAN; REZENDE, 2014).

No intuito de esclarecer os reais efeitos e mecanismos desses compostos fenólicos no organismo humano, vêm sendo conduzidos alguns estudos de biodisponibilidade com animais, e mais recentemente em humanos têm sido conduzidos (FARAH *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2007; STALMACH *et al.*, 2009). Estudos de revisão como o de LUDWIG *et al.* (2014a), baseado em estudos prévios e no estudo de STALMACH *et al.* (2009) revisou a biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos em humanos saudáveis e o propôs a meia vida aparente de cada CGA e seus metabólitos.

## 2.3 PRODUÇÃO E PROCESSAMENTO DOS GRÃOS

O fruto de café passa por diversas etapas de processamento até o produto final principal, a infusão. Cada etapa é fundamental para a obtenção de um café de boa qualidade. Durante as etapas de processamento, o café passa por inúmeras modificações físicas, mas principalmente químicas. A etapa de tratamento do grão com vapor é uma etapa opcional, que deixa o café menos irritante ao estômago, tendo em vista que reduz ácidos clorogênicos (FARAH, 2009; MAIER, 1994).

A torrefação é a etapa que mais altera os compostos do café, principalmente pelas modificações proporcionadas ao aroma do café. O café verde apresenta aroma completamente diferente do café torrado. É somente nessa etapa complexa, e que ainda não foi totalmente esclarecida, que o café desenvolve sabor e aroma característicos (FARAH et al., 2005; PREEDY, 2015).

As elevadas temperaturas de torrefação causam transformações físico-químicas nas sementes e, conseqüentemente, na bioatividade da bebida. No início da torrefação a sacarose começa a se caramelizar, a modificação da cor do grão para marrom claro começa a acontecer quando a temperatura chega a aproximadamente 160°C, onde também começa a surgir o aroma de café. Contudo somente a 190°C, as reações de *Maillard* e *Strecker* (que envolvem redutonas, proteínas e outros compostos de diferentes pesos moleculares) acontecem. Essas reações são responsáveis pelo sabor, aroma e a cor marrom escuro; e são interrompidas de acordo com a coloração desejada do grão. Sendo assim, o grão pode estar em diferentes níveis de torrefação, podendo ser de torra clara à torra escura (FARAH, 2009).

Além das características desejáveis ocorridas durante a torra alterações indesejáveis também acontecem, como a formação de acrilamida na reação de *Maillard*.

A asparagina é o principal aminoácido precursor da acrilamida no café durante a torrefação, substância potencialmente prejudicial à saúde, tem sido considerada neurotóxica e carcinogênica (PORTO *et al.*, 2015). A acrilamida é formada em altas concentrações durante os primeiros minutos de torra, resultando em níveis de 7.000 ng/g. É provável carcinógeno humano (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 1999), com base nos estudos em animais de laboratório (EFSA, 2015; FAO, 2004). Em 2005 a OMS alertou como seguro o consumo de 1 µg/kg de acrilamida/peso corporal/dia.

Esse composto é formado nos alimentos de matriz rica em glicídios quando submetidos a elevadas temperaturas. Contudo, o aumento do tempo de torrefação leva à degradação desse composto (DIAS *et al.*, 2009).

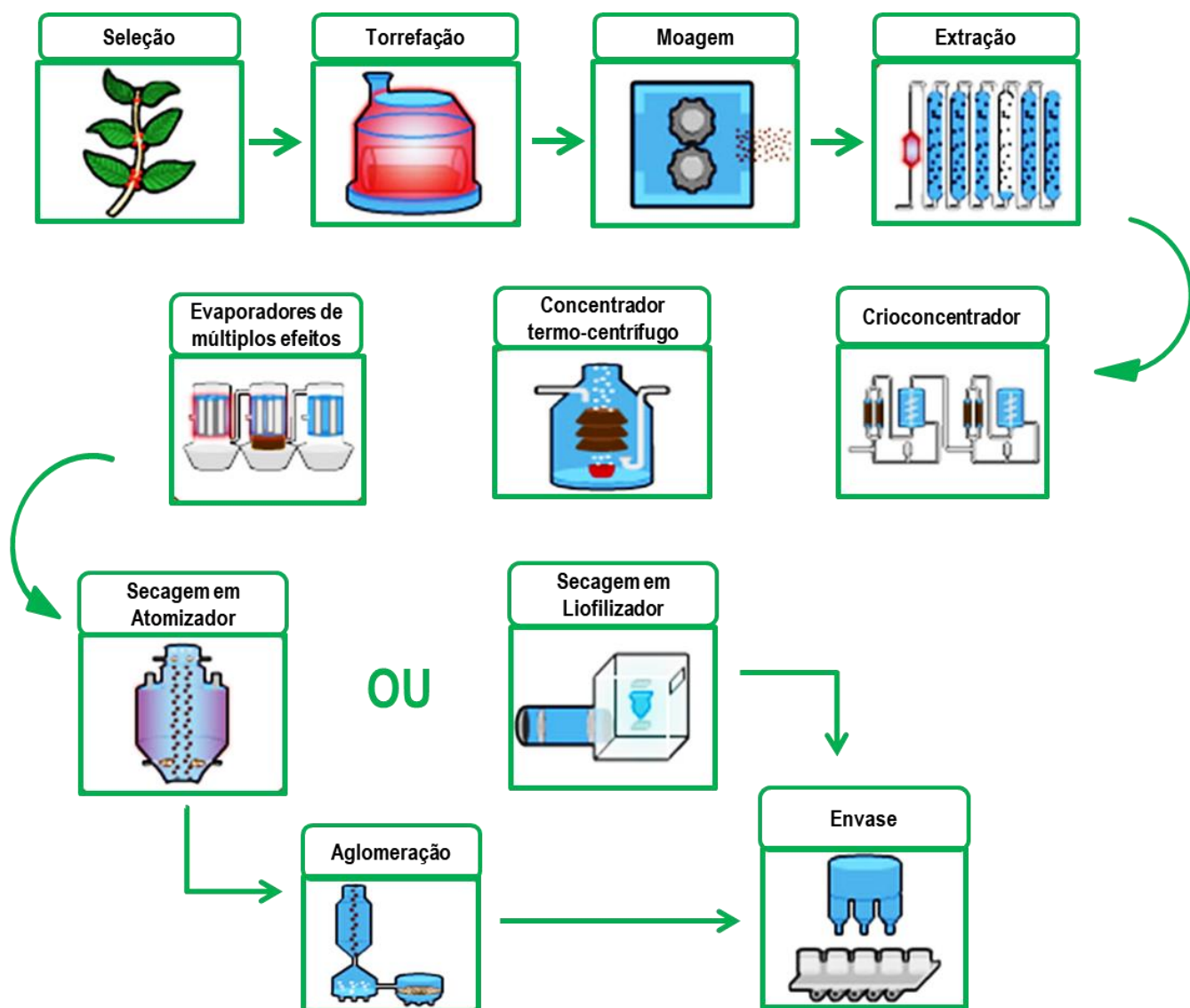
### 2.3.1 Produção de café solúvel

A indústria brasileira de café solúvel é a maior do mundo, a ANVISA regulamenta como: "produto resultante da desidratação do extrato aquoso obtido exclusivamente do café torrado, através de métodos físicos, utilizando água como único agente extrator, com cafeína: mínimo 2,0% (p/p de café solúvel comum), e o classifica de acordo com o processo de desidratação e forma de apresentação. (1) café solúvel em pó ou "*spray dried*": é o produto obtido através de processo no qual o extrato de café, no estado líquido, é pulverizado em atmosfera aquecida, para através da evaporação da água, formar partículas secas; (2) café solúvel granulado ou aglomerado: é o produto obtido por processamento, no qual as partículas de café solúvel "*spray dried*" são fundidas para formar partículas maiores (grânulos); (3) café solúvel liofilizado ou "*freeze-dried*": é o produto obtido por processamento no qual o café no estado líquido é congelado e a água é removida por sublimação formando partículas secas de formas irregulares" (ANVISA, 1999).

Por esse tipo de produto ter baixa umidade, é possível mantê-lo estável por mais tempo, e portanto sua vida útil. A facilidade no preparo, também é um quesito favorável para a escolha do consumidor (ABICS, 2018).

Durante o processo de torração para a produção de café solúvel (Figura1), o peso será reduzido em 15 a 20% dependendo das especificações dos compradores. Em uma torrefação de cor clara pode ocorrer perda de 15%. Enquanto que uma de torra de cor mais escura, a perda é de 20%. A moagem em partículas finas aumenta a superfície de contato da matriz, possibilitando assim um rendimento de extração mais elevado. Já o rendimento de extração para café regular é da ordem de 20 a 25%, em uma planta de extração industrial com seu fluxo superior é possível extrair entre 25 a 30% de materiais solúveis a pressão atmosférica e mantendo uma temperatura ao redor de 100° C. Em processamento moderno, a temperatura de entrada do extrator é 180 a 200°C e mantida a uma pressão de 12-17 bars para prevenir ebulição. A esta temperatura e

pressão o rendimento de extração pode ser aumentado a mais que 50% dependendo do *blend* usado (robusta ou arábica). Contudo quanto mais alto o rendimento, menor a qualidade e especialmente de aroma. Na extração dos sólidos solúveis, após ser torrado e moído, ocorre a extração do pó café com água quente, obtendo o extrato de café. Os sólidos solúveis são obtidos por lixiviação e encontram-se diluídos na água (REVISTA CAFEICULTURA, 2006).



**Figura 1:** Fluxograma de produção industrial de café solúvel.  
 Fonte: Adaptado de ABICS (2018).

A secagem é muito importante para a qualidade do café, e depende do processo de extração. Ela é realizada por dois métodos diferentes usados nos processos industriais pelo mundo inteiro: secagem a frio (liofilização) e secagem a quente por pulverização (atomização). A qualidade normal de café liofilizado requer um rendimento de extração de cerca de 40 a 42%, enquanto que um café seco por *spray-drier* de qualidade, podem ser obtido com café de rendimento de extração mais elevado (REVISTA CAFEICULTURA, 2006).

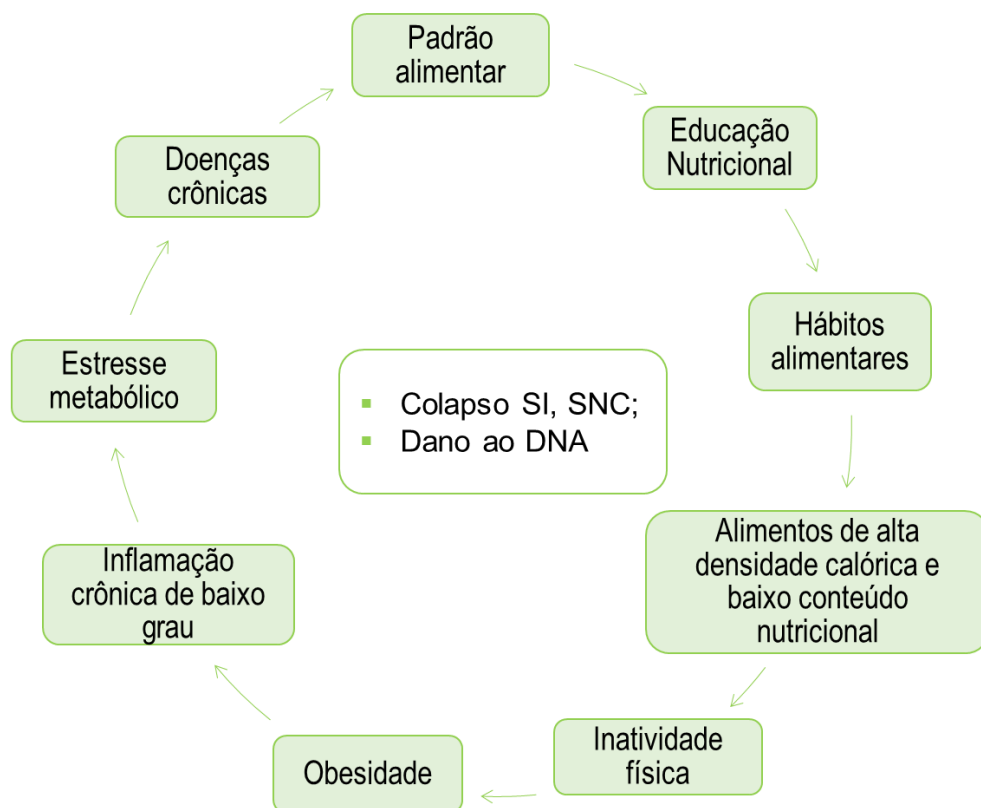
Na concentração a frio, há maior preservação no aroma do café. É o modo mais avançado de desidratação através de baixas temperaturas e ausência de ar secante durante o processo (cristalização, granulação, secagem a frio). A etapa anterior à secagem por liofilizador é a de congelamento lento, onde são formados cristais de gelo grandes, característica essencial para controle de cor como também para a solubilidade do produto final. Porém, esse tipo de secagem requer alto investimento inicial e elevado custo de energia (REVISTA CAFEICULTURA, 2006).

A secagem por *spray-drier*, utiliza altas temperaturas sob alta pressão para permitir a volatilização do extrato aquoso. O extrato de café é lançado em uma câmara em gotículas minúsculas, que em contato com o ar muito quente, perde a umidade transformando-se em pó na forma de partículas arredondadas. Um inconveniente desse processo é que as partículas produzidas são muito finas para serem consumidas e absorvem rapidamente umidade; por isso, acrescenta-se um passo a mais para fundir essas partículas por vapor em torres similares dos pulverizadores ou por aglomeração para obtenção de partículas do tamanho apropriado para facilitar o consumo (REVISTA CAFEICULTURA, 2006).

## 2.4 CONSUMO DE CAFÉ

Segundo dados apresentados pela Pesquisa de Orçamento Familiar brasileira (IBGE, 2011), o perfil populacional de consumo de alimentos foi consideravelmente modificado saindo de uma população desnutrida para uma população com padrões alimentares obesogênicos. Como mostrado na Figura 2, observa-se um consumo elevado de alimentos com alto conteúdo calórico e um perfil nutricional incompleto. A inversão observada no consumo de alimentos, somado a educação nutricional e inatividade física gera efeitos obesogênicos na população. A obesidade é condição de uma inflamação crônica de baixo grau, que é capaz de gerar estresse continuado no

organismo acarretando diversas doenças crônicas como diabetes, doenças coronarianas, neurológicas e câncer. Compostos bioativos encontrados em alimentos de origem vegetal, têm sido relacionados crescentemente com a prevenção e auxílio no tratamento de doenças crônicas.



**Figura 2:** Fluxograma das modificações do padrão alimentar brasileiro segundo a Pesquisa de Orçamento Familiar Brasileiro e impacto dos novos hábitos na saúde.

Legenda: SI: Sistema Imunológico; SNC: Sistema Nervoso Central; DNA: Ácido desoxirribonucleico.

SOUZA *et al.* (2013), mostraram que dentre os alimentos mais consumidos pelos brasileiros, o café continua sendo um dos poucos alimentos tradicionais que segue em consumo ótimo pela população brasileira, independente de faixa etária. É um importante contribuinte para o consumo de compostos fenólicos na dieta. Dados da Organização Internacional do Café, mostram que o consumo mundial de café encontra-se em ascensão. Tanto por questões tradicionais de consumo quanto por questões de inovações no conceito da bebida, bem como novos subprodutos para o uso de resíduos industriais da cadeia de produção do café.

O café é consumido principalmente por causa de seu sabor agradável e suas propriedades estimulantes. Segundo revisões sobre o assunto, o café é a principal fonte de ácidos clorogênicos

na dieta ocidental e devido a seus compostos bioativos, seu consumo é constatemente associado a alegações de saúde (CLIFFORD, 2000; OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Entretanto, destaca-se o consumo controlado, principalmente em grupos especiais como crianças, gestantes, lactantes. Essa ressalva dá-se, principalmente pelos efeitos da cafeína no organismo. O metabolismo da cafeína é mais lento nas mulheres grávidas e no feto, resultando numa exposição prolongada a este composto. A cafeína ainda tem a capacidade de atravessar facilmente a placenta. Também já foi registrado, que quando há o consumo de elevados níveis de cafeína durante a gestação, os recém-nascidos podem possuir níveis farmacologicamente ativos de cafeína no plasma. Apesar desses dados, a ingestão controlada de café ou cafeína durante a gestação não parece ser prejudicial, pois sua suposta relação com aborto espontâneo não pode ser confirmada em estudos epidemiológicos.

Em outras fases da vida, o consumo de café é relacionado a fortes efeitos antioxidantes em estudos com seres humanos, inclusive em ensaios randomizados controlados (CORRÊA *et al.*, 2012). É capaz de promover apoptose em linhas celulares de câncer humano e há evidência moderada entre a associação de café com o risco reduzido de adenoma colo-retal, também tem sido relacionado a efeitos benéficos na fibrose hepática e cirrose (HASHIBE *et al.*, 2015; UCCELLA *et al.*, 2013).

Resultados de genotoxicidade em estudos com seres humanos foram inconsistentes e o café não induziu danos cromossômicos em animais (TAI *et al.*, 2010). Estudos também indicam que os compostos presentes na bebida de café têm benefícios potenciais para a saúde, incluindo uma redução da incidência de diversas doenças crônicas e degenerativas, como doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, doença de Parkinson e câncer (BØHN *et al.*, 2012; HIGDON; FREI, 2007; LÖF *et al.*, 2015; LUDWIG *et al.*, 2014a; VITAGLIONE; FOGLIANO; PELLEGRINI, 2012), assim como modulação positiva da microbiota humana (LÓPEZ-BARRERA *et al.*, 2016).

## 2.5 CAFÉ E CÂNCER

O câncer é umas das doenças crônicas não transmissíveis que ganhou foco nas agências mundial e nacionais de saúde, uma vez que é uma doença multifatorial, muitas vezes silenciosa e devastadora. Normalmente só é descoberta em estágios avançados, uma vez que geralmente é indolor em estágios iniciais, e a falta de exames de prevenção para os diversos tipos de câncer. Em proporção mundial, cura e a prevenção têm sido buscadas. Estudos reforçam que apesar de ser uma doença multifatorial, a alimentação exerce grande influência na incidência de câncer, e é um potencial aliado a cura (KEY *et al.*, 2004; LUDWIG *et al.*, 2014a; RIBOLI; NORAT, 2003; SURH, 2003; VITAGLIONE; FOGLIANO; PELLEGRINI, 2012).

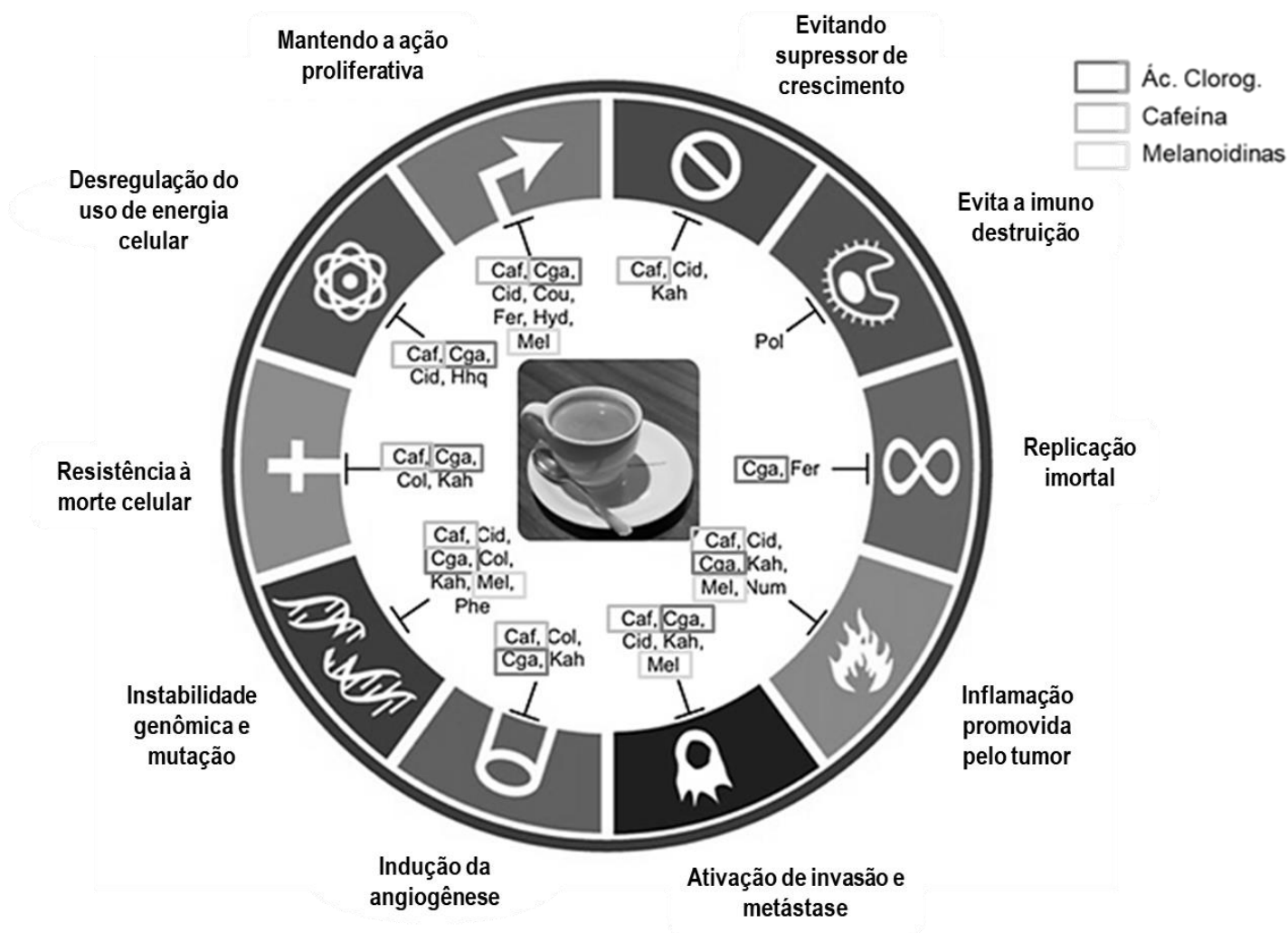
As taxas de mortalidade por câncer na população mundial, ultrapassaram as taxas de morte por doenças cardiovasculares que, há décadas atrás, era o tipo de doença crônica que mais provocava mortes (WHO, 2017). No mundo, espera-se para 2030, 27 milhões de casos novos de câncer (WHO, 2015). No Brasil, estimam-se 600 mil casos novos e homens devem apresentar mais casos de câncer que mulheres. São esperados 300 mil novos casos, onde 68 mil corresponderão ao tumor de próstata, o tipo de câncer mais incidente em homens há anos (INCA, 2018).

A indústria farmacêutica e organizações de saúde em todo o mundo têm somado esforços para compreender melhor o câncer. Devido seu crescente e expressivo acometimento na população mundial, estudos para a melhora de tratamentos e medicamentos que promovam a cura de pacientes acometidos vêm sendo desenvolvidos. No sentido de prevenção e ação coadjuvante em tratamentos farmacológicos, os alimentos são comumente vistos como aliados.

Compostos naturais obtidos na dieta humana normal são motivos de pesquisa recente para novos medicamentos antitumorais, uma vez que esses compostos raramente apresentam efeitos colaterais graves e, no entanto, atuam de forma eficiente em uma ampla gama de objetivos moleculares envolvidos na tumorigênese (HADDAD *et al.*, 2013).

Dentre os compostos naturais com efeitos positivos na modificação do avanço esperado em células tumorais, os encontrados na bebida de café têm sido associados a efeitos eficazes em diferentes estágios de surgimento de células tumorais malignas, implantação do tumor, nutrição da massa tumoral e evolução da doença a estágios e metástase como mostrado na Figura 3.





**Figura 3:** Compostos naturais do café visando as características de células tumorais e resumo dos efeitos anticancerígenos de algumas moléculas presentes no café. Fonte: Adaptado de GAASCHT *et al.* (2015).

A relação café-câncer parece ser dependente do tipo de tecido e grau evolutivo do tumor. A literatura mostra que para tumor de endométrio e cólon há um consenso nos benefícios do uso de café por pacientes em tratamento, assim como prevenção desses tipos de tumor (HASHIBE *et al.*, 2015; UCCELLA *et al.*, 2013). No caso do tumor de cólon é possível que o consumo regular de café possa impedir a reincidência da neoplasia (GUERCIO *et al.*, 2015).

Alguns estudos mostram a relação entre o consumo de café e câncer de próstata. Como por exemplo, os resultados encontrados por LI *et al.* (2013), que avaliou os efeitos do café em humanos, e sugeriu associação positiva entre o consumo de café e diminuição do risco de câncer

de próstata, contribuindo então para a prevenção do câncer de próstata. Se assemelhando aos resultados obtidos por DISCACCIATI *et al.* (2013), que encontrou efeito protetor em tumor de próstata avançado, principalmente em pacientes com sobrepeso e obesidade, assim como SHAFIQUE *et al.* (2012) e as meta-análises elaboradas por LU *et al.* (2014), BAO (2014) e ZHONG *et al.* (2014).

Contudo, BOSIRE *et al.* (2013) apesar de não desconsiderar modesta redução que ocorreu em seu estudo, não encontrou forte correlação entre o consumo de café e estágios avançados de tumor de próstata.

SAROBO *et al.* (2012), mostraram o efeito da ingestão crônica de cafeína na puberdade, que aumentou a sinalização androgênica e a proliferação de células hiperplásicas benignas de próstata de ratos. Para TVERDAL (2015), há consideráveis evidências epidemiológicas sobre o efeito preventivo do consumo de café e câncer de próstata. Entretanto, os mecanismos pelos quais essa proteção ocorre, ainda não são bem esclarecidos. Pela primeira vez KOLBERG *et al.* (2016), sugeriram ligações mecanicistas entre consumo de café e de câncer de próstata em um modelo experimental do rato. Além disso, o estudo também mostrou que o café é capaz de modular a transcrição de genes relacionados a câncer de próstata e inflamação.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar a influência de extratos de café solúvel verde e submetido a diferentes tipos de torra em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver extratos solúveis de café robusta por diferentes processos e secagem;
- Avaliar cor, atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais dos extratos produzidos;
- Quantificar cafeína e açúcares nos extratos solúveis de café verde e torrado em diferentes graus de torra;
- Caracterizar o perfil de aminoácidos dos extratos submetidos a diferentes processamentos;
- Avaliar o efeito da incubação dos extratos em função da concentração, sobre a proliferação e viabilidade celular de linhagem de células de próstata;
- Avaliar os efeitos dos extratos de café sobre o ciclo celular e apoptose em culturas de células da linhagem de próstata.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 MATÉRIA PRIMA E PRODUÇÃO DOS EXTRATOS

Os grãos de café utilizados para este estudo foram da variedade *Coffea canephora* (Conilon/Robusta), adquiridos em Colatina, Espírito Santo, Brasil, transportadas ao Rio de Janeiro e armazenadas no Laboratório de Diagnostico Molecular e Micologia da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos, RJ, onde foram preparadas.

Para o preparo dos extratos solúveis de café, os grãos foram manualmente selecionados para a retirada de sujidades e grãos imperfeitos. Os grãos selecionados foram divididos em quatro partes: uma para os extratos de café verde e as demais partes foram divididos em torra clara (12 minutos a 230°C), média (14 minutos a 240°C) e escura (15 minutos a 245°C), realizadas no torrador Gene café® e classificados de acordo com a Escala Agtron (PORTO, 2015), como mostra a Figura 4. Após atingirem temperatura ambiente foram moídos em moedor caseiro (Cusinart®) e moedor analítico (IKA®). Já os grãos verdes, foram moídos diretamente em moedor analítico (IKA®). Para padronização dos grãos de café, pó de café verde e torrados foram peneirados em peneira analítica (710 µM), no intuito de nivelar a superfície de contato das amostras no momento da extração.

As extrações foram realizadas em água quente (90-95°C) e otimizadas em ultrassom com sonotrodo e banho de gelo para estabilidade da temperatura no processo de extração. Foram realizadas análises de °Brix e sólidos totais (g/100g) nas soluções de extração para delinear a viabilidade de secagem por liofilizador e *spray drier*. Para a obtenção do pó do extrato de café, o conteúdo da extração foi centrifugado (Zentrifugen-Hettich®) e reservado o sobrenadante que sofreu secagem por liofilizador (secagem a frio) e *spray drier* (secagem a quente). Após a secagem, os extratos de café solúvel foram armazenados individualmente em sacos laminados tipo zip e acondicionados a -80°C até a utilização nas análises.



**Figura 4:** Grãos e pó de café verde, torrados, tempo e temperatura segundo cada tipo de torra.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS EXTRATOS

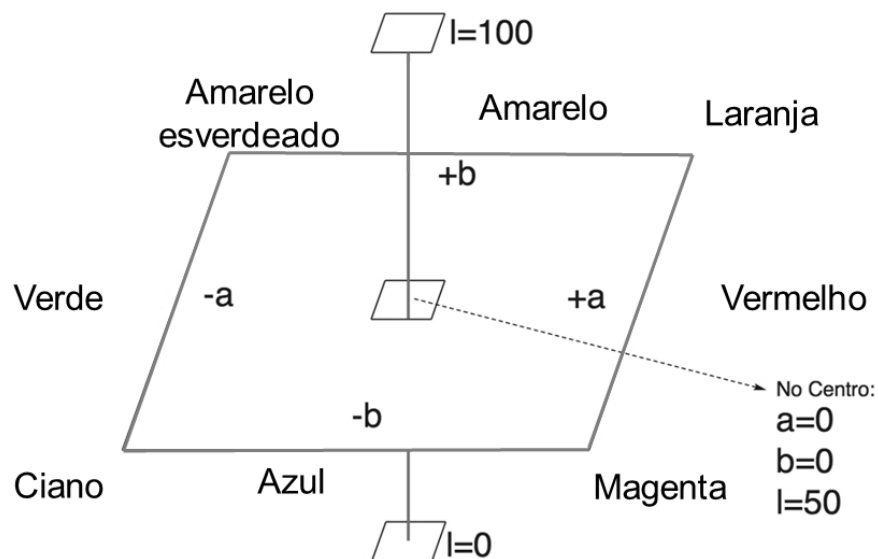
### 4.2.1 Quantificação de sólidos totais e sólidos solúveis dos extratos aquosos de café

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

### 4.2.2 Coordenadas colorimétricas dos extratos secos de café

A colorimetria das amostras foi realizada em espectrofotômetro de bancada CM-5, Konica Minolta (Sensing Américas, INC) mediante a prévia calibração automática. As medições foram realizadas por refletância, em placa de Petri de vidro, sendo realizada completa higienização do referido utensílio a cada medição. Foram realizadas três leituras de cada amostra seca (LV, LC, LM, LE, SV, SC, SM e SE). A expressão dos dados foi baseada na escala CIELAB, como mostra

a Figura 5, usando as coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . Os resultados foram apresentados em média e desvio padrão.



**Figura 5:** Representação espacial de cores na escala de cores CIELAB.

Fonte: Adaptado de Google imagens.

#### 4.2.3 Caracterização dos extratos secos por HPLC

##### 4.2.3.1 Determinação de cafeína

A análise da cafeína nas amostras foi feita segundo descrito por CASTRO e MELLO (2002). As amostras foram extraídas, com a fase móvel por 10 minutos em ultrassom, avolumadas e filtradas (FHUP 0,45  $\mu\text{m}$ ), e injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). O sistema usado é composto por bomba isocrática, coluna de fase reversa (Waters Nova Pack  $\text{C}_{18}$  - 5  $\mu\text{m}$  (150 mm x 4,6 mm)), detetor de UV no comprimento de onda de 280 nm e um sistema de integração, aquisição e processamento dos dados. Fase móvel foi composta de 10% acetonitrila (MeCN) e 0,5% de ácido acético (HOAc) com tempo de retenção para o composto de 8.3 minutos.

#### 4.2.3.2 *Determinação de açúcares*

Na determinação de açúcares foi utilizado o método com separação da amostra por HPLC com coluna de Fase Normal (amino) e fase móvel acetonitrila/água, utilizando detector de índice de refração e quantificação por padronização externa (MACRAE, 1988).

#### 4.2.3.3 *Determinação de aminoácidos*

Para a determinação de aminoácidos nas amostras, houve extração dos aminoácidos da matriz da amostra por hidrólise ácida e posterior derivatização utilizando o reagente 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato. A separação cromatográfica foi realizada em coluna C<sub>18</sub> e gradiente com tampão acetato de sódio e acetonitrila. A detecção foi realizada por fluorescência e a quantificação por padronização externa excetuando-se aminoácidos sulfurados e triptofano (AOAC, 2000; AOAC *et al.*, 1995).

### 4.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A análise de fenólicos totais foi realizada de acordo com o ensaio de Folin-Ciocalteu, SINGLETON, *et al.* (1965). As alíquotas extratos solúveis de café robusta (10, 15 e 20 µL) foram elaboradas a partir de uma solução inicial (25mg/10mL); foram pipetadas e ficaram ao abrigo da luz por duas horas, e após esse período, foi realizada leitura em espectrofotômetro na absorvância de 750nm. Os resultados foram comparados com a reação do padrão ácido gálico e expresso em mg de ácido gálico (GAE)/100g de amostra.

### 4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da atividade antioxidante dos extratos liofilizados e atomizados de café robusta verde e torrado foi avaliada através de quatro métodos distintos: DPPH, ABTS,

capacidade ferri-redutora (FRAP) e a capacidade de absorção de radical de oxigênio (ORAC), partindo da mesma solução inicial usada para a análise de compostos fenólicos totais. Todas as diluições foram consideradas para a realização dos cálculos.

#### 4.4.1 Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995). O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical livre estável, que aceita um elétron ou um radical de hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e desta forma, é reduzido na presença de um antioxidante. Para avaliação da atividade antioxidante, os extratos solúveis de café robusta foram adicionados para reação com o radical estável DPPH em uma solução de metanol. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 515 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio arrancado de um composto antioxidante. A redução do radical do DPPH foi medida através da leitura da absorbância a 515 nm em 30 min de reação. Os volumes de extrato utilizados foram de 1µL, 2µL, 2,5µL partindo da solução inicial. A atividade antioxidante foi expressa de acordo com a equação descrita abaixo:

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

#### 4.4.2 Análise de atividade antioxidante total pela captura do radical ABTS<sup>•+</sup>

O método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin 6-sulfônico) foi utilizado como descrito por RUFINO *et al.* (2007). O radical ABTS<sup>•+</sup> é formado por uma reação química com persulfato de potássio em uma relação estequiométrica de 1:0,5. Uma vez formado, o radical ABTS<sup>•+</sup> é diluído em etanol até obter uma medida de absorbância de 0,70 (± 0,02) a um comprimento de onda de 734 nm. Alíquotas com três diferentes volumes (1µL, 2µL, 2,5µL), partindo da solução inicial dos extratos de café, foram utilizadas de modo a restar um volume final de 3mL em cada leitura. As leituras foram realizadas em triplicata. Uma curva padrão com soluções de Trolox e outra curva com ácido ascórbico foram produzidas. Os resultados foram



expressos em TEAC, atividade antioxidante equivalente ao Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) em  $\mu\text{mol}$  de trolox por grama de amostra.

#### 4.4.3 Análise determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do Ferro (FRAP)

A atividade antioxidante pelo método de FRAP foi determinada de acordo com RUFINO *et al.* (2006). Este método baseia-se na quantificação da capacidade de redução do complexo Fe (III)-TPTZ (cor azul clara) para o complexo Fe(II)-TPTZ (cor azul escura) em meio ácido, reação esta que é desencadeada pelo antioxidante presente na amostra. O método consistiu em adicionar os seguintes volumes:  $1\mu\text{L}$ ,  $2\mu\text{L}$ ,  $2,5\mu\text{L}$  dos extratos de café e quantificar, em  $2,7\text{mL}$  de reagente FRAP somado a volumes de água destilada para que fosse colocado  $90\mu\text{L}$  (amostra + água). Após 30 min em banho-maria é efetuada a leitura de absorvância a  $595\text{nm}$ . A curva padrão foi produzida com uma solução de sulfato ferroso e os resultados. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de sulfato ferroso por grama de amostra. A curva padrão foi produzida com uma solução de sulfato ferroso com concentrações conhecidas.

#### 4.4.4 Ensaio de atividade antioxidante pelo método de ORAC

Este ensaio avalia a atividade antioxidante através da inibição da oxidação, induzida pelo radical peroxil, por transferência de átomos de hidrogênio (PRIOR *et al.*, 2003). Foram pesados  $0,005\text{g}$  de cada extrato solúvel de café e avolumados em balão volumétrico de  $5\text{ml}$  com tampão fosfato e 10% de DMSO. Para a análise,  $20\mu\text{L}$  das amostras em diferentes diluições (1:100, 1:150, 1:200 e 1:400), foram adicionadas nos poços com  $80\mu\text{L}$  do tampão fosfato que foram adicionados a microplaca, todos em duplicata. Em todos os poços, em seguida, foi adicionado  $120\mu\text{L}$  da solução de fluoresceína e  $60\mu\text{L}$  de AAPH (2,2'-azinobis (2amidino)propano) dihidroclorato). A microplaca contendo as amostras e o tampão fosfato, foram incubados por 3 horas a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  no fluorímetro (SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices), onde também foi realizada a leitura.

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

#### 4.5 ATIVIDADE *IN VITRO* DOS EXTRATOS DE CAFÉ

##### 4.5.1 Cultura de células e protocolo de tratamento

A linhagem celular de carcinoma de próstata humano (DU-145) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Brasil). A cultura de células foi realizada em frascos próprios para cultura, em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1 % de penicilina e estreptomicina (PS), 2g/L tampão HEPES, pH 7,4, sob atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. As células quando em confluência de 70-80%, sofriam processo de tripsinização, cerca de duas vezes por semana. Para cada experimento, as células foram semeadas em concentrações que variavam de  $2.0 \times 10^5$  a  $4.0 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, em placas de 6 e 96 poços, durante as análises de ciclo celular, apoptose e viabilidade celular, respectivamente. Foi incluído um grupo controle para todas as amostras analisadas, sendo tratadas somente com próprio meio de manutenção da cultura, isento das amostras. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.5.2 Viabilidade celular pelo método de MTT

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio), conforme descrito por MOSMANN (1983). Plaqueou-se  $2,0 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços. 24 horas depois, foram incubadas com os extratos de café solúvel em diferentes concentrações que variavam de 25  $\mu\text{M}$  a 5000  $\mu\text{M}$ . Após 24 horas de incubação, o tratamento foi cortado e adicionado 100 $\mu\text{L}$  de meio de cultivo padrão. Também foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de MTT (5g/L) em cada poço. Depois de 4 h de incubação com o sal de MTT, em estufa, foram recolhidos 80 $\mu\text{L}$  dos poços, adicionado e 50  $\mu\text{L}$ /poço de dimetilsulfóxido (DMSO), a fim de dissolver o produto gerado. Após 15 minutos em estufa, a placa foi lida em leitor de microplacas (POLARIS, CELER<sup>®</sup>) a 570nm. A taxa de inibição da proliferação celular (CPIR) foi calculada com base na fórmula:

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

#### 4.5.3 Viabilidade celular em hemocitômetro

Para a realização dos experimentos de citotoxicidade, bem como para a manutenção das células viáveis em estoque, foi estimado o número de células viáveis com o uso do corante azul de Tripán. O fundamento desse método baseia-se na observação onde células viáveis são impermeáveis ao corante, e as células não viáveis apresentam permeabilidade. Devido a formação de poros na membrana, que permitem a penetração do corante, que colore as células não viáveis de azul (KONOPKA *et al.*, 1996). Para a realização do ensaio, as células foram plaqueadas e 24 horas após o plaqueamento, o meio foi retirado de manutenção foi trocado por meio contendo os extratos em diferentes concentrações (2500  $\mu\text{M}$  e 5000  $\mu\text{M}$ ) e os controles foram mantidos com meio de cultivo padrão. Posteriormente a essa etapa, as células foram tripsinizadas e adicionou-se à suspensão de células o corante azul de tripan na proporção 1:3, sendo as células viáveis contadas na câmara de Neubauer.

#### 4.5.4 Avaliação da influência dos extratos no ciclo celular

A análise de ciclo celular foi realizada utilizando ensaio com iodeto de propídio (PI). As células foram ressuspensas em 500  $\mu$ L de solução fria de Vindelov (VINDELOV, 1977), contendo 0,1% de Triton X-100, 0,1% de RNase e 50  $\mu$ g/mL iodeto de propídio (Sigma). Após incubação por 15 minutos, a suspensão celular foi analisada para conteúdo de DNA em citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences), após a aquisição de 20000 eventos. As proporções relativas de células com conteúdo de DNA indicativo de apoptose ( $< 2n$ ), fase  $G_0$ - $G_1$  ( $2n$ ), fase S (fase  $> 2n$ , porém  $< 4n$ ), e fase  $G_2$ /M ( $4n$ ) foram adquiridos e analisados utilizando FlowJo. A percentagem de população de células em uma fase específica foi estimada com FlowJo software de análise versão 1.2.

#### 4.5.5 Avaliação da influência dos extratos na morte celular

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

### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram apresentados em médias  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes feitos em triplicata ( $n=6$ ). Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EXTRAÇÃO E PRODUÇÃO DOS EXTRATOS SOLÚVEIS DE CAFÉ

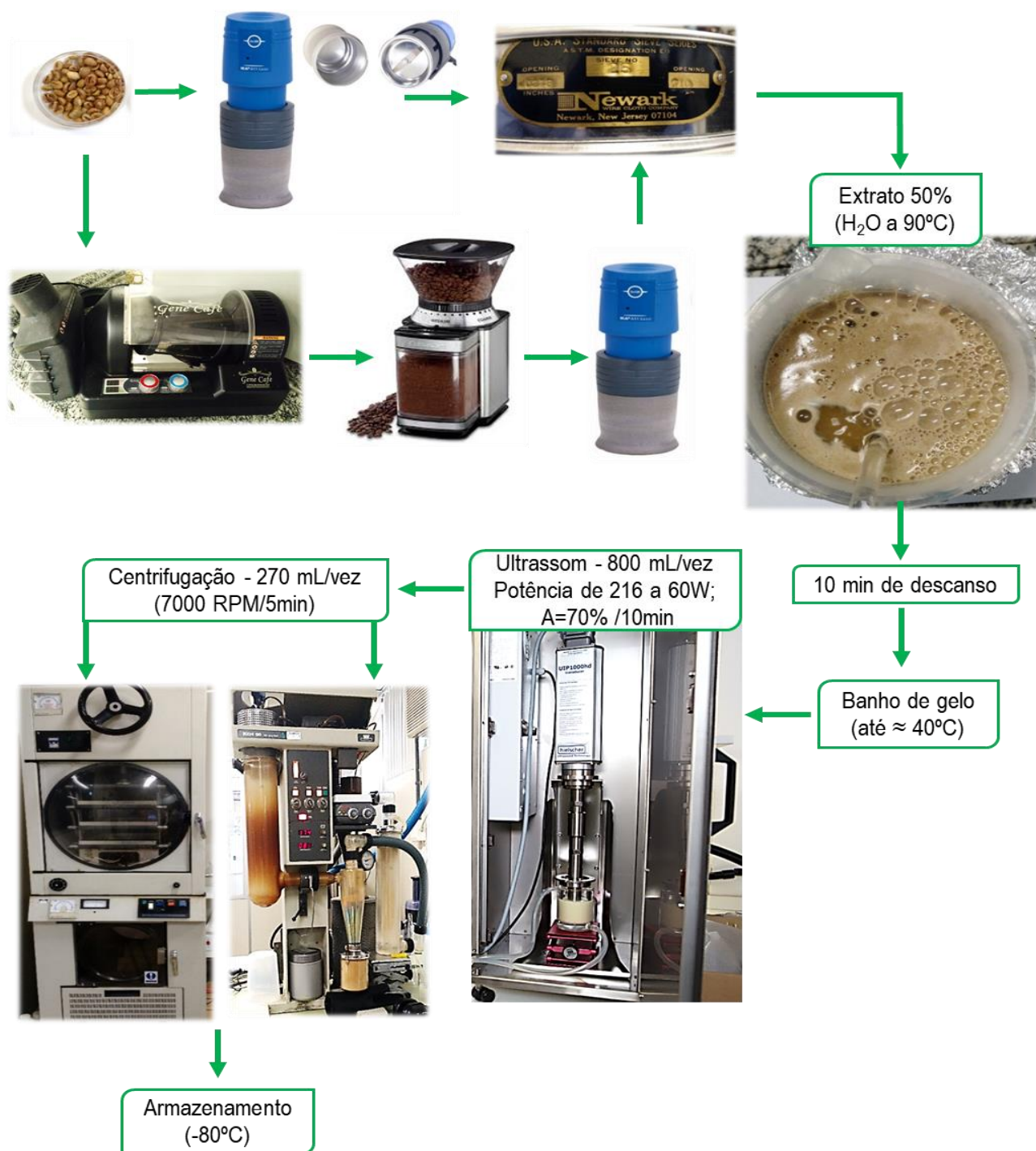
Inicialmente foram realizadas análises prévias com diversos tipos de extração, no intuito de encontrar uma solução mais próxima à solução de café normalmente ingerida pela população, e que fosse viável seguir até o fim deste estudo. A cada etapa inicial foi utilizado o café robusta verde moído e realizado análises de sólidos solúveis com refratômetro digital de bolso (PAL-1, Atago), compostos fenólicos totais e uma análise para verificação do potencial antioxidante. Após essas análises, foi determinado a percentagem da solução utilizada, na concentração de 50% (m/v), no sentido de viabilizar o fluxograma de produção dos extratos solúveis de café, principalmente na etapa de secagem das amostras.

O processo escolhido, como mostra na Figura 6, foi realizado em água aquecida e com imersão do pó de café bruto. Após a homogeneização, a solução foi deixada em repouso por dez minutos para que perdesse temperatura. Em seguida, a solução foi levada a banho de gelo e transportada, abrigado da luz, até o local com o ultrassom de alta potência com sonotrodo (UIP1000hdT generator, Hielscher®), utilizado para otimizar o processo de extração. Os extratos passaram pelo processo de extração em 800 mL/vez para respeitar a capacidade do equipamento utilizado, nas potências de 216 a 60W, 70% A por 10 minutos. Ao final do tempo de extração, houve a captação do sobrenadante por centrifugação e cada amostra de café foi dividida em duas partes, onde uma foi destinada para secagem por liofilização e a outra por *spray-drier*.

Para a secagem por liofilização, os sobrenadantes oriundos do processo de extração do pó de café, foram congelados em porções de 150 mL e posteriormente liofilizados (Edwards, Pirani 50l) por 36 horas. Na secagem por *spray drier*, as amostras ainda líquidas foram submetidas ao atomizador (BUCHI 190®) em porções de 800mL, com temperatura de entrada de 180°C, vazão de processo de 0,96L/h, temperatura de saída em torno de 88-90°C e tempo médio de processo de 55 minutos sob vácuo de -60 mBar.

Os extratos de café solúvel foram armazenados à -80°C, com ausência de luz e sob vácuo, até o momento das análises descritas. Durante todo transporte e uso dos extratos, foram levados

em consideração cuidado na cadeia de frio, tempo mínimo de exposição a luz e entrada de ar nas embalagens.



**Figura 6:** Fluxograma de produção da torra, processo de obtenção pó de café bruto, extração aquosa e secagem por liofilização e atomização.

## 5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

### 5.2.1 Teor de sólidos nos extratos aquosos de café

Os resultados do teor de sólidos solúveis dos extratos brutos de café robusta elaborados a 50% (m/v), logo após a centrifugação e antes da secagem, são apresentados na Tabela 3. Os valores variaram entre 8,62 e 6,16 g/100g sólidos solúveis por extrato seco e 7,33 e 10,47 °brix, nas amostras de café em diferentes níveis de torra, sendo o maior teor de sólidos encontrado nas amostras de café verde e torra clara.

**Tabela 3:** Conteúdo de sólidos totais das soluções de café a 50% medidos através de quantificação de extrato seco e ° Brix.

Café Robusta	Extrato seco(g/100g)	°Brix
Café verde	8,62±0,02 <sup>a</sup>	10,43±0,06 <sup>a</sup>
Torra Clara	7,36±0,02 <sup>b</sup>	8,80±0,00 <sup>b</sup>
Torra Média	6,17±0,02 <sup>c</sup>	7,33±0,06 <sup>c</sup>
Torra Escura	6,84±0,05 <sup>d</sup>	7,97±0,12 <sup>d</sup>

\*\*Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (p <0,05).

### 5.2.2 Colorimetria dos extratos solúveis atomizados e liofilizados

A análise colorimétrica (Tabela 4) mostrou que a cor dos extratos foi diferente de acordo com o grau de torrefação e o tipo de secagem. O extrato com maior intensidade de luz para o branco foi o extrato obtido por *spray-drier* nas amostras de café verde (SV). De modo geral, extratos secos por atomização apresentaram valores mais elevados de L\*. A secagem por *spray drier*, também proporcionou extratos com tons mais amarelados e avermelhados, com exceção da amostra SV que teve tonalidade esverdeada. Os extratos liofilizados foram os que apresentaram

menor intensidade de luz, sendo mais escuros. Conforme era esperado, os extratos de café verde tiveram tonalidade esverdeada e maior intensidade de luz. Já as amostras torradas, cor amarelo-avermelhadas e mais escuras.

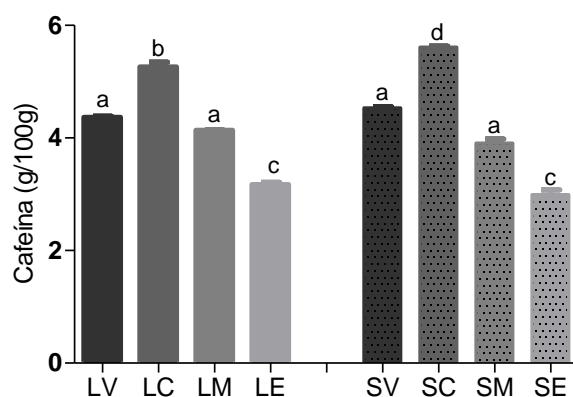
**Tabela 4:** Coordenadas de cor (L\*a\* b\*) dos extratos secos de café robusta.

	LV	LC	LM	LE	SV	SC	SM	SE
<b>Coordenada</b>								
L*	58,92±0,06 <sup>a</sup>	28,64±0,00 <sup>b</sup>	27,22±0,01 <sup>c</sup>	27,38±0,01 <sup>d</sup>	73,49±0,03 <sup>e</sup>	54,23±0,01 <sup>f</sup>	51,15±0,01 <sup>g</sup>	57,52±0,01 <sup>h</sup>
a*	2,65±0,02 <sup>a</sup>	9,06±0,01 <sup>b</sup>	7,54±0,01 <sup>c</sup>	7,38±0,01 <sup>d</sup>	0,35±0,01 <sup>e</sup>	8,95±0,01 <sup>f</sup>	8,24±0,01 <sup>g</sup>	8,70±0,01 <sup>h</sup>
b*	17,80±0,04 <sup>a</sup>	11,04±0,01 <sup>b</sup>	9,89±0,01 <sup>c</sup>	9,81±0,01 <sup>d</sup>	15,90±0,01 <sup>e</sup>	20,86±0,00 <sup>f</sup>	19,11±0,01 <sup>g</sup>	18,76±0,01 <sup>h</sup>

\*\* Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (p <0,05). Legendas: SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torra clara, SM: *spray drier* torra média, SE: *spray drier* torra escura.

### 5.2.3 Quantificação da cafeína por HPLC

O teor de cafeína encontrado nas amostras é mostrado na Figura 7. Quando observado o conteúdo de cafeína das amostras de café solúvel, notou-se que as amostras que apresentaram o teor mais elevado foram SC (5,61±0,021g/100g) e LC (5,26±0,12g/100g). Já as amostras de café verde e torra média não apresentaram diferença significativa (p>0,05), quando comparado o tipo de secagem, sendo o teor médio de cafeína nesses extratos de 4,24±0,03g/100g. O menor teor de cafeína foi visto nas amostras de café de torra escuras com valores médios de 3,08±0,13g/100g.



**Figura 7:** Conteúdo de cafeína nos extratos de café secos por liofilizador e *spray drier*.

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (p <0,05). Legendas: LV: liofilizado verde, LC: liofilizado torra clara, LM: liofilizado torra média, LE: liofilizado torra escura, SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torra clara, SM: *spray drier* torra média, SE: *spray drier* torra escura.



#### 5.2.4 Quantificação dos açúcares por HPLC

Os açúcares sacarose e frutose foram identificados e quantificados apenas nas amostras de café verde, não sendo observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os processos de secagem por liofilização ou atomização, como demonstrado na Tabela 5. O açúcar mais abundante foi a sacarose representando em média 89,61% do total de açúcares dos extratos solúveis de café verde. Nas demais amostras, não foram encontrados níveis detectáveis de açúcares, uma vez que durante o processo de torrefação estes são degradados em outros compostos.

**Tabela 5:** Conteúdo de açúcares nos extratos de café verde e torrado secos por liofilizador e *spray drier*.

	LV	LC	LM	LE	SV	SC	SM	SE
<b>Açúcares (g/100g)</b>								
Sacarose	11,57±0,08 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	11,77±0,16 <sup>a</sup>	ND	ND	ND
Frutose	1,37±0,06 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	1,33±0,03 <sup>a</sup>	ND	ND	ND

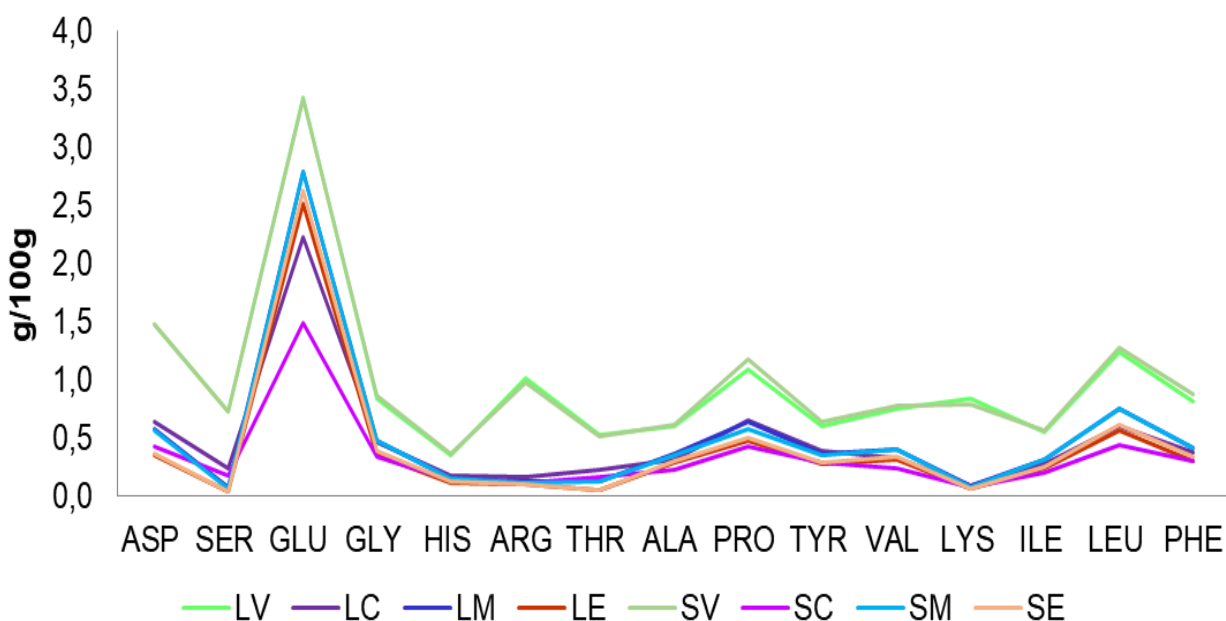
\*ND: não detectado. \*\* Os resultados estão expressos com média ± desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Legendas: LV: liofilizado verde, LC: liofilizado torra clara, LM: liofilizado torra média, LE: liofilizado torra escura SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torra clara, SM: *spray drier* torra média, SE: *spray drier* torra escura.

#### 5.2.5 Quantificação dos aminoácidos por HPLC

Os aminoácidos foram encontrados em proporções semelhantes em ambos os processos de secagem, não sendo possível detectar diferenças entre o processo realizado a frio e a quente, como mostra a Figura 8. Esses compostos aminados apresentaram-se mais conservados nos extratos de café verde e de modo geral, quanto maior a temperatura de torrefação, menor o conteúdo de aminoácidos encontrado.

Todavia, ao avaliar os valores individuais de cada aminoácido, pode-se observar alterações particulares de cada extrato em relação a cada aminoácido. A asparagina é um aminoácido importante numa matriz rica em carboidratos, como o café, e as amostras que apresentaram valores mais baixos foram as amostras LE e SE. Ao comparar os valores médios do café de torra escura (0,36±0,01g %) e café verde (1,48±0,00 g %) é observada uma redução de 24% de asparagina após o processo de torrefação. Os extratos de torra escura, também apresentaram redução de 48 a 39% para os aminoácidos glicina, tirosina, isoleucina e leucina.

Quando foi comparado o conteúdo de aminoácidos dos extratos solúveis de café verde com os extratos torrados, a histidina e fenilalanina foram os aminoácidos mais reduzidos nos extratos de café torrado, com redução máxima de 33 e 34%, respectivamente. A amostra de torra clara atomizada (SC), apresentou reduções semelhantes à de torra escura, com diminuição expressiva para alguns aminoácidos quando comparado às amostras verdes, destacando a redução do conteúdo de glutamina (44%), alanina (38%), valina (31%).



**Figura 8:** Conteúdo de aminoácidos nos extratos de café verde e torrado secos por liofilização e *spray drier*. liofilizado verde, LC: liofilizado torra clara, LM: liofilizado torra média, LE: liofilizado torra escura, SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torra clara, SM: *spray drier* torra média, SE: *spray drier* torra escura.

A Tabela 6 apresenta os valores individuais de aminoácidos nos diferentes extratos de café produzidos. Os teores máximos e mínimos de glutamina apresentaram variação de  $3,42 \pm 0,23$ g a  $1,49 \pm 0,21$ g % de aminoácido, encontrados no café verde liofilizado e na amostra de torra clara atomizada, respectivamente. A histidina foi o aminoácido encontrado nos extratos de café verde (LV e SV) em menor concentração, com valor médio de  $0,36 \pm 0,01$ g %. No entanto, esse resultado foi diferente para os extratos de café torrados. Nas amostras de café torrado escuro (LE e SE) o aminoácido em menor quantidade encontrada foi a serina, com valor médio de  $0,045 \pm 0,01$ g %, entre as secagens.

**Tabela 6:** Conteúdo de aminoácidos nos extratos de café verde e torrado secos por liofilização e *spray drier*.

	LV	LC	LM	LE	SV	SC	SM	SE
<b>Aminoácidos</b> (g/100g)								
Asparagina	1,48±0,11 <sup>a</sup>	0,63±0,01 <sup>b</sup>	0,59±0,02 <sup>b</sup>	0,36±0,06 <sup>c</sup>	1,48±0,10 <sup>a</sup>	0,43±0,05 <sup>b,c</sup>	0,57±0,04 <sup>b,c</sup>	0,37±0,06 <sup>c</sup>
Serina	0,73±0,04 <sup>a</sup>	0,25±0,01 <sup>b</sup>	0,08±0,01 <sup>c</sup>	0,05±0,01 <sup>c</sup>	0,74±0,01 <sup>a</sup>	0,18±0,02 <sup>d</sup>	0,07±0,00 <sup>c</sup>	0,04±0,00 <sup>c</sup>
Glutamina	3,42±0,23 <sup>a</sup>	2,23±0,01 <sup>b</sup>	2,79±0,10 <sup>a,b</sup>	2,51±0,40 <sup>a,b</sup>	3,41±0,20 <sup>a</sup>	1,49±0,21 <sup>a,b</sup>	2,79±0,26 <sup>d</sup>	2,63±0,42 <sup>e</sup>
Glicina	0,85±0,05 <sup>a</sup>	0,47±0,01 <sup>b</sup>	0,48±0,01 <sup>b</sup>	0,35±0,06 <sup>b</sup>	0,87±0,03 <sup>a</sup>	0,34±0,04 <sup>b</sup>	0,48±0,06 <sup>b</sup>	0,39±0,04 <sup>b</sup>
Histidina	0,35±0,00 <sup>a</sup>	0,18±0,01 <sup>b</sup>	0,16±0,00 <sup>b</sup>	0,12±0,00 <sup>c</sup>	0,37±0,1 <sup>a</sup>	0,15±0,01 <sup>b,c</sup>	0,15±0,01 <sup>b,c</sup>	0,13±0,01 <sup>c</sup>
Arginina	1,01±0,04 <sup>a</sup>	0,17±0,01 <sup>b</sup>	0,14±0,01 <sup>b</sup>	0,11±0,00 <sup>b</sup>	0,99±0,02 <sup>a</sup>	0,12±0,00 <sup>b</sup>	0,12±0,01 <sup>b</sup>	0,10±0,01 <sup>b</sup>
Treonina	0,53±0,04 <sup>a</sup>	0,23±0,01 <sup>b</sup>	0,14±0,01 <sup>c</sup>	0,06±0,00 <sup>d</sup>	0,52±0,00 <sup>a</sup>	0,17±0,01 <sup>b,c</sup>	0,13±0,01 <sup>c</sup>	0,06±0,00 <sup>d</sup>
Alanina	0,61±0,042 <sup>a</sup>	0,32±0,01 <sup>b</sup>	0,37±0,01 <sup>b</sup>	0,29±0,04 <sup>b</sup>	0,62±0,03 <sup>a</sup>	0,19±0,04 <sup>b,c</sup>	0,23±0,16 <sup>b</sup>	0,30±0,04 <sup>b</sup>
Prolina	1,10±0,05 <sup>a</sup>	0,65±0,01 <sup>b</sup>	0,64±0,01 <sup>b</sup>	0,49±0,08 <sup>b</sup>	1,18±0,03 <sup>a</sup>	0,43±0,01 <sup>b,c</sup>	0,59±0,71 <sup>b</sup>	0,50±0,07 <sup>b</sup>
Tirosina	0,61±0,06 <sup>a</sup>	0,40±0,01 <sup>b</sup>	0,37±0,01 <sup>b</sup>	0,29±0,01 <sup>b,c</sup>	0,65±0,02 <sup>a</sup>	0,29 ±0,03 <sup>a</sup>	0,35±0,01 <sup>b</sup>	0,29±0,01 <sup>b,c</sup>
Valina	0,76±0,04 <sup>a</sup>	0,33±0,01 <sup>b</sup>	0,41±0,01 <sup>b</sup>	0,32±0,04 <sup>b</sup>	0,78±0,01 <sup>a</sup>	0,24±0,03 <sup>b,c</sup>	0,40±0,04 <sup>b</sup>	0,35±0,05 <sup>b</sup>
Lisina	0,85±0,05 <sup>a</sup>	0,09±0,00 <sup>b</sup>	0,09±0,00 <sup>b</sup>	0,07±0,00 <sup>b</sup>	0,79±0,06 <sup>a</sup>	0,08±0,00 <sup>b</sup>	0,08±0,00 <sup>b</sup>	0,07±0,00 <sup>b</sup>
Isoleucina	0,55±0,03 <sup>a</sup>	0,28±0,01 <sup>b</sup>	0,32±0,01 <sup>b</sup>	0,24±0,03 <sup>b</sup>	0,57±0,01 <sup>a</sup>	0,21±0,02 <sup>b,c</sup>	0,32±0,04 <sup>b</sup>	0,26±0,03 <sup>b</sup>
Leucina	1,24±0,07 <sup>a</sup>	0,61±0,01 <sup>b</sup>	0,75±0,01 <sup>b</sup>	0,57±0,08 <sup>b</sup>	1,28±0,03 <sup>a</sup>	0,44±0,06 <sup>b,c</sup>	0,76±0,11 <sup>b</sup>	0,62±0,08 <sup>b</sup>
Fenilalanina	0,82±0,04 <sup>a</sup>	0,39±0,01 <sup>b</sup>	0,42±0,01 <sup>b</sup>	0,30±0,03 <sup>b</sup>	0,89±0,02 <sup>a</sup>	0,31±0,44 <sup>b</sup>	0,42±0,05 <sup>b</sup>	0,34±0,03 <sup>b</sup>

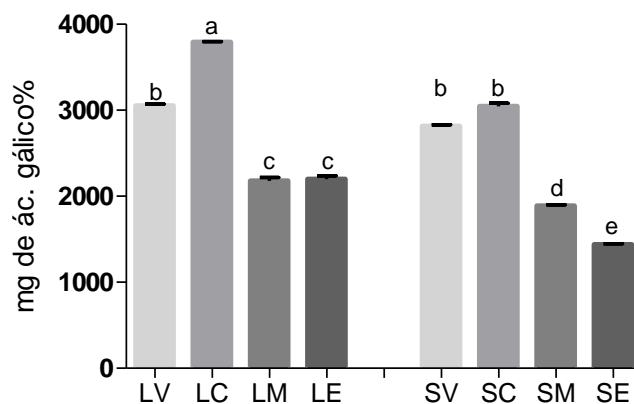
\* Os resultados estão expressos com média ± desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Legendas: LV: liofilizado verde, LC: liofilizado torra clara, LM: liofilizado torra média, LE: liofilizado torra escura SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torra clara, SM: *spray drier* torra média, SE: *spray drier* torra escura.

### 5.3 TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS NOS EXTRATOS SECOS DE CAFÉ

Na análise do teor de compostos fenólicos totais, observou-se que os valores maiores foram referentes às amostras LC, LV, SV e SC (figura 9). O valor médio apresentado pelo extrato liofilizado claro foi de  $3791,98 \pm 13,41$ g ácido gálico/g de amostra.

As amostras LV, SV e SC não apresentaram diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ), com valores respectivos de  $3051,15 \pm 33,68$ ,  $2816,60 \pm 19,19$  e  $3046,40 \pm 63,96$  g equivalentes de ácido gálico/g. Já as amostras SM e SE, exibiram o menor teor de compostos fenólicos com

valor médio de  $1663,05 \pm 21,07$  g equivalentes de ácido gálico/g. Os extratos LM e LE não mostraram diferença estatística entre si ( $p > 0,05$ ) e apresentaram valor médio de  $2187,93 \pm 70,83$  g de ácido gálico/g de amostra.



**Figura 9:** Conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos solúveis de café robusta.

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Legendas: LV: liofilizado verde, LC: liofilizado torra clara, LM: liofilizado torra média, LE: liofilizado torra escura, escura SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torra clara, SM: *spray drier* torra média, SE: *spray drier* torra escura.

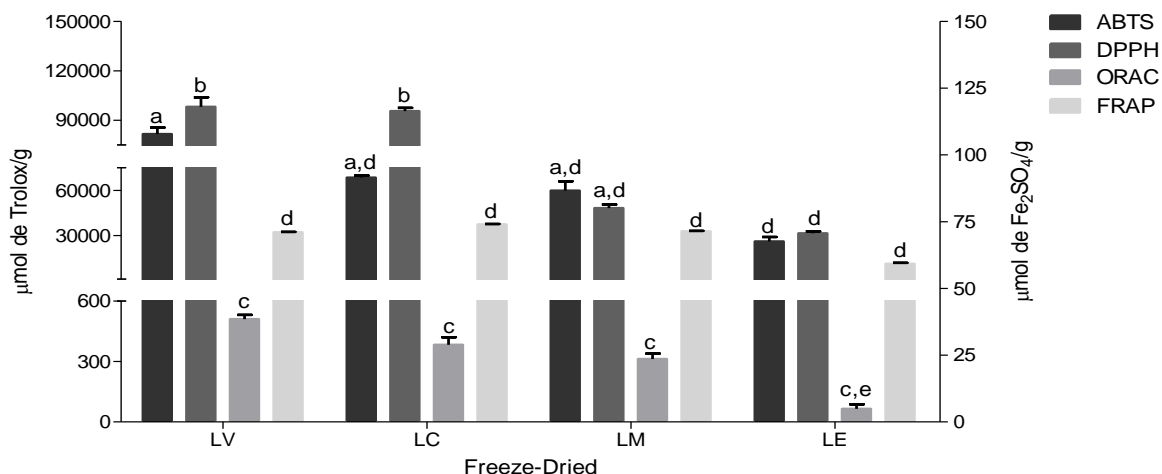
#### 5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS SECOS DE CAFÉ

A atividade antioxidante dos extratos de café liofilizados e atomizados foi avaliada por quatro diferentes métodos (DPPH, ABTS, FRAP e ORAC). Os resultados dos ensaios estão apresentados nas Figuras 10 para os extratos liofilizados e Figura 11 para a atividade antioxidante dos extratos atomizados. Nos quatro métodos em estudo, os extratos solúveis foram analisados em concentrações que variaram de 5, 10 e 12,5 mg/L, quando considerado todas as diluições efetuadas para viabilização das análises. Os ensaios foram conduzidos em triplicata até o término da reação.

As análises realizadas pelos métodos de DPPH, ABTS monitoraram de forma distinta a determinação da atividade antioxidante nos extratos de café quando comparadas com as metodologias de ORAC e FRAP, não sendo possível observar nesta última análise, diferença significativa entre as amostras independente se torra ou secagem.

Os extratos liofilizados de café robusta, verde e claro (Figura 10), apresentaram maior

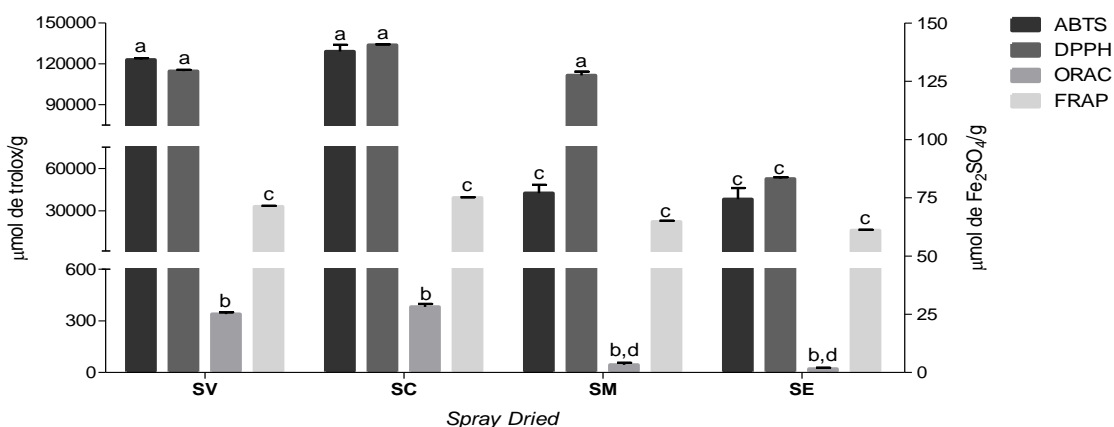
potencial antioxidante nas análises de DPPH e ABTS. O liofilizado verde apresentou valor máximo de  $98142,83 \pm 9983,69$  mmol de equivalentes de Trolox/g de amostra.



**Figura 10:** Potencial Antioxidante dos extratos de café solúveis secos por Liofilização pelas metodologias antioxidantes de ABTS, DPPH, ORAC e FRAP.

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Legendas: LV: liofilizado verde, LC: liofilizado torra clara, LM: liofilizado torra média, LE: liofilizado torra escura, escura SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torra clara, SM: *spray drier* torra média, SE: *spray drier* torra escura.

Os extratos secos por atomização, claro e verde (Figura 11), nas análises de ABTS e DPPH, apresentaram maior potencial e atomizado claro em DPPH. Pela análise de ORAC observou-se menor atividade antioxidante em todas as análises, sendo mais reduzido nas amostras secas por pulverização com valor mínimo de  $20,90 \pm 6,73$  para a amostra SE.



**Figura 11:** Potencial Antioxidante dos extratos de café solúveis secos por atomização pelas metodologias antioxidantes de ABTS, DPPH, ORAC e FRAP.

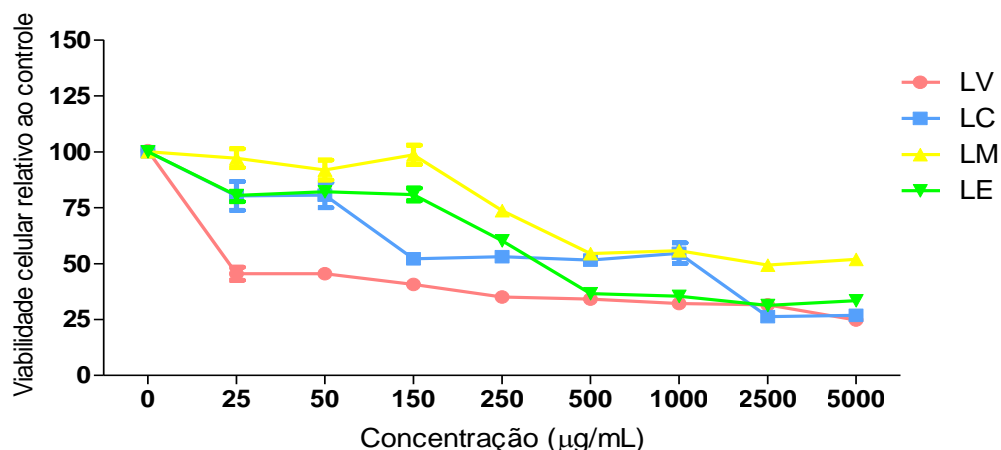
Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Legendas: LV: liofilizado verde, LC: liofilizado torra clara, LM: liofilizado torra média, LE: liofilizado torra escura, escura SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torra clara, SM: *spray drier* torra média, SE: *spray drier* torra escura.

## 5.5 EFEITOS DOS EXTRATOS SECOS DE CAFÉ EM LINHAGEM DE CÂNCER DE PRÓSTATA

### 5.5.1 Efeito dos extratos secos de café na viabilidade celular

O efeito citotóxico dos extratos aquosos de café robusta na linhagem de tumor maligno de próstata humana, foi medido através da metabolização do sal de MTT em formazan. Nessa análise, viu-se que, em doses baixas de extrato de café verde, ocorre expressiva redução da capacidade metabólica das células tumorais e número de células vivas. Os extratos secos por liofilização foram capazes de reduzir a viabilidade celular substancialmente. No entanto, o extrato médio (LM) apresentou menor inibição % da viabilidade. Este ensaio mostrou que a partir de 500µg/mL, todos os extratos utilizados nos experimentos apresentaram redução de 50% ou mais, na viabilidade das células tumorais de próstata tratadas.

Os extratos que induziram maior modificação na atividade celular foram os extratos liofilizados verde e torrado claro, com redução de até 75% e 73% da atividade metabólicas da linhagem de próstata testada (Figura 12), respectivamente.

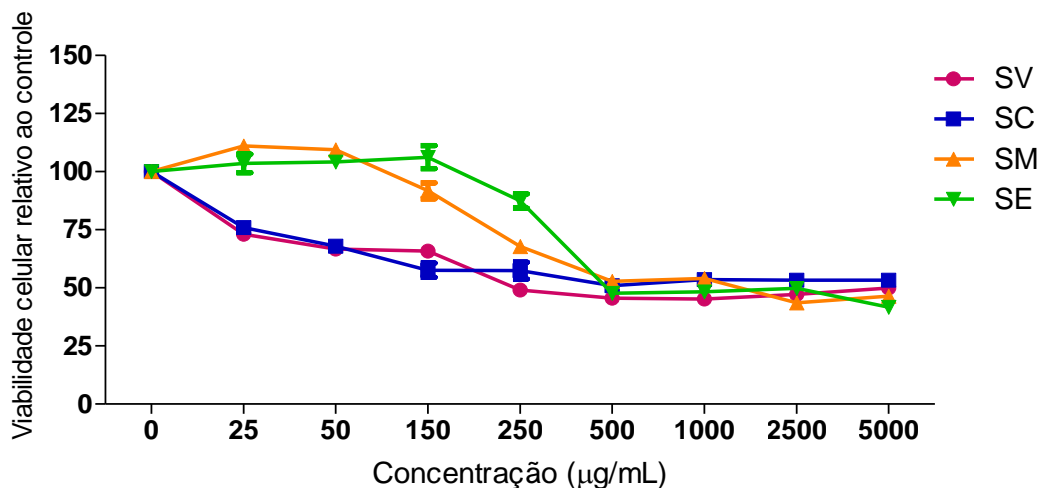


**Figura 12:** Percentual de inibição de viabilidade relativo ao controle de linhagem celular tumoral prostática (DU-145) pelo método de MTT, após 24 horas de tratamento com os extratos de café Liofilizados (25-5000 µg/mL).

Legendas: LV: liofilizado verde, LC: liofilizado torrado claro, LM: liofilizado torrado média, LE: liofilizado torrado escuro, SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torrado claro, SM: *spray drier* torrado média, SE: *spray drier* torrado escuro.

O desempenho médio dos extratos de café secos por atomização (Figura 13), na análise de MTT, foi de 53% de redução da atividade. Foi possível observar ainda que em doses menores os extratos de torrada média e escura foram capazes induzirem aumento do proliferativo das células de

tumor de próstata e somente após a concentração de 250  $\mu$ M todos os extratos secos por *spray drier* iniciaram redução da atividade celular.

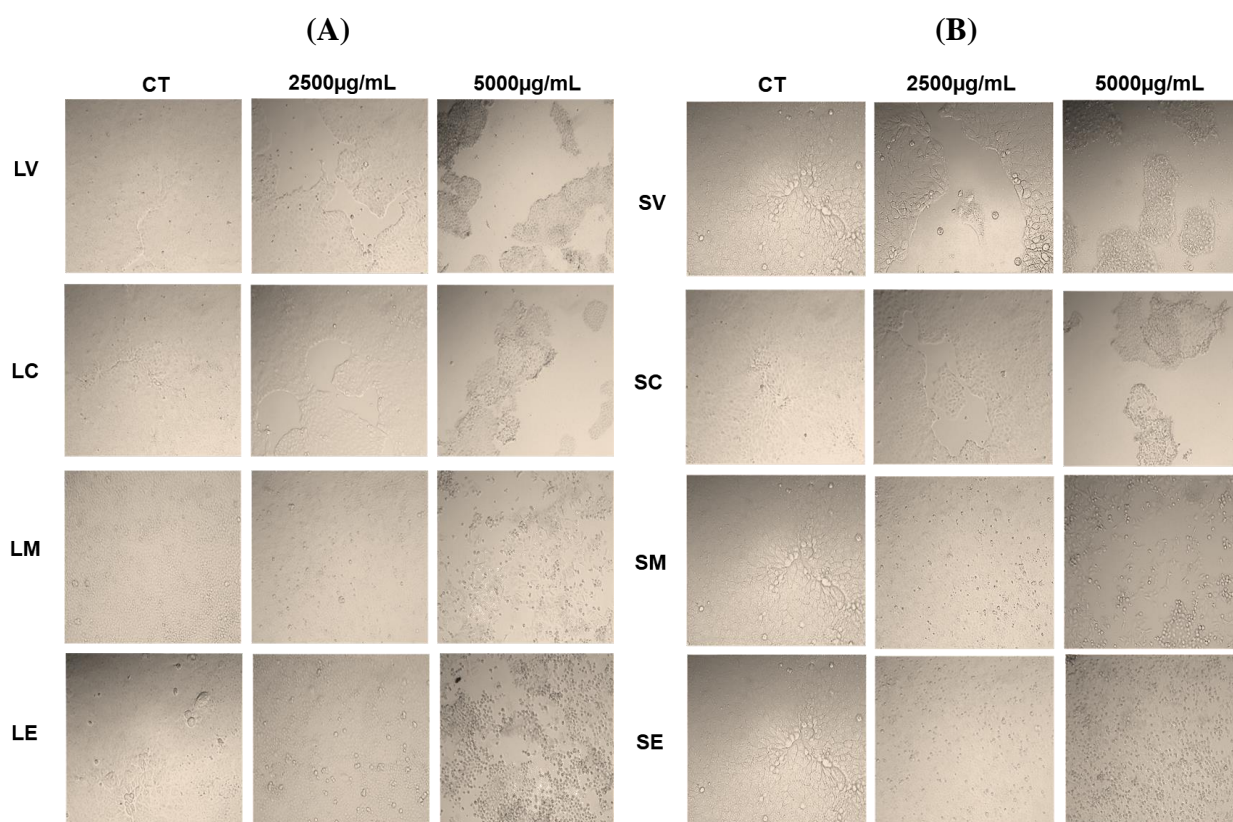


**Figura 13:** Percentual de inibição de viabilidade relativo ao controle de linhagem celular tumoral prostática (DU-145) pelo método de MTT, após 24 horas de tratamento com os extratos de café atomizados (25-5000  $\mu$ g/mL).

Legendas: LV: liofilizado verde, LC: liofilizado torra clara, LM: liofilizado torra média, LE: liofilizado torra escura, escura, SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torra clara, SM: *spray drier* torra média, SE: *spray drier* torra escura.

### 5.5.2 Efeito dos extratos de café na quantificação celular em hemocitômetro

A análise de quantificação celular pela câmara de Neubauer, com o intuito de avaliar o potencial inibitório dos pós de café robusta solúveis nas células de adenocarcinoma de próstata humano, (DU-145) foram incubadas com concentrações de 2500  $\mu$ M e 5000  $\mu$ M. Essas concentrações foram estabelecidas a partir das concentrações prévias utilizadas no ensaio de MTT, que apresentaram redução da viabilidade celular quando comparadas ao controle. A contagem das células foi realizada 24 horas após o início da incubação (Figura 14).

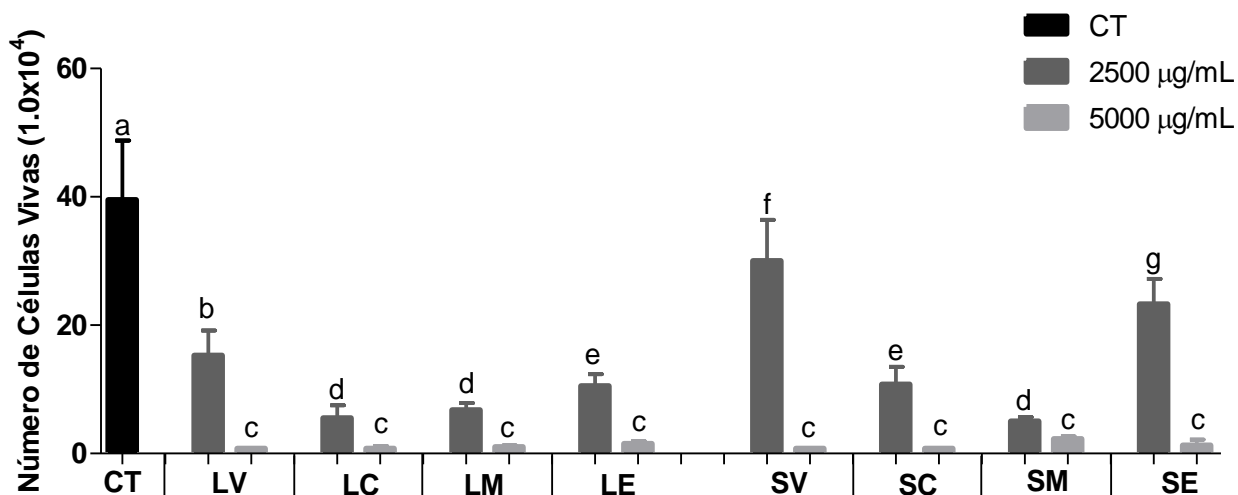


**Figura 14:** Efeito dos extratos de café verde e torrado secos por liofilização (A) e atomização (B) na viabilidade de linhagem celular de câncer de próstata (DU-145) controle e tratamentos 2500 e 5000 µg/mL visualizadas em microscópio óptico.

Legendas: LV: liofilizado verde, LC: liofilizado torra clara, LM: liofilizado torra média, LE: liofilizado torra escura, SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torra clara, SM: *spray drier* torra média, SE: *spray drier* torra escura.

As células tratadas com os extratos solúveis de café robusta apresentaram percentual de redução da viabilidade celular na concentração de 2500 µM com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados às células controle, exceto nas amostras SV e SE seguindo o padrão encontrado na análise de atividade metabólica pela técnica de transformação do sal de MTT em cristais de formazan. Na concentração de 5000 µM, as células tratadas com os extratos de café apresentaram o maior percentual de inibição (Figura 15). Ao comprar as secagens, os extratos de produzidos por baixa temperatura e vácuo, a liofilização, foram capazes de reduzir mais o número de células viáveis.





**Figura 15:** Efeito dos extratos de café liofilizado e atomizado sobre a viabilidade celular da linhagem DU-145 após 24 horas de tratamento. Células visualizadas em microscópio óptico não tratadas (CT) e pós-tratamento nas concentrações de 2500 e 5000µg/mL.

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Legendas: LV: liofilizado verde, LC: liofilizado torra clara, LM: liofilizado torra média, LE: liofilizado torra escura, SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torra clara, SM: *spray drier* torra média, SE: *spray drier* torra escura.

### 5.5.3 Efeito dos extratos secos de café no ciclo celular

A Tabela 7 mostra os resultados encontrados na análise de ciclo celular da linhagem DU-145, tratada com extratos solúveis de café robusta. Foi possível notar diferentes modificações no padrão de fases e essas diferenças ocorreram também entre as células tratadas com amostras semelhantes, mas com secagem e/ou concentração distintas. De modo geral, nas células tratadas com amostras liofilizadas, houve aumento no número de células na fase  $G_0/G_1$  e diminuição de  $G_2/M$ , quando comparadas com os respectivos controles. No entanto, na amostra escura e liofilizada, por exemplo, não pode ser observado considerada modificação no padrão do ciclo celular. Já nas amostras secas por *spray drier* não foi possível constatar um padrão de modificação do ciclo celular da linhagem de próstata. A amostra atomizada verde apresentou diminuição de  $G_0/G_1$  e aumento em  $G_2/M$  diferente do encontrado nas amostras liofilizadas. Já as amostras de torra média e escura, seguram o mesmo padrão anterior, onde ocorreu aumento do número de células nas fases  $G_0/G_1$  e redução de  $G_2/M$ . Na amostra atomizada clara não houve diferença em relação ao controle em  $G_0/G_1$ , mas houve aumento em  $G_2/M$ .

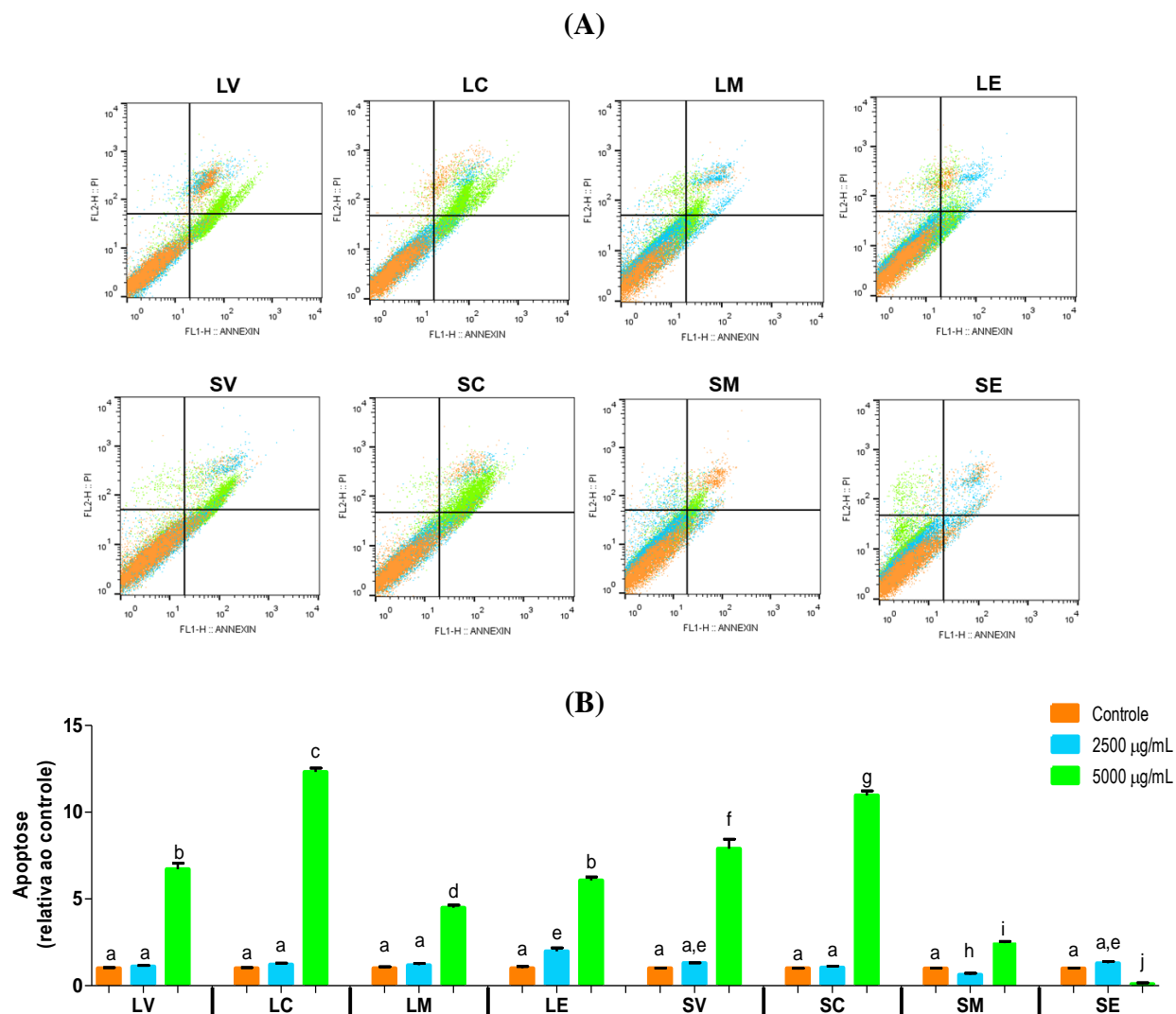
**Tabela 7:** Efeito dos extratos de café secos por liofilização e *spray drier* (2500 e 5000µg/mL) na progressão do ciclo celular em linhagem celular de tumor prostático maligno (DU-145) após 24 horas de tratamento.

Fase do ciclo celular				Fase do ciclo celular					
Amostra		CT	2500 µM	5000 µM	Amostra		CT	2500 µM	5000 µM
LV	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	17,90±1,07 <sup>a</sup>	24,14±0,21 <sup>b</sup>	40,65±0,53 <sup>c</sup>	SV	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	34,37±5,22 <sup>a</sup>	24,83±4,62 <sup>a</sup>	19,61±4,18 <sup>b</sup>
	S	6,99±0,07 <sup>a</sup>	7,16±0,90 <sup>a</sup>	9,27±3,96 <sup>a</sup>		S	10,56±0,76 <sup>a</sup>	8,74±0,57 <sup>b</sup>	2,41±0,60 <sup>c</sup>
	G <sub>2</sub> /M	74,26±1,05 <sup>a</sup>	67,63±1,11 <sup>b</sup>	48,45±3,39 <sup>c</sup>		G <sub>2</sub> /M	54,62±4,56 <sup>a</sup>	66,00±4,63 <sup>a</sup>	77,86±4,48 <sup>b</sup>
LC	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	24,50±2,83 <sup>a</sup>	23,04±2,42 <sup>a</sup>	38,37±7,37 <sup>b</sup>	SC	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	61,49±10,90 <sup>a</sup>	65,06±1,15 <sup>a</sup>	52,06±3,69 <sup>a</sup>
	S	6,83±0,33 <sup>a</sup>	5,85±0,57 <sup>a</sup>	3,65±0,40 <sup>b</sup>		S	12,36±4,93 <sup>a</sup>	8,05±1,21 <sup>a</sup>	10,47±0,64 <sup>a</sup>
	G <sub>2</sub> /M	67,83±3,27 <sup>a</sup>	70,38±2,04 <sup>a</sup>	57,35±7,03 <sup>a,b</sup>		G <sub>2</sub> /M	24,99±7,03 <sup>a</sup>	25,82±2,41 <sup>a</sup>	36,45±4,30 <sup>a,b</sup>
LM	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	59,27±2,04 <sup>a</sup>	71,79±1,39 <sup>b</sup>	85,20±3,25 <sup>c</sup>	SM	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	54,26±0,24 <sup>a</sup>	22,32±3,71 <sup>b</sup>	70,37±7,13 <sup>c</sup>
	S	5,65±1,35 <sup>a</sup>	4,74±0,97 <sup>a</sup>	2,89±0,46 <sup>a</sup>		S	7,02±0,33 <sup>a</sup>	3,85±0,41 <sup>a</sup>	11,50±1,87 <sup>b</sup>
	G <sub>2</sub> /M	34,25±0,96 <sup>a</sup>	22,38±2,15 <sup>b</sup>	10,98±3,15 <sup>c</sup>		G <sub>2</sub> /M	37,51±0,42 <sup>a</sup>	72,62±2,65 <sup>b</sup>	18,94±3,08 <sup>c</sup>
LE	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	51,13±0,11 <sup>a</sup>	50,95±7,97 <sup>a</sup>	39,73±3,10 <sup>a,b</sup>	SE	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	56,23±2,78 <sup>a</sup>	65,07±1,06 <sup>b</sup>	82,96±0,70 <sup>c</sup>
	S	6,21±0,04 <sup>a</sup>	5,60±0,43 <sup>a</sup>	11,05±0,36 <sup>b</sup>		S	3,98±0,25 <sup>a</sup>	7,21±1,66 <sup>b</sup>	3,72±0,20 <sup>a</sup>
	G <sub>2</sub> /M	41,81±0,08 <sup>a</sup>	42,56±7,66 <sup>a</sup>	48,30±2,64 <sup>a</sup>		G <sub>2</sub> /M	38,33±2,88 <sup>a</sup>	27,02±1,23 <sup>b</sup>	12,90±0,50 <sup>c</sup>

\*Os resultados são expressos em percentual de células totais. Os dados são representados em valores médios ± DP de experimentos em triplicata. Teste de Tukey, diferentes letras no mesmo atributo e extração significam que as amostras são diferentes e letras iguais, amostras iguais. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (p <0,05). Legendas: LV: liofilizado verde, LC: liofilizado torra clara, LM: liofilizado torra média, LE: liofilizado torra escura, SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torra clara, SM: *spray drier* torra média, SE: *spray drier* torra escura.

#### 5.5.4 Efeito dos extratos secos de café na morte celular

No ensaio de apoptose, as células tratadas com os extratos solúveis de café mostraram um deslocamento de populações para o quadrante superior esquerdo do gráfico, como pode ser observado na Figura 16 (A); que representam as células não apoptóticas e não viáveis. Da mesma maneira que também houve deslocamento para os quadrantes inferior e superior direito, que representam as populações de células em apoptose inicial e em apoptose tardia ou necrose. Maior indução de apoptose aconteceu nas células tratadas com a concentração de 5000 µg/mL (Figura 15 B). Entretanto, as células tratadas os extratos médio e escuro apresentaram baixa capacidade de modificação das populações celulares, sendo que as tratadas com os extratos secos por *spray drier* não tiveram população apoptótica menor que a observada no controle.



**Figura 16:** (A) Efeito dos extratos de café secos por liofilização e *spray drier* por citometria de fluxo com os marcadores Anexina-V FITC e Iodeto de Propídio (PI). (B) Percentual de aumento de apoptose relativa ao controle na linhagem de câncer de próstata (DU-145), após 24 horas de tratamento com extratos de café secos por liofilização e *spray drier*. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Legendas: LV: liofilizado verde, LC: liofilizado torra clara, LM: liofilizado torra média, LE: liofilizado torra escura, SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torra clara, SM: *spray drier* torra média, SE: *spray drier* torra escura.

Na Tabela 8, pode ser observada a quantidade de células para o controle e as amostras tratadas com as concentrações de 2500 e 5000 $\mu$ M referente a cada fase de morte celular. Foi possível encontrar um aumento médio de 11% de apoptose relativa ao controle das células tratadas com as amostras de torra clara na maior concentração utilizada.

**Tabela 8:** Efeito dos extratos de café secos por liofilização e *spray drier* (2500 e 5000µg/mL) na programação de morte das células da linhagem câncer de próstata humano após 24 horas de tratamento.

Amostra	Fase de morte celular	CT	2500 µM	5000 µM	Amostra	Fase de morte celular	CT	2500 µM	5000 µM
LV	Células viáveis (Anexina V- /PI-)	86,40±0,57 <sup>a</sup>	85,35±0,92 <sup>a</sup>	20,29±16,14 <sup>b</sup>	SV	Células viáveis (Anexina V- /PI-)	90,05±1,77 <sup>a</sup>	87,25±0,64 <sup>a</sup>	15,70±0,85 <sup>a</sup>
	Apoptose recente (Anexina V+ /PI-)	1,90±0,33 <sup>a</sup>	1,82±0,45 <sup>a</sup>	55,30±4,95 <sup>b</sup>		Apoptose recente (Anexina V+ /PI-)	5,73±0,47 <sup>a</sup>	5,88±1,53 <sup>a</sup>	30,85±10,82 <sup>a</sup>
	Apoptose tardia/Necrose (Anexina V+ /PI+)	11,25±0,92 <sup>a</sup>	12,40±1,41 <sup>a</sup>	23,55±11,53 <sup>a</sup>		Apoptose tardia/Necrose (Anexina V+ /PI+)	3,90±1,36 <sup>a</sup>	6,72±2,21 <sup>a</sup>	52,05±10,25 <sup>b</sup>
	Céls. Não apoptóticas (Anexina V- /PI+)	0,46±0,00 <sup>a</sup>	0,42±0,14 <sup>a</sup>	0,83±0,35 <sup>a</sup>		Céls. Não apoptóticas (Anexina V- /PI+)	0,33±0,08 <sup>a</sup>	0,19±0,05 <sup>a</sup>	1,37±0,32 <sup>b</sup>
LC	Células viáveis (Anexina V- /PI-)	92,35±0,78 <sup>a</sup>	92,85±0,64 <sup>a</sup>	14,76±4,72 <sup>b</sup>	SC	Células viáveis (Anexina V- /PI-)	91,85±2,19 <sup>a</sup>	92,20±0,42 <sup>a</sup>	9,74±1,36 <sup>b</sup>
	Apoptose recente (Anexina V+ /PI-)	1,40±0,31 <sup>a</sup>	4,27±0,04 <sup>a</sup>	39,43±1,45 <sup>b</sup>		Apoptose recente (Anexina V+ /PI-)	3,33±1,68 <sup>a</sup>	4,23±0,49 <sup>a</sup>	26,95±4,45 <sup>b</sup>
	Apoptose tardia/Necrose (Anexina V+ /PI+)	5,33±1,06 <sup>a</sup>	2,84±0,74 <sup>a</sup>	44,40±3,68 <sup>b</sup>		Apoptose tardia/Necrose (Anexina V+ /PI+)	4,56±0,55 <sup>a</sup>	3,41±0,04 <sup>a</sup>	62,25±3,18 <sup>b</sup>
	Céls. Não apoptóticas (Anexina V- /PI+)	0,88±0,58 <sup>a</sup>	0,07±0,04 <sup>a</sup>	1,45±0,39 <sup>a</sup>		Céls. Não apoptóticas (Anexina V- /PI+)	0,27±0,05 <sup>a</sup>	0,14±0,01 <sup>a</sup>	1,05±0,10 <sup>a</sup>
LM	Células viáveis (Anexina V- /PI-)	95,17±1,03 <sup>a</sup>	90,43±1,21 <sup>a</sup>	69,35±5,57 <sup>b</sup>	SM	Células viáveis (Anexina V- /PI-)	89,48±1,07 <sup>a</sup>	92,15±0,17 <sup>b</sup>	72,68±1,72 <sup>c</sup>
	Apoptose recente (Anexina V+ /PI-)	0,57±0,10 <sup>a</sup>	3,18±0,49 <sup>a</sup>	18,43±5,34 <sup>b</sup>		Apoptose recente (Anexina V+ /PI-)	2,22±0,17 <sup>a</sup>	3,25±0,38 <sup>a</sup>	14,50±0,38 <sup>b</sup>
	Apoptose tardia/Necrose (Anexina V+ /PI+)	3,10±0,95 <sup>a</sup>	5,35±1,06 <sup>b</sup>	8,61±1,20 <sup>c</sup>		Apoptose tardia/Necrose (Anexina V+ /PI+)	7,33±0,93 <sup>a</sup>	2,02±0,24 <sup>b</sup>	10,58±0,24 <sup>c</sup>
	Céls. Não apoptóticas (Anexina V- /PI+)	1,17±0,53 <sup>a</sup>	1,02±0,31 <sup>a</sup>	3,59±0,75 <sup>b</sup>		Céls. Não apoptóticas (Anexina V- /PI+)	0,97±0,12 <sup>a</sup>	2,59±0,02 <sup>b</sup>	2,25±0,36 <sup>b</sup>
LE	Células viáveis (Anexina V- /PI-)	90,38±4,42 <sup>a</sup>	89,60±0,42 <sup>a</sup>	74,35±3,47 <sup>b</sup>	SE	Células viáveis (Anexina V- /PI-)	93,63±0,38 <sup>a</sup>	90,48±0,94 <sup>a</sup>	96,58±0,05 <sup>a</sup>
	Apoptose recente (Anexina V+ /PI-)	1,60±1,03 <sup>a</sup>	3,73±0,18 <sup>a</sup>	18,45±2,24 <sup>b</sup>		Apoptose recente (Anexina V+ /PI-)	2,68±0,22 <sup>a</sup>	3,95±0,54 <sup>b</sup>	0,07±0,05 <sup>c</sup>
	Apoptose tardia/Necrose (Anexina V+ /PI+)	6,73±4,36 <sup>a</sup>	5,57±0,19 <sup>a</sup>	4,5±1,16 <sup>a</sup>		Apoptose tardia/Necrose (Anexina V+ /PI+)	3,06±0,15 <sup>a</sup>	4,21±0,84 <sup>a</sup>	0,08±0,03 <sup>b</sup>
	Céls. Não apoptóticas (Anexina V- /PI+)	1,34±0,96 <sup>a</sup>	1,12±0,00 <sup>a</sup>	2,65±0,25 <sup>b</sup>		Céls. Não apoptóticas (Anexina V- /PI+)	0,66±0,01 <sup>a</sup>	1,39±0,03 <sup>b</sup>	3,26±0,02 <sup>c</sup>

\*Os resultados são expressos em percentual de células totais. Os dados são representados em valores médios ± DP de experimentos em triplicata. Teste de Tukey, diferentes letras no mesmo atributo e extração significam que as amostras são diferentes e letras iguais, amostras iguais. Resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes apresentam diferença significativa. Os resultados foram comparados pelo teste One-way ANOVA, com pós-teste de Tukey (p <0,05). Legendas: LV: liofilizado verde, LC: liofilizado torra clara, LM: liofilizado torra média, LE: liofilizado torra escura, SV: *spray drier* verde, SC: *spray drier* torra clara, SM: *spray drier* torra média, SE: *spray drier* torra escura.

## 6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo principal a produção de extratos solúveis de café robusta verde e de diferentes tipos de torra para o esclarecimento das modificações nos compostos do café, quando submetidos ao processamento de torra somado a secagem. O *C.canephora* capixaba, é o café robusta brasileiro, com mais valor de mercado agregado e maior potencial para exportação (CETCAF - ABIC, 2014). O café escolhido para este estudo é a espécie de café menos explorada pela literatura científica, e também foi eleito o café mais refinado e positivamente qualificado segundo a ABIC.

O extrato final foi realizado com água quente a 50% (m/v) para que fosse viável a secagem dos extratos solúveis nos equipamentos de secagem, liofilizador e *spray drier*, também utilizados pela indústria de café solúvel. Os sólidos solúveis encontrados nos extratos aquosos elaborados, neste estudo, foram semelhantes ao descrito na literatura. Quando em processo industrial os grãos de café são extraídos a 180°C e 18 kg de pressão, onde se obtém cerca de 8 a 12° brix (REVISTA CAFEICULTURA, 2006). Neste estudo, os extratos foram elaborados sem a utilização de pressão e elevada temperatura e obtivemos 10,47°brix, 8,77°brix, 7,33°brix e 7,97°brix para os extratos de café robusta verde, torra clara, média e escura, respectivamente. O tempo de descanso do pó de café em água quente, conforme mencionado no fluxograma descrito na Figura 6, melhorou a capacidade de extração dos compostos do pó de café para a solução. Foi observado também, que o teor de solúveis modificou com o tipo de torra, uma vez que a torra representa carbonização total ou parcial de alguns compostos do café (HAY; HAY, 2016).

As torras elaboradas nesse estudo, seguiram a escala de Agron (PORTO, 2015) para obtenção do padrão de torra clara, média e escura. A definição de cor envolve percepção e subjetividade de interpretação. Por esta razão, foi utilizado também a escala CieLab uma vez que é utilizada pela indústria e em pesquisas científicas para padronizar a avaliação das cores. As amostras liofilizadas e atomizadas apresentaram configuração espacial na escala tridimensional CieLab distintas quando comparadas em relação à luminosidade, as amostras atomizadas foram as localizadas mais acima do gráfico, sendo estas amostras mais claras que as secas por liofilização. Assim como as amostras de café verde foram distintas das amostras torradas.

A medida do índice de refração em café para verificação do grau de torra é bem estabelecida, usual e pode ser eficiente por ser prática rápida e utilizar pouca amostra. Essa informação é útil para controle de qualidade e controle de processos na planta industrial de café (ZEFERINO *et al.*, 2010). A escala CieLab é amplamente utilizada por correlacionar consistentemente os valores de cor com a percepção visual. A quantificação é realizada em espectrofotômetros ou colorímetros, onde se mede a luz refletida dos objetos em cada comprimento de onda ou em faixas específicas, quantificando os dados espectrais para determinar as coordenadas de cor do objeto, no espaço de cor  $L^*a^*b^*$ , apresentando a informação em termos numéricos. As características universais de cores são baseadas em três aspectos principais: luminosidade ( $L^*$ ) para dizer se a amostra é clara ou escura, e as coordenadas  $a^*$  e  $b^*$  que se referem às cores primárias:  $-a^*$ : verde,  $+a^*$ : vermelho,  $-b^*$ : azul e  $+b^*$ : amarelo e os dados das amostras testadas são colocadas no gráfico de forma tridimensional (MANOJLOVIC *et al.*, 2015).

A quantificação dos açúcares e aminoácidos nos extratos solúveis de café foi realizada com a finalidade de caracterizar os extratos produzidos, segundo o uso desses componentes do café utilizados na reação de *Maillard* e produção de aroma. Os açúcares frutose e sacarose foram detectados nas amostras de café verde, esses açúcares são usados para formação de compostos nas reações de caramelização. O principal aminoácido complexado com esses açúcares presentes na matriz cafeica para a viabilização dessas reações é a asparagina, levando a formação de acrilamida através da formação da base de Schiff (HAMZALIOĞLU; GÖKMEN, 2018). Nas amostras estudadas, foi observado a utilização dos aminoácidos durante a torra e redução, quando comparadas com as amostras de café verde, não havendo diferença entre as diferentes secagens, mas redução do aminoácido relativa ao grau de torra. A reação de *Maillard*, que ocorre no café durante a torra, contribui para a qualidade final dos alimentos através de reações envolvendo açúcares redutores, grupos amino livres, intermediários, voláteis e produtos finais de reação *Maillard* (MRPs) ou produtos finais dietéticos de glicação avançada (d-AGEs) (TROISE *et al.*, 2018).

Apesar do café já ter sido considerado possivelmente cancerígeno para seres humanos pela IARC, devido aos produtos da pirólise do café como acrilamida, hidroximetilfurfural entre outros (IARC, 1991). Recentemente foi reconhecida a inadequação de evidência de

carcinogenicidade no consumo de café em geral; tendo em vista que o café apresenta efeito mais relevante com sua ação antioxidante que a ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), os principais contribuintes para o desenvolvimento do estresse oxidativo (LOOMIS *et al.*, 2016).

O processo de torra também reduziu o teor de cafeína nos extratos produzidos. LUDWIG *et al.* (2014b) mostraram que o conteúdo da cafeína em uma porção é altamente variável, dependendo do tipo de torrefação, método de fabricação e extração do café. Segundo CÉSAR *et al.* (2013) o grão de café robusta possui cerca de 2,5% de cafeína. VIGNOLI *et al.* (2014) encontraram 7,20 g/100 g em café robusta solúvel comercial. Os extratos de café robusta elaborados neste estudo, tiveram teor de 3 a 5,6g/100g, demonstrando uma extração eficaz dos compostos do café mesmo em condições de extração distintas às utilizadas na indústria de café solúvel (CAPRIOLI *et al.*, 2015). O teor de cafeína nas diferentes secagens só variou na amostra de café torrado claro, onde a amostra pulverizada apresentou maior concentração de cafeína. Esse alcaloide é o estimulante mais antigo e mais utilizado no mundo, e está presente no café, no chá, no guaraná (CASTRO; MELLO, 2002). Os efeitos antioxidante e quimiopreventivo (OLIVEIRA, 2007) da cafeína foram descritos na prevenção oxidativa do fígado de ratos, com ação semelhante à ação da glutathione. Apresentando efetiva inibição sobre a peroxidação lipídica, em baixas concentrações, contra as três espécies reativas de oxigênio, os radicais hidroxil (OH•), peróxido (ROO•) e oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (AZAM *et al.*, 2003; DEVASAGAYAM *et al.*, 1996).

Os compostos fenólicos, além de serem relatados como contribuintes do sabor e aroma característicos das bebidas de café são conhecidos em razão das propriedades fisiológicas e farmacológicas que conferem à saúde humana, como a atividade antioxidante. Entre os principais componentes da fração fenólica figuram os ácidos clorogênicos (CGA), com diversos isômeros, considerados os mais importantes e que se apresentam em maior quantidade nos grãos de café verde (ABRAHÃO *et al.*, 2010). Os ácidos clorogênicos (CGAs) representam mais de 98% do seu conteúdo fenólico total do café, enquanto os 2% restantes são compostos de alquilmtoxifenóis, alquifenóis, metoxifenóis e outros fenólicos como pirogalol, catecol e fenol (TRESSERRA-RIMBAU *et al.*, 2015).

Durante a secagem dos frutos de café, pode ocorrer degradação dos ácidos clorogênicos causada pela exposição ao sol; contudo, a etapa que causa maior modificação nas sementes é a torrefação, onde o café desenvolve característica organoléptica devido à formação de compostos

aromáticos. Esse processo é capaz de reduzir significativamente o teor total de ácidos clorogênicos dos grãos de café (BAGCHI; MORIYAMA; SWAROOP, 2017). TRUGO & MACRAE (1984), MOON *et al.* (2009) e NEBESNY & BUDRYN (2003) relataram que mais de 60% dos ácidos clorogênicos totais são perdidos durante a torrefação. Neste processo, os compostos fenólicos em grãos de café verde são parcialmente degradados e/ou ligados a estruturas de polímeros, variando de acordo com as condições de torrefação.

ABRAHÃO (2010) ao comparar café arábica verde e torrado, observou diferença entre processamentos, resultado similar ao apresentado nesse estudo. E a adição de uma variável a mais, a secagem, também interferiu no produto final. Neste caso, o extrato liofilizado torrado claro apresentou maior conteúdo total de compostos com ação antioxidante. Esse dado pode ser devido a quebra parcial dos ácidos clorogênicos, que ocorre durante a torra e tendo em vista que o processo de liofilização, tende a preservar os compostos do produto seco.

As atividades antiradical e antioxidante são formas distintas de um composto bioativo atuar no organismo: a atividade antiradical caracteriza a capacidade dos componentes para reagir com os radicais livres (em uma única reação de radicais livres), e a atividade antioxidante representa a capacidade de inibir o processo de oxidação, que geralmente envolve um conjunto de diferentes reações (TIRZITIS; BARTOSZ, 2010; YASHIN *et al.*, 2013). DAGLIA *et al.* (2004) demonstraram que as soluções de café verde e torrado tem uma atividade antiradical significativa contra os radicais livres de hidroxilo. Este efeito foi estudado tanto *in vitro* (utilizando o teste de desoxirribose) como *in vivo* em sistemas celulares biológicos (células IMR32).

Conforme mencionando anteriormente, o processo de torra modifica os compostos bioativos do café, reduzindo o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do café. Os resultados encontrados nas análises de DPPH e ABTS seguiram o descrito pela literatura, onde o café verde apresentou elevada capacidade antioxidante. Ao comparar a atividade antioxidante das amostras secas por processos diferentes, observou-se uma maior atividade nas amostras secas através da aplicação de elevadas temperaturas, o mesmo ocorreu no extrato liofilizado torrado claro; devido aos compostos fenólicos que são degradados, em outros compostos de potencial antioxidante, formados através da reação de *Maillard*, especialmente os redutores e os melanoidinas (BAUER *et al.*, 2016). A reação de *Maillard* é definida como uma reação química envolvendo a condensação entre um grupo carbonila de açúcares redutores, aldeídos ou cetonas e



um grupo amino de aminoácidos, proteínas ou qualquer composto nitrogenado (MAKHLOUF-GAFSI *et al.*, 2018).

Para as análises antioxidantes de redução do ferro e utilização do radical peroxil, não houve diferença entre as amostras testadas, provavelmente por falta de sensibilidade ou afinidade dos compostos da matriz estudada com os ensaios realizados. Autores relataram que metodologia de FRAP não é capaz de medir a atividade antioxidante em matrizes complexas e pelo fato de que nem todos os antioxidantes têm a capacidade específica de reduzir o ferro (APAK *et al.*, 2004; BAUER *et al.*, 2016; RUFINO *et al.*, 2006). As diferenças observadas em relação à atividade antioxidante dos extratos e os diferentes métodos de análise utilizados, podem ser atribuídas à estrutura química de cada composto, além das especificidades de cada método (DÁVALOS; GÓMEZ-CORDOVÉS; BARTOLOMÉ, 2004). Devido aos diversos tipos de radicais e aos diferentes sítios de ação dos compostos, é possível concluir que dificilmente haverá um único método capaz de representar de forma segura e precisa a verdadeira atividade antioxidante de um composto, alimento ou fluido biológico (MURAD, 2013).

Os CGAs são um grupo de ésteres formados por ácidos hidroxicinâmicos, tais como ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico, ligados ao ácido quínico em uma gama de estruturas conjugadas conhecidas como: ácidos cafeoilquínicos, ácidos feruloilquínicos e ácidos *p*-cumaroilquínico. Os isômeros destes compostos dependem do local de esterificação que pode ocorrer nas posições 1, 3, 4 ou 5 de ácido quínico. O CGA mais abundante e mais estudado é o ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) (ARAI *et al.*, 2015).

A biodisponibilidade dos ácidos hidroxicinâmicos presentes no café é comprovada em humanos. Também foi visto que estes são intensamente metabolizados no organismo, com concentrações plasmáticas médias de 15  $\mu\text{M}$  de CGA, 6  $\mu\text{M}$  de 5-CQA e 2  $\mu\text{M}$  de ácido cafeico (FARAH *et al.*, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2007; MURAD, 2013). Ao correlacionar uma xícara de café, de 50 mL, e as concentrações utilizadas para os estudos *in vitro*; notou-se que a concentração mais elevada (5000 $\mu\text{g/mL}$ ) é encontrada duzentas vezes para o extrato de café liofilizado e oitenta e oito vezes para o extrato de café pulverizado em uma porção de 50mL de café. Considerando que o consumo regular recomendado é de 3 a 4 xícaras de café por dia, podemos concluir que as concentrações eleitas nos experimentos são usuais, mesmo

considerando as perdas durante o processo de metabolização dessa classe de compostos fenólicos, aqui estudados.

O café apresenta constituintes quimiopreventivos que induzem apoptose e inibe a atividade da angiogênese (HAN *et al.*, 2016). SANTOS *et al.* (2016) mostrou que o ácido clorogênico é capaz de inibir a formação de compostos N-nitrosos (causadores de câncer) e ácidos 5-cafeoilquínicos são considerados os principais isômeros dos ácidos clorogênicos do café. Araújo (2007) sugeriu que o café pode apresentar efeito preventivo contra o câncer devido à presença de substâncias antioxidantes em sua composição, tendo em vista que a principal característica das fases envolvidas no processo de carcinogênese cursam com um estado oxidativo crônico; e a fase de iniciação está associada a um dano irreversível no material genético da célula pela ação de radicais livres. Dessa forma, a porção antioxidante do café é capaz de inibir os danos oxidativos no DNA, sendo eficaz na prevenção do câncer.

MARTINI *et al.* (2016) revisaram estudos de intervenção em humanos e ressaltaram que consumo de café pode aumentar os níveis de glutathione e melhorar a proteção contra danos ao DNA, especialmente quando a ingestão é contínua e com doses reguladas. Evidências experimentais demonstram que o café instantâneo protegeu as células de linfoma em animais de agentes de dano de DNA e radiação gama *in vitro* (ABRAHAM; STOPPER, 2004; ABRAHAM; VUKICEVIC; STOPPER, 2004). O consumo de café também pode se correlacionado com menores níveis circulantes de marcadores inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas e fator básico de crescimento de fibroblastos (FGF-2) ligado à patogênese de linfoma (LOFTFIELD *et al.*, 2015; ULLRICH *et al.*, 2015).

De forma positiva, os resultados encontrados na análise do ciclo celular relacionam-se aos resultados de viabilidade e morte celular anteriormente descritos; assim como, aos dados da literatura científica. É possível supor que os compostos intermediários, produzidos através da isomerização e/ou hidrólise dos ácidos clorogênicos sejam capazes de atuar de forma positiva na modulação do ciclo celular e, conseqüentemente, na indução da apoptose das células incubadas com extratos de café verde e torrado claro, que é onde os ácidos clorogênicos estão mais íntegros (MURAD, 2013).

A desregulação no controle do ciclo celular é um aspecto fundamental no desenvolvimento do câncer. As células normais apenas proliferam em resposta ao

desenvolvimento da célula ou a sinais presentes na mitose que indicam um requisito para o crescimento do tecido, enquanto que a proliferação das células cancerosas procede essencialmente sem controle; isto indica que as células cancerosas proliferam devido à presença de defeitos de sinalização internos e/ou externos. Sabe-se que as células cancerosas perdem a capacidade de regular seu ciclo celular, e assim, controlar a sua taxa de proliferação. Um passo limitante no ciclo celular, que muitas vezes não é regulado no câncer, é a progressão de células na primeira fase ( $G_1$ ) do ciclo para a fase S. Falhas no processo da regulação do ciclo celular podem levar uma proliferação maior de células cancerosas, enquanto que esforços realizados para corrigir este problema, levam a um retardo no crescimento e indução da morte celular (SOARES *et al.*, 2010). A eficiência de um composto bioativo no controle do câncer, pode ser avaliada pela sua capacidade de bloquear as fases do ciclo celular  $G_0/G_1$  e  $G_2/M$ , reduzindo a proporção de células na fase S (GUIMARAES *et al.*, 2017). Os extratos de café liofilizados induziram um aumento na fase  $G_0/G_1$  e aumento da fase  $G_2/M$ . Segundo MURAD (2013), os compostos intermediários, produzidos através da isomerização e/ou hidrólise do 5-CQA, já seriam capazes de atuar de forma positiva na modulação do ciclo celular e, conseqüentemente, na indução da apoptose nas células incubadas com 5-CQA.

Durante muitos anos, os três tipos básicos de morte celular, tipo I, II e III, podem ser distinguidos de acordo com critérios morfológicos, enzimológicos e funcionais. O tipo I, morte celular apoptótica, é definido por um conjunto de características morfológicas, incluindo a condensação da cromatina, fragmentação nuclear, encolhimento celular, bolhas da membrana plasmática e a formação de corpos apoptóticos. O tipo II, morte celular autofágica, é um processo pelo qual as células geram energia e metabolitos por digestão de organelas ou macromoléculas. O tipo III, necrose, caracteriza-se pela falta de alterações morfológicas estereotipadas, mas eventualmente resulta no arredondamento da célula (MENG *et al.*, 2016).

O processo apoptótico é fundamental para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas como: a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos. Este processo ocorre pela ação de uma família de cisteína proteases: as caspases, que são ativadas em resposta a estímulos pró-apoptóticos. As

caspases promovem apoptose por: indução de enzimas destrutivas (como DNases); liberação de citocromo c via Bcl-2 proteínas da família e destruição das principais proteínas estruturais e regulatórias (GALLUZZI *et al.*, 2012; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; SLEE; ADRAIN; MARTIN, 2001).

O conhecimento do número de células mortas em processo apoptótico é uma medida útil para avaliar os efeitos citotóxicos nas células cancerosas. A necrose, no entanto, há anos é associada a um modo acidental de morte celular. No entanto, algumas evidências indicam que a necrose pode ser um evento programado, pelo fato de poder ser regulada por fatores genéticos, epigenéticos e farmacológicos, assim como a inativação de caspases causa uma mudança da apoptose para morfologias de morte celular com características necróticas e apoptóticas mistas ou para necrose completa, por exemplo (KROEMER *et al.*, 2009). Reconheceu-se recentemente que uma forma de morte celular morfologicamente classificada como necrose também poderia ser regulada de forma programada através de caminhos de transdução de sinal definidos, denominados necroptose. A necroptose consiste principalmente em três fases de transdução de sinal, incluindo uma fase de iniciação e execução, causando finalmente a perda de integridade de células e organelas e morte celular (MENG *et al.*, 2016). A fase de necroptosis de execução envolve a ativação de mediadores de morte específicos, tais como proteínas quinases que interagem com o receptor (RIPKs) e proteína de domínio similar a quinase de linhagem mista (MLKL) (LINKERMANN; GREEN, 2014; YOON *et al.*, 2016).

A modificação do equilíbrio entre proliferação celular e morte por celular por apoptose e necroptose está diretamente envolvida na regulação do câncer (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007; SU *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2013), e podem ser envolvidas por abordagens farmacológicas direcionadas para fins terapêuticos (FULDA, 2013).

A capacidade de um composto em inibir a proliferação de células cancerígenas é muito desejável. Segundo EKBATAN *et al.* (2018) os CGA e seus metabólitos quando combinados são mais eficazes sobre a citotoxicidade e a inibição da proliferação de células cancerosas, com parada do ciclo celular e indução da apoptose. CHEN *et al.* (2001) informaram o efeito quimiopreventivo dos ácidos clorogênicos na via de indução da apoptose através do fenil éster do ácido cafeico em inagem celular de leucemia mielóide humana. Nas células de tumor maligno de próstata testadas nesse estudo, houve diminuição das células viáveis com aumento de células

mortas por apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose e células não viáveis. Considerando que a necroptose é uma nova classificação de morte programada e recentemente foi caracterizada em um estudo chinês onde uma das linhagens testadas foi a DU-145 (LIU *et al.*, 2018), vale ressaltar que é necessário caracterizar detalhadamente o processo de morte que esses extratos de café solúveis são capazes de induzir nas células tratadas.

O atual trabalho mostrou que os extratos de café verde e torrado claro foram capazes de regular negativamente na atividade metabólica de células tumorais de próstata, reduzindo as células viáveis. Pela primeira vez, resalta-se a modificação da ação de extratos de café em células tumorais de próstata, quando esses extratos são expostos a distintos processos de secagem. Esses dados encontrados são importantes tendo em vista que a linhagem testada (DU-145) é uma linhagem maligna agressiva, com capacidade metastática, preferencialmente para cérebro e não responsiva a estímulos hormonais, o que dificulta o tratamento desse tipo de tumor (ATCC, 2018; BARROS *et al.*, 2014).

## 7 CONCLUSÕES

Este trabalho obteve as seguintes conclusões:

- O processo de extração realizado nesse estudo, possibilitou a extração de cafeína, de compostos fenólicos e atividade antioxidante;
- O processo de torra foi importante na redução de açúcares, aminoácidos, cafeína, compostos fenólicos, atividade antioxidante;
- O processo de secagem modificou a capacidade de ação dos compostos presentes no grão de café;
- Os extratos de café liofilizados reduziram a proliferação e viabilidade celular em concentrações mais baixas que os extratos secos por *spray drier*;
- Os extratos solúveis de café modificaram o padrão do ciclo celular da linhagem de tumor maligno de próstata e induziram morte celular. Todavia, os extratos de café solúvel verde e de torra clara, principalmente os extratos secos por liofilização, propiciaram essas modificações celulares em concentrações de extrato mais reduzidas.

Assim sendo, os dados desse estudo sugerem que as amostras de café solúvel elaboradas foram capazes de interferir na eficiência metabólica e de crescimento celular do mesmo modo que interferiu no processo de morte da linhagem testada; e que tanto o processo de torra quanto o tipo de secagem interferiram no teor de compostos bioativos e sua eficiência biológica. Em conjunto, estes dados indicam que o efeito anticarcinogênico dos extratos de café verde e de torra clara foi dose dependente no tipo celular estudado.

O aprofundamento de estudos com o café solúvel em modelos animais e clínicos, sobre a possível proteção dos extratos solúveis de café no processo de tumorigênese e tipo de morte celular, ajudará a entender outros mecanismos ainda não elucidados por este trabalho e enriquecer o uso de compostos comuns da dieta na prevenção e possível auxílio no tratamento de doenças crônicas, como o câncer.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC. **Café e composição química.** Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=161&sid=81>>. Acesso em: 29 dez. 2015.

ABIC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ. **Produção Agrícola - ABIC.** Disponível em: <<http://abic.com.br/estatisticas/producao-agricola/>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

ABICS. **Fabricação de Café Solúvel.** Disponível em: <<http://www.abics.com.br/fabricacao/>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

ABRAHAM, S. K.; STOPPER, H. Anti-genotoxicity of coffee against N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in mouse lymphoma cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 561, n. 1–2, p. 23–33, 11 jul. 2004.

ABRAHAM, S. K.; VUKICEVIC, V.; STOPPER, H. Coffee-mediated protective effects against directly acting genotoxins and gamma-radiation in mouse lymphoma cells. **Cell biology and toxicology**, v. 20, n. 2, p. 121–32, mar. 2004.

ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 414–420, 2010.

ANVISA. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de café solúvel**, 1999. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/portarias/130\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/portarias/130_99.htm)>. Acesso em: 1 fev. 2018

AOAC et al. Journal of AOAC International. **Journal of AOAC International (USA)**, v. 78, n. 3, p. 736–744, 1995.

AOAC. Official Method 994.12. In: **AOAC Official Methods of Analysis**. [s.l: s.n.]. p. 5–15.

APAK, R. et al. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 26, p. 7970–81, 29 dez. 2004.

ARAI, K. et al. Simultaneous Determination of Trigonelline, Caffeine, Chlorogenic Acid and Their Related Compounds in Instant Coffee Samples by HPLC Using an Acidic Mobile Phase Containing Octanesulfonate. **Analytical Sciences**, v. 31, n. 8, p. 831–835, 10 ago. 2015.

ATCC. **DU 145 ATCC ® HTB-81<sup>TM</sup> Homo sapiens prostate**. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/all/HTB-81.aspx#characteristics>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

AZAM, S. et al. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 9, n. 9, p. BR325-30, set. 2003.

BAGCHI, D.; MORIYAMA, H.; SWAROOP, A. **Green Coffee Bean Extract in Human Health**. [s.l.] Taylor & Francis, 2017.

BAO, T.-H. et al. Coffee consumption and urologic cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. **International urology and nephrology**, v. 46, n. 8, p. 1481–93, ago. 2014.

BARROS, E. G. DE O. et al. The reciprocal interactions between astrocytes and prostate cancer cells represent an early event associated with brain metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 31, n. 4, p. 461–474, 1 abr. 2014.

BAUER, D. et al. Antioxidant Activity and Cytotoxicity Effect of Cocoa Beans Subjected to Different Processing Conditions in Human Lung Carcinoma Cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–11, 2016.

BØHN, S. K. et al. Effects of tea and coffee on cardiovascular disease risk. **Food & Function**, v. 3, n. 6, p. 575, 2012.

BOSIRE, C. et al. Coffee consumption and the risk of overall and fatal prostate cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. **Cancer causes & control: CCC**, v. 24, n. 8, p. 1527–34, ago. 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, jan. 1995.

BRASIL. **Diretrizes para o cuidado das pessoas com doenças crônicas nas redes de atenção à saúde e nas linhas de cuidado prioritárias**. Brasília: [s.n.].

BRASIL. **Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados b**. Brasília: [s.n.].

CAPRIOLI, G. et al. The influence of different types of preparation (espresso and brew) on



coffee aroma and main bioactive constituents. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 66, n. 5, p. 505–513, 4 jul. 2015.

CASTRO, I. M. DE; MELLO, J. S. R. DE. Determinação de Metil Xantinas em Alimentos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Comunicado Técnico**, v. 55, p. 9–12, 2002.

CÉSAR, L. A. M.; MORETTI, M. A.; MIOTO, B. M. Pesquisas comprovam benefícios do café à saúde humana. **Visão Agrícola**, v. 12, p. 112–114, 2013.

CETCAF - ABIC. **Estudo de de Qualidade Qualidade Café Conilon**Guarapari, ES14° ENCAFÉ, , 2014. Disponível em: <[http://abic.com.br/src/uploads/2017/10/EST\\_PESQEstudoQualidadeCafeConilon.pdf](http://abic.com.br/src/uploads/2017/10/EST_PESQEstudoQualidadeCafeConilon.pdf)>. Acesso em: 7 mar. 2018

CHEN, Y. J. et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5615–9, nov. 2001.

CHU, Y.-F. et al. Type 2 diabetes-related bioactivities of coffee: Assessment of antioxidant activity, NF-κB inhibition, and stimulation of glucose uptake. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 914–920, 1 fev. 2011.

CLARKE, R. J.; MACRAE, R. **Coffee**. Vol 2 ed. London, UK: Elsevier Applied Sciences, 1987.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature , occurrence , dietary burden , absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 1043, n. October 1999, p. 1033–1043, 2000.

CORRÊA, T. A. F. et al. Medium Light and Medium Roast Paper-Filtered Coffee Increased Antioxidant Capacity in Healthy Volunteers: Results of a Randomized Trial. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 3, p. 277–282, 2012.

DAGLIA, M. et al. In Vitro and ex Vivo Antihydroxyl Radical Activity of Green and Roasted Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1700–1704, 24 mar. 2004.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48–54, 2004.

DEVASAGAYAM, T. P. et al. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation

induced by reactive oxygen species. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1282, n. 1, p. 63–70, 13 jun. 1996.

DIAS, E. C. et al. **Determinação dos níveis de acrilamida em cafés verdes obtidos por diferentes processamentos**. VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. **Anais...Brasília: EMBRAPA CAFÉ**, 2009

DISCACCIATI, A. et al. Coffee consumption and risk of localized, advanced and fatal prostate cancer: a population-based prospective study. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 24, n. 7, p. 1912–8, 1 jul. 2013.

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

EKBATAN, S. S. et al. Chlorogenic Acid and Its Microbial Metabolites Exert Anti-Proliferative Effects, S-Phase Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Human Colon Cancer Caco-2 Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 723, 3 mar. 2018.

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

FARAH, A. et al. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1505–13, 9 mar. 2005.

FARAH, A. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, n. 2, p. 373–380, jan. 2006.

FARAH, A. et al. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans 1, 2. n. September, p. 2309–2315, 2008.

FARAH, A. Coffee as a speciality and functional beverage. In: **Functional and speciality beverage technology**. [s.l: s.n.]. p. 370–395.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 18, n. 1, p. 23–36, 2006.

FULDA, S. The mechanism of necroptosis in normal and cancer cells. **Cancer Biology and Therapy**, v. 14, n. 11, p. 999–1004, 2013.

GAASCHT, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Coffee provides a natural multitarget pharmacopeia against the hallmarks of cancer. **Genes & nutrition**, v. 10, n. 6, p. 51, nov. 2015.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the

Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 15 jan. 2012.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

GUERCIO, B. J. et al. Coffee Intake, Recurrence, and Mortality in Stage III Colon Cancer: Results From CALGB 89803 (Alliance). **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 33, n. 31, p. 3598–607, 1 nov. 2015.

GUIMARAES, D. DE A. B. et al. Pitaya Extracts Induce Growth Inhibition and Proapoptotic Effects on Human Cell Lines of Breast Cancer via Downregulation of Estrogen Receptor Gene Expression. **Oxidative medicine & cellular longevity**, v. 2017, p. 7865073, 2017.

HADDAD, N. F. et al. Lycopene and Beta-Carotene Induce Growth Inhibition and Proapoptotic Effects on ACTH-Secreting Pituitary Adenoma Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e62773, 7 maio 2013.

HALAL, S. L. EL. **Composição , Processamento E Qualidade Do Café**. [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2008.

HAMZALIOĞLU, A.; GÖKMEN, V. Investigation and kinetic evaluation of the reactions of hydroxymethylfurfural with amino and thiol groups of amino acids. **Food Chemistry**, v. 240, p. 354–360, 1 fev. 2018.

HAN, T. et al. Coffee and the Risk of Lymphoma: A Meta-analysis Article. **Iranian journal of public health**, v. 45, n. 9, p. 1126–1135, set. 2016.

HASHIBE, M. et al. Coffee, tea, caffeine intake, and the risk of cancer in the PLCO cohort. **British journal of cancer**, v. 113, n. 5, p. 809–16, 1 set. 2015.

HAY, R. J.; HAY, K. B. **Method of manufacturing partially roasted coffee beans and a combination roasting and brewing device**USA, 2016. Disponível em: <<https://patentimages.storage.googleapis.com/fc/86/a0/d4dca903f22fd8/US9392807.pdf>>.

Acesso em: 9 mar. 2018

HIGDON, J.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 46, n. 2, p. 101–123, 2007.

IARC. **Coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal**. [s.l.] IARC, 1991.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares: 2008-2009. Análise do Consumo Alimentar**

**Pessoal no Brasil.** [s.l: s.n.].

INCA. **Consenso de Nutrição oncológica: 2ª Edição revista, ampliada e atualizada.** 2ª Edição ed. Rio de Janeiro, RJ: 2015, 2015.

INCA. **Estimativa 2018 de Incidência de Câncer no Brasil.** [s.l: s.n.].

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans RE-EVALUATION OF SOME ORGANIC CHEMICALS, HYDRAZINE AND HYDROGEN PEROXIDE.** Volume 71 ed. Lion: WHO - World Health Organization, 1999.

IVAMOTO, S. T. et al. Diterpenes biochemical profile and transcriptional analysis of cytochrome P450s genes in leaves, roots, flowers, and during *Coffea arabica* L. fruit development. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 111, p. 340–347, 1 fev. 2017.

JESZKA-SKOWRON, M.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; GRZEŚKOWIAK, T. Analytical methods applied for the characterization and the determination of bioactive compounds in coffee. **European Food Research and Technology**, v. 240, n. 1, p. 19–31, 2015.

KEY, T. J. et al. Diet, nutrition and the prevention of cancer. **Public health nutrition**, v. 7, n. 1A, p. 187–200, 2004.

KIM, J. Y. et al. The coffee diterpene kahweol suppress the inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. **Cancer Letters**, v. 213, n. 2, p. 147–154, 30 set. 2004.

KOLBERG, M. et al. Coffee inhibits nuclear factor-kappa B in prostate cancer cells and xenografts. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 27, p. 153–163, 2016.

KONOPKA, K. et al. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1312, n. 3, p. 186–196, 24 jul. 1996.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 10 jan. 2009.

LAM, L. K. T.; SPARNINS, V. L.; WATTENBERG, L. W. Isolation and Identification of Kahweol Palmitate and Cafestol Palmitate as Active Constituents of Green Coffee Beans That Enhance Glutathione S-Transferase Activity in the Mouse. **Cancer Research**, v. 42, p. 1193–1198, 1982.

LI, Q. et al. Coffee consumption and the risk of prostate cancer: the Ohsaki Cohort Study. **British**

**Journal of Cancer**, v. 108, n. 11, p. 2381–9, 11 jun. 2013.

LINKERMANN, A.; GREEN, D. R. Necroptosis. **The New England journal of medicine**, v. 370, n. 5, p. 455–65, 30 jan. 2014.

LIU, X. et al. Downregulation of reticulocalbin-1 differentially facilitates apoptosis and necroptosis in human prostate cancer cells. **Cancer Science**, 17 fev. 2018.

LÖF, M. et al. Prospective study of coffee consumption and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality in Swedish women. **European journal of epidemiology**, v. 30, n. 9, p. 1027–34, set. 2015.

LOFTFIELD, E. et al. Associations of Coffee Drinking with Systemic Immune and Inflammatory Markers. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 24, n. 7, p. 1052–1060, 1 jul. 2015.

LOOMIS, D. et al. Carcinogenicity of drinking coffee, mate, and very hot beverages. **The Lancet. Oncology**, v. 17, n. 7, p. 877–878, 2016.

LÓPEZ-BARRERA, D. M. et al. Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators in vitro. **Food Chemistry**, v. 212, p. 282–290, 2016.

LU, Y. et al. Coffee consumption and prostate cancer risk: an updated meta-analysis. **Cancer causes & control : CCC**, v. 25, n. 1, p. 591–604, 2014.

LUDWIG, I. A. et al. Coffee: biochemistry and potential impact on health - Review Article. **Food and Function**, v. 5, p. 1633–1978, 2014a.

LUDWIG, I. A. et al. Variations in caffeine and chlorogenic acid contents of coffees: what are we drinking? **Food Funct.**, v. 5, n. 8, p. 1718–1726, 23 jul. 2014b.

MACRAE, R. **HPLC in food analysis**. [s.l.] Academic Press, 1988.

MAIER, H. G. **Status of Research in the Field of Non-Volatile Coffee Components**. Braunschweig, Alemanha: [s.n.]. Disponível em: <[http://asic-cafe.org/en/system/files/15\\_064.pdf](http://asic-cafe.org/en/system/files/15_064.pdf)>. Acesso em: 8 jan. 2016.

MAKHLOUF-GAFSI, I. et al. Ultrafiltration and thermal processing effects on Maillard reaction products and biological properties of date palm sap syrups (*Phoenix dactylifera* L.). **Food Chemistry**, 28 fev. 2018.

MANOJLOVIC, D. et al. Evaluation of Staining-Dependent Colour Changes in Resin

- Composites Using Principal Component Analysis. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14638, 9 dez. 2015.
- MARTINI, D. et al. Coffee Consumption and Oxidative Stress: A Review of Human Intervention Studies. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 979, 28 jul. 2016.
- MENG, M.-B. et al. Necroptosis in tumorigenesis, activation of anti-tumor immunity, and cancer therapy. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 57391–57413, 30 ago. 2016.
- MONTEIRO, M. et al. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 10, p. 2196–2201, 2007.
- MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 637–641, 2005.
- MOON, J.-K.; YOO, H. S.; SHIBAMOTO, T. Role of Roasting Conditions in the Level of Chlorogenic Acid Content in Coffee Beans: Correlation with Coffee Acidity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5365–5369, 24 jun. 2009.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.
- MURAD, L. D. **Efeito dos ácidos fenólicos e 5-cafeoilquínico sobre o crescimento de adenocarcinoma de cólon humano**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO, 2013.
- NEBESNY, E.; BUDRYN, G. Antioxidative activity of green and roasted coffee beans as influenced by convection and microwave roasting methods and content of certain compounds. **European Food Research and Technology**, v. 217, n. 2, p. 157–163, 1 ago. 2003.
- NOGUEIRA, M.; TRUGO, L. C. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 296–299, ago. 2003.
- OLIVEIRA, E. M. S. **Efeito modulador do café sobre a carcinogênese hepática induzida em ratos**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.
- OLIVEIRA, D. M. DE; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.
- PORTO, A. C. V. et al. Estimated Acrylamide Intake from Coffee Consumption in Latin

America. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 10, n. 2, p. 91–98, 2015.

PORTO, A. C. V. **Utilização de asparaginase na prevenção da formação de acrilamida em café**. [s.l.] Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição; Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

PREEDY, V. R. **Coffee in Health and Disease Prevention**. London, UK: [s.n.].

PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273–3279, 2003.

REVISTA CAFEICULTURA. **Como é o Processamento do Café Solúvel · Revista Cafeicultura**. Disponível em: <<http://revistacafeicultura.com.br/index.php?tipo=ler&mat=5937>>. Acesso em: 31 jan. 2018.

RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. 559S–69S, 2003.

RODRIGUES, N. P. **Café: compostos bioativos e capacidade desativadora de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio in vitro**. [s.l.] UNICAMP, 2013.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Comunicado Técnico on line**, p. 3–6, 2006.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre. **Comunicado Técnico on line**, v. 127, p. 0–3, 2007.

RUSTAN, A. C. et al. Effect of coffee lipids (cafestol and kahweol) on regulation of cholesterol metabolism in HepG2 cells. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 17, n. 10, p. 2140–9, 1 out. 1997.

SANTOS, N. A.; LIMA, T. S.; CARVALHO, V. C. H. S. DE. Efeitos fisiológicos do coffeea arábica para o organismo humano: evidências e controvérsias. **Revista Diálogos & Ciências**, v. 36, p. 128–149, 2016.

SAROBO, C. et al. Chronic caffeine intake increases androgenic stimuli, epithelial cell proliferation and hyperplasia in rat ventral prostate. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 93, n. 6, p. 429–437, 2012.

SHAFIQUE, K. et al. Coffee consumption and prostate cancer risk: further evidence for inverse relationship. **Nutrition journal**, v. 11, n. 1, p. 42, 13 jan. 2012.

SHATERI, Z.; DJAFARIAN, K. Coffee Consumption and Coronary Heart Diseases: A Mini-Review. **Journal of Clinical Nutrition & Dietetics**, v. 2, n. 1, 2016.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. . J. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 16, n. 3, p. 144–158, 1 set. 1965.

SLEE, E. A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 10, p. 7320–7326, 9 mar. 2001.

SOARES, N. P. DA C. et al. Licopeno induz parada de ciclo celular e apoptose em linhagem humana de câncer de cólon. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 143–148, 2010.

SOUZA, A. D. M. et al. Alimentos mais consumidos no Brasil: Inquérito Nacional de Alimentação 2008-2009. **Rev Saúde Pública**, v. 47, p. 190–199, 2013.

STALMACH, A. et al. Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: Identification of biomarkers of coffee consumption. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 8, p. 1749–1758, 2009.

SU, Z. et al. Cancer therapy in the necroptosis era. **Cell death and differentiation**, v. 23, n. 5, p. 748–56, maio 2016.

SURH, Y.-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 10, p. 768–80, out. 2003.

TAI, J. et al. Antiproliferation Effect of Commercially Brewed Coffees on Human Ovarian Cancer Cells In Vitro. **Nutrition and Cancer**, v. 62, n. 8, p. 1044–1057, 5 nov. 2010.

TIRZITIS, G.; BARTOSZ, G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. **Acta biochimica Polonica**, v. 57, n. 2, p. 139–42, 2010.

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.

TRESSERRA-RIMBAU, A. et al. Coffee Polyphenols and High Cardiovascular Risk Parameters. In: **Coffee in Health and Disease Prevention**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 387–394.



TROISE, A. D. et al. The quantification of free Amadori compounds and amino acids allows to model the bound Maillard reaction products formation in soybean products. **Food Chemistry**, v. 247, p. 29–38, 1 maio 2018.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. **The Analyst**, v. 109, n. 3, p. 263–6, mar. 1984.

TSUKUI, A.; OIGMAN, S. S.; REZENDE, C. M. Óleo de Grãos de Café Cru: Diterpenos Cafestol e Caveol Oil Green Coffee Beans: Diterpenes Cafestol and Kahweol. **Rev. Virtual Quim**, v. 6, n. 1, p. 16–33, 2014.

TVERDAL, A. Boiled coffee consumption and the risk of prostate cancer: follow-up of 224,234 Norwegian men 20-69 years. **British journal of cancer**, v. 112, n. 3, p. 576–9, 3 fev. 2015.

UCCELLA, S. et al. Intake of coffee, caffeine and other methylxanthines and risk of Type I vs Type II endometrial cancer. **British journal of cancer**, v. 109, n. 7, p. 1908–13, 1 out. 2013.

ULLRICH, K. et al. The IL-15 cytokine system provides growth and survival signals in Hodgkin lymphoma and enhances the inflammatory phenotype of HRS cells. **Leukemia**, v. 29, n. 5, p. 1213–1218, 9 maio 2015.

VIGNOLI, J. A. et al. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food Research International**, v. 61, p. 279–285, 1 jul. 2014.

VINDELOV, L. L. Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. **Virchows Archiv. B, Cell pathology**, v. 24, n. 3, p. 227–42, 10 ago. 1977.

VITAGLIONE, P.; FOGLIANO, V.; PELLEGRINI, N. Coffee, colon function and colorectal cancer. **Food & Function**, v. 3, n. 9, p. 916, 2012.

WHO. World Health Statistics 2013. In: **World Health Organization**. [s.l: s.n.]. p. 168.

WHO. **World Cancer Report 2014**World Health Organization: Geneva. [s.l.] WHO, 2015.

WHO. **World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals**. Geneva: [s.n.].

YASHIN, A. et al. Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 2, n. 4, p. 230–45, 15 out. 2013.

YOON, S. et al. Necroptosis is preceded by nuclear translocation of the signaling proteins that

induce it. **Cell death and differentiation**, v. 23, n. 2, p. 253–60, fev. 2016.

YU, X. et al. The role of necroptosis, an alternative form of cell death, in cancer therapy. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 13, n. 7, p. 883–893, 10 jul. 2013.

ZEFERINO, L. B. et al. Efeito da concentração de sólidos solúveis do extrato de café conilon no índice d refração, na densidade e na viscosidade do extrato. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, n. 11, p. 1–8, 2010.

ZHONG, S. et al. Coffee consumption and risk of prostate cancer: an up-to-date meta-analysis. **European journal of clinical nutrition**, v. 68, n. 3, p. 330–7, mar. 2014.