

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências Biológicas – CCB
Departamento de Microbiologia e Parasitologia- MIP
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

LIANA LUDIELLI DA SILVA

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E DETERMINAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E VASCULOGÊNICA
DOS EXTRATOS AQUOSOS PADRONIZADOS DE
COFFEA ARABICA E *THEOBROMA CACAO***

FLORIANÓPOLIS- SC
2005

LIANA LUDIELLI DA SILVA

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E DETERMINAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIOXIDANTES E VASCULOGÊNICA
DOS EXTRATOS AQUOSOS PADRONIZADOS DE
COFFEA ARABICA E *THEOBROMA CACAO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Marcelo Maraschin, Ph.D.

FLORIANÓPOLIS- SC

2005

SILVA, Liana Ludielli da

Análise fitoquímica e determinação das atividades antioxidantes e vasculogênica dos extratos aquosos padronizados de *Coffea arabica* e *Theobroma cacao*. 141p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

1. café – 2. cacau – 3. metabólitos secundários – 4. (poli)fenóis - 5. alcalóides - 6. antioxidantes - 7. vasculogênese

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, do Departamento de Fitotecnia, do Centro de Ciências Agrárias e no Laboratório de Produtos Naturais, do Departamento de Farmacologia, ambos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis.

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Denize, e ao Erick,
por todo amor e incentivo. VOCÊS SÃO A MINHA VIDA!

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento é de todo especial a muitas pessoas, cujos nomes preencheriam todas as páginas de minha dissertação, por isso gostaria de agradecê-los com estas singelas palavras:

“ Não há barreiras para quem não se oprime diante das dificuldades, nem fracasso para quem busca forças na fé e na educação.

Deus está diante de todas as forças, seja nos auxiliando a vencer os caminhos difíceis, seja colocando em nossos caminhos pessoas como vocês “.

Meus agradecimentos a todos do “Albergue da Avó Arlete”, as tias Soeli, Ady, Margarida e Lorna, a Turma do Monteirão (vizinhos e vizinho!), as amigas Denise Opata, Giovana, Rosana, Polyana, Ana Kelly, Maria Cláudia e Elisa (PG/PR), ao Garcia (JS/SC), aos Freis Tosta, Marquinhos, Roque e Daniel (Trindade/FPOLIS), a Turma do Laboratório (turma dos queijos e vinhos, turma dos ovos e cogumelo! e ao Luciano), a Turma da Praia (Alessandra, Magali, Luciana, Josiane), aos amigos da Cooperativa Cooxupé (mineirinhos UAI!), e as meninas da farmacologia, Regina e Mariana. Agradeço, sobretudo ao Professor Marcelo Maraschin (pela paciência e confiança!), à professora Rosa Maria Ribeiro-do-Valle (Departamento de farmacologia- UFSC), ao professor Paulinho (Laboratório de Biologia Celular, Embriologia e Genética –UFSC), a Maria Helena de Oliveira (gerente do laboratório), pela sua receptibilidade e coordenação do estágio, e aos demais amigos que sempre torceram pelo meu sucesso.

Liana (LUDI)

Florianópolis, 2005

RESUMO

Estudos vêm sendo realizados visando correlacionar a composição química e a atividade biológica de diversos alimentos inseridos na dieta humana, entre eles o café e o cacau. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, caracterizando-se também como um grande consumidor (70% da população consome esta bebida). Com relação ao cacau, o Brasil ocupa o 5º lugar como produtor e consumidor mundial, sendo o estado da Bahia seu maior produtor (95%). São os compostos biologicamente ativos produzidos por estas espécies, usualmente oriundos do metabolismo secundário, que têm despertado o interesse das indústrias alimentícia, química e farmacêutica. Entre estes compostos destacam-se os (poli)fenóis e os alcalóides, sendo que diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* vêm comprovando uma ampla variedade de efeitos biológicos associados aqueles metabólitos, com destaque para suas atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral. A busca por compostos biologicamente ativos benéficos à saúde e que estejam inseridos em biomassas presentes na dieta humana como o café e o cacau, por exemplo, é uma estratégia que corrobora na prevenção de certas enfermidades que acometem o homem, notadamente aquelas relacionadas ao sistema cardiovascular e de natureza neoplásica. No presente trabalho, observou-se a capacidade dos extratos de café *in natura* (cru) e cacau em pó no seqüestro dos íons superóxido e hidroxil, com maior efeito sobre este último radical livre. Também constatou-se a atividade pró-vasculogênica do extrato aquoso de café *in natura*, enquanto o cacau apresentou ação antivasculogênica em modelos de embriões de galinha. Sugere-se uma continuidade destes estudos para que estas biomassas possam ser utilizadas como alternativas na prevenção de determinados distúrbios da saúde humana.

ABSTRACT

Studies have been carried out aiming at to correlate the chemical composition and the biological activity of different kinds of foods added to the human diet, such as coffee and the cacao, among others. Brazil is the greatest worldwide producer and exporter of coffee, being also characterized as a great consumer (70% of the population consumes that beverage). As regards to cacao, Brazil occupies the 5th place as worldwide producer and consumer, being the state of Bahia its greatest producer (95%). The biologically active compounds produced by these species, usually derived from secondary metabolism, have raised the interest of the pharmaceutical, chemical and food industries. Among these compounds the polyphenols and the alkaloids are pointed out and several *in vitro* and *in vivo* assays have provided a wide variety of biological effects associated to those secondary metabolites, mostly their antioxidant, anti-inflammatory and anti-carcinogenic activities. The search for biologically active compounds beneficial to human health which are inserted in diet as coffee and cocoa, for instance, has been suggested as a strategy that corroborates to the prevention of certain diseases of neoplastic nature or related to the cardiovascular system. In this study, it was noticed the effect of aqueous crude extracts from *in natura* coffee and powder cocoa on the scavenging of superoxyde and hydroxyl ions, with the highest activity on the later radical. Furthermore, vasculogenic induction was detected as embryo chickens were treated with aqueous crude extract of *in natura* coffee, as the same extract from cocoa showed anti-vasculogenic activity. The continuation of this research line is suggested in order to allow the use of the coffee and cocoa biomass on as an alternative approach for the prevention of specific disorder in the human health.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xviii
CAPÍTULO I- CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS BIOMASSAS DE CAFÉ E CACAU.....	1
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 CARACTERÍSTICAS DOS CULTIVARES DE CAFÉ E CACAU.....	3
2.1.1 CAFÉ.....	3
2.1.1.1 Processamento do café e a qualidade da bebida.....	6
2.1.2 CACAU.....	9
2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DOS CULTIVARES DE CAFÉ E CACAU.....	12
2.3 COMPOSTOS DE INTERESSE BIOLÓGICO.....	15
2.3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ.....	20
2.3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CACAU.....	26
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivos gerais.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Material.....	34
4.1.1 Obtenção da matéria-prima.....	34
4.1.1.1 Café <i>in natura</i>	34
4.1.1.2 Café torrado.....	37
4.1.1.3 Cacao em pó.....	37
4.2 METODOLOGIA.....	40
4.2.1 Obtenção dos extratos vegetais alcaloidais e (poli) fenólicos: isolamento, purificação e dosagem.....	40

4.2.1.1 Extração dos alcalóides.....	40
4.2.1.2 Extração dos fenóis totais.....	41
4.2.1.3 Análise de alcalóides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	41
4.2.1.4 Determinação dos elementos minerais Ca, Mg, P, K, Cu, Zn, Fe, Mn e Pb por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio acoplado (ICP-AES)	41
4.2.1.5 Determinação do enxofre por Espectrofotômetro UV/VIS, método de turbidimetria com cloreto de bário (BaCl ₂).....	43
4.2.1.6 Determinação do elemento Boro.....	43
5. RESULTADOS.....	45
5.1 Análise quantitativa de fenóis totais em biomassas de cafés crus (<i>in natura</i>) e café expresso.....	45
5.1.1 Teor de fenóis totais em amostras de café classificadas como bebida mole.....	45
5.1.2 Análise do teor de fenóis totais encontrados em cafés processados por dois métodos, úmido e seco, respectivamente, cereja e natural.....	46
5.1.3 Análise do teor de fenóis totais entre as amostras de cafés naturais e suas cidades de origem.....	47
5.1.4 Análise do teor de fenóis totais entre as amostras de cafés varredura e os cafés cerrado e cereja.....	48
5.1.5 Análise do teor de fenóis totais entre as amostras de cafés in natura (natural, cerrado, cereja e varredura) com café expresso.....	49
5.1.6 Análise do teor médio de fenóis totais entre as amostras de café cereja cru (<i>in natura</i>) e café expresso elaborado a partir de cereja, ou seja, cerejas torrados.....	50
5.2 Análises quantitativas de fenóis totais na biomassa de cacau em pó.....	50
5.3 Análises quantitativas de cafeína na biomassa de cafés crus (<i>in natura</i>).....	51
5.4 Análises quantitativas de cafeína, teobromina e teofilina em biomassas de cacau em pó.....	53

5.5 Análise dos teores de minerais presentes em biomassas de cafés crus.....	55
5.5.1 Análise dos teores de bário (Ba), cálcio (Ca), cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe), potássio (K), magnésio (Mg), manganês (Mn) e zinco (Zn) presentes na biomassa de cafés crus.....	55
5.5.2 Análise dos teores de cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe), potássio (K), magnésio (Mg), manganês (Mn), zinco (Zn) e Níquel (Ni) entre os tipos de cafés natural, cerrado, cereja e varredura.....	57
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÕES.....	69
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	70
CAPÍTULO II.- ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES EM BIOMASSAS DE CACAU E CAFÉ.....	71
9. INTRODUÇÃO.....	71
10. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	72
10.1 Atividades biológicas de compostos alcaloidais.....	72
10.2 atividades biológicas de compostos fenólicos.....	79
11. OBJETIVOS.....	91
11.1 OBJETIVO GERAL.....	91
11.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	91
12. MATERIAL E MÉTODOS.....	92
12.1 MATERIAL.....	92
12.1.1 Amostras de biomassas de cacau e café.....	92
12.1.1.1 Determinação da atividade antioxidante dos extratos aquosos de café e cacau.....	92
12.1.1.2 Material biológico.....	93
12.2 METODOLOGIA.....	94
12.2.1 Obtenção dos extratos de café e cacau.....	94
12.2.2 Avaliação do efeito dos extratos aquosos de café in natura (cru) e cacau em pó sobre a vasculogênese <i>in vivo</i>	94
12.2.2.1 Adsorção dos extratos aquosos de café e cacau, cafeína e heparina-hidrocortisona aos suportes de metilcelulose.....	95

12.2.2.2 Cálculos das dosagens.....	96
12.2.2.3 Tratamentos.....	96
12.2.2.4 Análise do material e quantificação dos vasos sanguíneos.....	97
12.3 Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos (poli)fenólicos de café e cacau.....	98
12.3.1 Determinação de danos oxidativos à desoxirribose (capacidade sequestradora de OH [•]).....	98
12.3.2 Detecção da capacidade sequestradora de radical ânion superóxido (NBT- <i>Nitro Blue Tetrazolium</i>).....	99
12.3.3 Análise estatística.....	99
13. RESULTADOS.....	101
13.1 Avaliação do efeito do extrato aquoso de café in natura (cru), extrato aquoso de cacau em pó e cafeína sobre a vasculogênese <i>in vivo</i>	101
13.1.1 Análise da vasculogênese nos tratamentos com extrato aquoso de café.....	101
13.1.2 Análise da vasculogênese de embriões tratados com o extrato aquoso de cacau.....	103
13.1.3 Análise da vasculogênese de embriões tratados com cafeína.....	104
13.2 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos aquosos de café e cacau.....	105
13.2.1 Determinação da capacidade sequestradora do radical hidroxil (OH [•])- Medida da degradação da desoxirribose.....	105
13.2.1.1 Efeito dos extratos aquosos de café.....	106
13.2.1.2 Avaliação dos extratos de cacau.....	107
13.2.2 Determinação da Capacidade Sequestradora do radical Ânion Superóxido (O ₂ ^{•-}) de extratos aquosos de café e cacau.....	109
13.2.2.1 Extratos aquosos de café.....	109
13.2.2.2 Extratos aquosos de cacau.....	110
14. DISCUSSÃO.....	112
15. CONCLUSÕES.....	123
16. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detalhe dos frutos do cafeeiro (<i>Coffea arabica</i>).....	4
Figura 2. Detalhe da frutificação do cacauzeiro (<i>Theobroma cacao</i>).....	10
Figura 3. Detalhes dos frutos do cacauzeiro (<i>Theobroma cacao</i>), evidenciando o formato ovóide e suas sementes.....	11
Figura 4. Detalhe da inserção das inflorescências do cacauzeiro no tronco e nos ramos lenhosos.....	11
Figura 5. Participação relativa (%) do volume de produção de café dos estados para a safra 2004/2005.....	13
Figura 6. Vias de biossíntese de metabólitos secundários a partir de precursores oriundos da via glicolítica e do ciclo de Krebs.....	17
Figura 7. Vias de biossíntese de metabólitos secundários derivados do ácido chiquímico.	18
Figura 8. Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos e fenilpropanóides encontrados em biomassas de café e cacau.....	20
Figura 9. Detalhe da fórmula estrutural da cafeína (1,3,7-rimetilxantina).....	24
Figura 10. Detalhes das fórmulas estruturais dos alcalóides purínicos teobromina (a - 3,7-dimetilxantina) e da teofilina (b - 1,3-dimetilxantina) presentes em biomassas de cacau.....	29
Figura 11. Fórmula estrutural de compostos flavonoídicos presentes no cacau. Catequina (R1 = OH; R2 = R3 = H), epicatequinas (R1 = R3 = H; R2 = OH); epicatequina galato (R1 = R3 = H; R2 = galoil), epigalocatequina (R1 = H; R2 = R3 = OH); epigalocatequina galato (R1=H; R2= galoil; R3=OH).....	30
Figura 12. Teor de compostos fenólicos totais (mg/l) em amostras de grãos crus de café previamente classificados quanto à qualidade como bebida mole.....	45
Figura 13. Média do teor de fenóis totais (mg/l) em amostras de café natural, segundo a região de origem das amostras.....	47

Figura 14. Média do teor de fenóis totais (mg/l) em amostras de cafés varredura e os cafés cerrado e cereja.....	48
Figura 15. Média do teor de fenóis totais (mg/l) em amostras de cafés tipo <i>in natura</i> (crus) e tipo expresso.....	49
Figura 16. Média do teor de cafeína entre as amostras de cafés <i>in natura</i> (crus).	52
Figura 17. Resultado dos teores de alcalóides presentes nas amostras de cacau.....	54
Figura 18. Análise do teor médio dos minerais Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Zn e Ni presentes nas amostras de café <i>in natura</i> : natural, cerrado, cereja e varredura.....	58
Figura 19. Estruturas químicas dos alcalóides purínicos. cafeína (A), teobromina (B) e teofilina (C), encontrados em biomassas de café e cacau.....	72
Figura 20. Detalhe da estrutura química básica de compostos fenólicos, evidenciando os anéis A, B (homocíclicos) e C (heterocíclico).....	81
Figura 21. Detalhe da estrutura química de compostos fenólicos encontrados em biomassas de cacau.....	82
Figura 22. Detalhes da estrutura química de ácidos hidroxicinâmicos e fenilpropanóides encontrados comumente em biomassas de café.....	84
Figura 23. Micrografia ótica (25x) da vesícula vitelínica de embriões de galinha utilizados como modelo de estudo da vasculogênese. A) embrião com 48 horas de incubação - ilhotas sanguíneas destacadas em vermelho; B) embrião com 96 horas de incubação (seta preta), vasos sanguíneos iniciais (seta vermelha).....	95
Figura 24. Detalhe do procedimento de reincubação dos ovos em estufa, após a aplicação dos discos de metilcelulose contendo os tratamentos.....	97
Figura 25. Micrografia ótica (25x) indicando (seta amarela) a ocorrência de vasos sanguíneos que interceptam o disco de metilcelulose (0,21 µg/disco). A contagem destes vasos foi utilizada como indicador do efeito dos tratamentos em estudo sobre a vasculogênese em embriões de <i>G. domesticus</i>	98

- Figura 26.** Micrografias óticas do processo de vasculogênese observado na vesícula vitelínica de embriões de galinha tratados com extrato aquoso de café (0,21µg/disco), após 96 h de incubação: (A) controle negativo-objetiva 0,5; (B e C) objetivas de 0,5 e 1,0 respectivamente..... 101
- Figura 27.** Micrografia ótica do processo de vasculogênese observado em embriões de galinha tratados com extrato aquoso de cacau. (A) controle negativo- objetiva 0,5; (B e C) ação do extrato de cacau (0,21 µg/disco)-objetivas de 0,5 e 1,0, respectivamente..... 103
- Figura 28.** Número de vasos sanguíneos (média ± EPM) formados resultante dos tratamentos com cafeína (concentração equivalente a 0,21 µg/disco) e dos controles negativos e positivo, em embriões de *Gallus domesticus*..... 105
- Figura 29.** Atividade antioxidante apresentada pelos extratos aquosos de café: 40002928, 40002817, 40002959 e café expresso em diferentes concentrações (0,01; 0,1; 1,0; 10,0 e 100 µg/ml)..... 106
- Figura 30.** Efeito do extrato aquoso de cacau natural (Indeca) na capacidade seqüestradora de radicais ·OH in vitro em diferentes concentrações dadas em percentagem de degradação de desoxirribose. As colunas no histograma representa o valor médio ± EPM de três determinações. ** p < 0,01; *** p < 0,001..... 107
- Figura 31.** Efeito do extrato aquoso de cacau natural (Indeca) na capacidade seqüestradora de radicais ·OH in vitro em diferentes concentrações dadas em percentagem de degradação de desoxirribose. As colunas no histograma representa o valor médio ± EPM de três determinações. em triplicata. ** p < 0,01; *** p < 0,001; n.s. (p > 0,05)..... 108
- Figura 32.** Efeito do extrato aquoso de cacau alcalino T-800 (Indeca) na capacidade seqüestradora de radicais ·OH in vitro em diferentes concentrações dadas em percentagem de degradação de desoxirribose. As colunas no histograma representa o valor médio ± EPM de três determinações. em triplicata. * P < 0,05; *** P < 0,001; n.s. P > 0,05..... 109
- Figura 33.** Capacidade seqüestradora do ânion superóxido dos extratos aquosos de cafés 40002959, 40002871, 40002928 e café expresso,

expressa em valores percentuais de redução do NBT (<i>Nitro Blue Tetrazolium</i>).....	110
Figura 34. Capacidade seqüestradora do ânion superóxido pelos extratos aquosos de cacau, expressa em porcentagem de redução de NBT (<i>Nitro Blue Tetrazolium</i>).....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características genéticas, químicas, botânicas e agronômicas das espécies <i>Coffea arabica</i> e <i>C. conephora</i>	5
Tabela 2. Concentração de minerais (mg/Kg) em sementes de café.....	21
Tabela 3. Teor de aminoácidos (% em amostra fresca) encontrados nos grãos verdes de <i>Coffea arabica</i> e <i>C. conephora</i>	22
Tabela 4. Teor (% em amostra fresca) de carboidratos presentes em grãos de <i>Coffea arabica</i> e <i>C. conephora</i>	22
Tabela 5. Teor (% em amostra fresca) de ácidos alifáticos e quínicos em grãos de <i>Coffea arabica</i> e <i>C. conephora in natura</i>	23
Tabela 6. Teor de alcalóides (% amostra fresca) presentes nos grãos de café das espécies <i>Coffea arabica</i> e <i>C. conephora</i>	24
Tabela 7. Conteúdo (% amostra fresca) de ácidos (poli)fenólicos presentes nos cafés <i>Coffea arabica</i> e <i>C. conephora</i>	25
Tabela 8. Teor dos principais constituintes químicos em 100g de sementes (amostra fresca) de cacau <i>in natura</i>	27
Tabela 9. Teor de macro e micronutrientes presentes em 100g de biomassa de cacau em pó desengordurado e solúvel.....	28
Tabela 10. Teor dos constituintes minerais das amostras dos grãos de café <i>in natura</i> , conforme lauda da Cooperativa de Cafeicultores de Guaxupé (Cooxupé - MG, 2004).....	36
Tabela 11. Características organolépticas e fisico-químicas da amostra de cacau em pó natural INDECA	37
Tabela 12. Características organolépticas e fisico-químicas da amostra do pó de cacau alcalino INDECA T-350.....	38
Tabela 13. Características organolépticas e fisico-químicas da amostra de cacau em pó alcalino T-800 (cacau preto) INDECA.....	38
Tabela 14. Características químicas da amostra de cacau em pó alcalino da ALLIMENTUS ENGENHARIA E TECNOLOGIA LTDA.....	39
Tabela 15. Características químicas da amostra de cacau em pó alcalino	

lecitinado BRETZKE (Cargil).....	39
Tabela 16. Características químicas da amostra de cacau em pó alcalino FRISON.....	40
Tabela 17. Concentração dos padrões utilizados para análise quantitativa dos minerais Ca, Mg, P, K, Cu, Zn, Fe, Mn e Pb em grãos de café <i>in natura</i>	42
Tabela 18. Resultados da média de concentração de fenóis totais \pm EPM (erro padrão da média) das amostras de cafés cereja e cafés naturais.....	46
Tabela 19. Média dos teores de fenóis totais (mg/l) entre as biomassas de cacau em pó.	50
Tabela 20. Análise dos teores médios de minerais de cafés crus (mg/Kg amostra fresca) quantificados pela Cooperativa Cooxupé, comparados com teores encontrados em literatura.....	56
Tabela 21. Propriedades farmacológicas dos alcalóides purínicos cafeína, teofilina e teobromina, em ordem decrescente (1 a 3) de intensidade de ação nos sistemas nervoso central e respiratório, musculatura cardíaca e diurese.....	73
Tabela 22. Teores de fenóis totais (mg/l) e cafeína (mg/g) em amostra de café <i>in natura</i> , cru de registro número 40002871.....	92
Tabela 23. Teores de fenóis (mg/l) e cafeína (ug/ml) da amostra de cacau alcalino lecitinado Bretzke.....	92
Tabela 24. Conteúdo de fenóis totais (mg/l) das amostras de tipos de cafés selecionados para avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	93
Tabela 25 Concentração de fenóis totais (mg/l) de amostras de cacau selecionadas para avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i>	93
Tabela 26. Concentração (μ g/disco) dos tratamentos utilizados para os tratamentos dos embriões de <i>G. domesticus</i> , em valores relativos ao consumo humano (mg/dia) dos compostos em estudo.....	96
Tabela 27. Valores médios \pm EPM do número de vasos sanguíneos observados no limite do disco de metilcelulose, implantado na vesícula vitelínica de embriões de galinha, no período de 48 a 96 h de incubação,	

segundo as concentrações de extrato aquoso cru de café administradas.....	102
Tabela 28. Número de vasos sanguíneos (médias \pm EPM) detectados nos limites dos discos de metilcelulose implantados na vesícula vitelínica de embriões de galinha, segundo o tratamento com extrato aquoso de cacau.....	104

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS BIOMASSAS DE CAFÉ E CACAU

1. INTRODUÇÃO

Durante os últimos 500 anos, importantes espécies vegetais têm sido domesticadas e cultivadas em todo o mundo. No Brasil, dentre outras, o café, de origem etíope, e o cacau, provindo da América Central (RAVEN, 1996) apresentam destacada importância sócio-econômica. Estas espécies encontram-se inseridas em nossa dieta, sendo o café consumido preferencialmente na forma de bebida e o cacau principalmente na forma de seus derivados, i.e., chocolates, bolachas, achocolatados, bolos e balas, por exemplo.

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café (representando 30% do volume total produzido), sendo o sul de Minas Gerais seu principal pólo de produção. No país, duas espécies de café são cultivadas, a saber: *Coffea arabica* e *Coffea conephora* (conhecida como Conillon ou Robusta), sendo a primeira característica dos Estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais, enquanto *C. conephora* é cultivada principalmente no Espírito Santo (ROBBERS, 1996; CEPLAC, 2002; IAPAR, 2002; KASSAI, 2003).

A produção nacional de cacau, por sua vez, coloca o país no 5º lugar como produtor e consumidor mundial, sendo os estados da Bahia (95%), Espírito Santo (3,5%) e a região amazônica (1,5%) os principais pólos de produção (CEPLAC, 2002).

Os compostos biologicamente ativos produzidos pelos cultivares de café e cacau, usualmente oriundos do metabolismo secundário, têm despertado o interesse das indústrias alimentícia e farmacêutica. Entre estes compostos destacam-se os (poli)fenóis e os alcalóides, sendo que diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* vêm comprovando uma ampla variedade de efeitos biológicos

associados aqueles metabólitos, com destaque para suas atividades antioxidante, antiinflamatória, antialérgica, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica, inibitória da agregação plaquetária, antimicrobiana, antiparasitária, antiviral e antitumoral. Neste último contexto, tem sido constatada a ação de alguns polifenóis sobre os mecanismos envolvidos na formação e proliferação de vasos sanguíneos, i.e., vasculogênese e angiogênese (CAO; CAO, 2002).

Desta forma, a caracterização da biomassa de café (frutos verdes) e cacau (em pó), no que concerne aos teores dos alcalóides (cafeína, teofilina e teobromina) e teores de fenóis totais, poderá contribuir para a ampliação do conhecimento de possíveis efeitos benéficos à saúde humana acerca destes constituintes químicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS DOS CULTIVARES DE CAFÉ E CACAU

2.1.1 CAFÉ

O café é um produto nobre da agricultura brasileira, que desfruta de inegável importância também no conjunto da flora mundial. É conhecido e usado desde a antiguidade, porém, sua origem foi, durante séculos, assunto controverso entre botânicos e historiadores. Acreditou-se, em princípio, que era originário da Arábia, um fato que provavelmente corroborou para que o botânico Carl von Linné atribuisse sua classificação taxonômica como *Coffea arabica*. Todavia, estudos posteriores estabeleceram em definitivo sua origem etíope, mais especificamente de Kaffa, na Etiópia. Este foi o ponto de partida para a expansão do café, seguindo para Arábia, no século XV, onde se aclimatou facilmente, para o Cairo, Europa (Itália, França, Inglaterra) e, em 1723, para o Brasil, trazido da Guiana Francesa para o Pará, seguindo para o Maranhão, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo (CRUZ, 1995).

O café pertence à família das Rubiáceas, sendo considerado uma árvore pequena ou um arbusto perene (SOUSA, 1991). Caracteriza-se por frutos ovóides (Fig. 1), com cores vermelhas ou amarelas, contendo duas sementes cartilaginosas, envoltas em uma polpa adocicada e comestível. Sabe-se que o alto valor desta planta reside quase exclusivamente na sua semente, com as quais se prepara a bebida denominada café (BRUNETON, 1991).



Figura 1. Detalhe dos frutos do cafeeiro (*Coffea arabica*).

Fonte: <http://www.ecotourism.co.cr/docs/rafting/en/galeriafotos.htm>

Duas espécies principais de café são cultivadas atualmente: *Coffea arabica*, conhecida como Arábica, representa cerca de 75 a 80% da produção mundial. *Coffea canephora*, conhecida como café robusta, é uma planta mais vigorosa comparativamente à Arábica, mas produz uma bebida com qualidade inferior (COFEERESEARCH, 2004). Estas espécies exibem diferenças consideráveis em suas características genéticas, químicas, botânicas, morfológicas e agronômicas, as quais estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Características genéticas, químicas, botânicas e agrônômicas das espécies *Coffea arabica* e *C. conephora*.

Parâmetros	<i>C. arabica</i>	<i>C. conephora</i>
Data de descrição das espécies	1753	1895
Variedades principais	Typica	Robusta
clima ótimo	temperado	quente úmido
Altitude (m)	600 a 2200	0 a 800
Temperatura ótima (média anual)	15 a 24° C	24 a 30° C
Chuva (mm/ano)	1500 a 2000 mm	2000 a 3000 mm
Crescimento ótimo	1000 a 2000 m	0 a 700 m
Planta	arbusto auto-fertil (autogâmico)	arbusto auto-fertil (alogâmico)
Cromossomos (2n)	44	22
Folha	Pequena, lisa e oval	Grande e larga
Floração	Após o período de chuvas	Irregular
Flor (branca a rosa)	Pequenas (inflorescência 2 a 19 flores)	Grandes
Frutos	Cresce em cachos	Cresce em cachos
Sistema de raiz	Profundo	Não profundo
Rendimento (kg sementes/ha)	1500 a 3000	2300 a 4000
Desenvolvimento (meses)	8 a 9	10 a 11
Semente	Oval, achatada, sulco profundo	Oval para circular
Comprimento semente (mm)	5 a 13	4 a 8
Característica típica da bebida	acidificada	amarga, forte
Cafeína (%)	0,7 a 1,5 g%	1,8 a 4,0 g%

Fonte: Pimenta (1995); ILLY; VIANI (1996); BALLONE (2004).

A espécie *C. arabica* é a mais cultivada no Brasil, sendo os país o maior produtor mundial de frutos desta espécie. De forma similar, *C. conephora* (café robusta) também é cultivada, sendo o volume de produção nacional sobrepujado somente por aquele observado na Indonésia (ILLY; VIANI, 1996; FAPEMIG, 2003).

Duas variedades de *C. arabica* têm sido distinguidas, a saber: var. *arabica* ou *typica* e var. *bourbon*. Aparentemente, todos os cultivares (~ 40 a 50) são derivados destas duas variedades, porém, comercialmente, as mais importantes são: Mocha, Harrar, Blue Montain, Kona, Sumatra, Maragogype, Mokka, Caturra, Mundo Novo, Catuai, San Ramon, Ruiru Eleven e Kent (ILLY; VIANI, 1996).

O café pode ser cultivado em escala agrônômica apenas sob condições climáticas de regiões subtropicais, tropicais ou equatoriais. A espécie *C. arabica* cresce em altitudes de 500m em regiões subtropicais e acima de 2500m, próximo ao Equador, sendo sua qualidade influenciada pelas condições climáticas e pelo genótipo da planta, além de fatores agrícolas como adubação, tratamentos fitossanitários, maturação, cuidados na colheita, secagem, beneficiamento e armazenamento (ILLY; VIANI, 1996; VILELA, 1997). A espécie *C. conephora*, cultivada na faixa de 10° de latitude ao norte e ao sul do Equador, tolera temperaturas quentes e umidade elevada, porém é mais sensível ao frio que *C. arabica*. As características de qualidade dos frutos de *C. conephora* são menos influenciadas pelas condições climáticas, sendo mais afetadas pelas práticas de agricultura e processamento (ILLY; VIANI, 1996).

2.1.1.1 Processamento do café e a qualidade da bebida

Gradativamente o mercado vem remunerando melhor os cafés de bom preparo: bebida superior, secagem homogênea e ausência de defeitos (COOXUPÉ, 2005).

As espécies *Coffea arabica* e *C. conephora*, quando cultivadas em regiões aptas, recebendo tratamentos culturais adequados e colhendo-se os frutos em estágio cereja (45-55% de umidade), com ausência de qualquer ferimento ou injúria em sua superfície, produz grãos de café que mantêm um potencial máximo de qualidade. Entretanto, esses grãos podem deteriorar, caso permaneçam na planta ou sofram um preparo inadequado, razão pela qual pode-se afirmar que os cuidados com o café a ser produzidos iniciam-se na

pré-colheita. Os coeficientes técnicos destas operações são essenciais para evitar prejuízos na qualidade do café, i.e. preparo da lavoura, manejo fitossanitário, arruação (operação de limpeza da terra solta, das plantas daninhas e dos detritos que estão próximos do cafeeiro), esparramação (operação inversa da arruação) e colheita (derrixa do café) (BÁRTHOLO; GUIMARÃES, 1997).

No Brasil, a colheita do café é feita por derrixão, em que é colhida uma mistura de frutos de diferentes características com relação à maturação (verde, cereja, passa, bóia, coco), cor (verdes, verde-pretos, pretos, vermelho), densidade (os cafés com menor densidade ficam na superfície durante lavagem e os mais densos, afundam) e teor de umidade, identificados por diferentes denominações, descritos a seguir (BÁRTHOLO; GUIMARÃES, 1997; COOXUPÉ, 2005):

- Cafés verde: 50 a 70% de umidade (mais denso);
- Cafés cereja: 50 a 70% de umidade (mais denso);
- Cafés passa: 35 a 50% de umidade (menos denso);
- Cafés bóia: 25 a 35% de umidade (menos denso);
- Cafés coco: menos de 25% de umidade (menos denso).

Durante a colheita, esta mistura acontece devido ao amadurecimento desuniforme dos grãos, como consequência de várias floradas em diferentes épocas. Neste tipo de colheita todos os frutos são derrixados da árvore ao mesmo tempo, manualmente, ou com o auxílio de ferramentas, ou máquinas. A derrixa pode ser feita no pano ou no chão. Na derrixa de pano, um anteparo é estendido sobre o solo para que os frutos não fiquem em contato com a terra (processo utilizado para melhorar a qualidade dos grãos, reduzindo injúrias e contaminações por microorganismos presentes no solo). O café, depois de derrixado, é separado das folhas e das impurezas (processo denominado abanação) e ensacado. Em seguida é feita a varrição, operação de recolher o café existente no chão, rastelando ou varrendo e, depois o separando da terra e folhas. Este café de varrição é ensacado separadamente, pois devido ao contato com a terra, a sua qualidade poderá estar comprometida (BÁRTHOLO; GUIMARÃES, 1997).

O café colhido pode ser processado de duas formas, por via seca e via úmida. Porém, há um processo intermediário entre o via seca e o via úmida. Na forma de preparo por via seca, o fruto é seco na sua forma integral (com casca), sendo este o processo utilizado no preparo do café natural; o café preparado por via úmida, é despulpado com auxílio de despulpadores, assumindo esta denominação quando a mucilagem é totalmente eliminado através dos tanques de fermentação ou desmuciladores mecânicos. No processo intermediário, o café é despulpado e encaminhado para secagem com a mucilagem, sendo este processo utilizado para o preparo do café cereja descascado (COOXUPÉ, 2005).

A secagem do café é realizada no terreiro revestido (não na terra), separando-se os cafés bóias (mais secos), dos verdes e cerejas (mais úmidos) para obter um produto mais uniforme, de melhor aspecto e secagem amis homogênea. O café deve ser secado até atingir 12% de umidade, para então ser armazenado e posteriormente beneficiado (COOXUPÉ, 2005).

Além de um amplo conhecimento das técnicas para produção de cafés finos e de alta qualidade, é indispensável, em uma cafeicultura moderna, conhecer os critérios que caracterizam o café quanto à qualidade (BÁRTHOLO; GUIMARÃES, 1997), pois esta não é determinado somente por condições ambientais e agronômicas, mas também pela pré-colheita, colheita e pós-colhetia (COOXUPÉ, 2005). Para isto, existem normas e padrões que classificam o café quanto ao tipo, peneira e bebida (BÁRTHOLO; GUIMARÃES, 1997).

A classificação do café quanto ao tipo, é a classificação do produto segundo seu aspecto e quantidade de defeitos. O primeiro é influenciado pela coloração dos grãos, enquanto os defeitos provêm de grãos imperfeitos ou de impurezas. Já a classificação quanto à bebida, é ao gosto ou cheiro que o café apresenta na prova da xícara (teste sensorial) (BÁRTHOLO; GUIMARÃES, 1997).

A bebida do café é influenciada pela presença de grãos verdes, verde-pretos, pretos ou ardidos, ou ainda, pela ocorrência de fermentações aos grãos, durante a fase de colheita ou preparo. A seguir encontra-se descrita a classificação oficial do café pela bebida (BÁRTHOLO; GUIMARÃES, 1997):

- Estritamente mole: bebida de sabor suavíssimo e adocicado;
- Mole: bebida de sabor suave, acentuado e adocicado;
- Apenas mole: bebida de sabor suave, porém com leve adstringência;
- Dura: bebida com sabor adstringente, gosto áspero;
- Riada: bebida com sabor de iodofórmio ou ácido fênico;
- Rio: bebida com sabor forte e desagradável, lembrando iodofórmio ou ácido fênico;
- Rio Zona: bebida de sabor e odor intolerável ao paladar e ao olfato.

O cafeicultor deve, portanto, esforçar-se para atingir o ponto de beneficiamento com um número reduzido de defeitos, pois, mesmo com modernas técnicas de beneficiamento, se o produto tiver com um elevado número de defeitos, a porcentagem da parcela considerada refugo irá tornar-se alta ou, se incluída, acarretará uma classificação em pior tipo e baixo padrão qualitativo da bebida com relação do valor do produto final (SOUZA, CARVALHO, 1997).

2.1.2 CACAU

O cacau (*Theobroma cacao* - Fig. 2), é o maior constituinte do chocolate e seus derivados. Teve seu cultivo oficial no Brasil datando de 1679, através da Carta Régia que autorizava os colonizadores a plantá-lo em suas terras (CEPLAC, 2002). Sua origem é controversa, devido às dificuldades na identificação de seu ancestral. Alguns estudiosos descrevem sua origem como sendo da América Central, onde até hoje o cacau é encontrado no seu estado silvestre. Outros pesquisadores acreditam ser o cacau originário das cabeceiras do Rio Amazonas, tendo se expandido em duas regiões principais, para o norte, na América Central e para o Sul, na Bacia Amazônica, designado

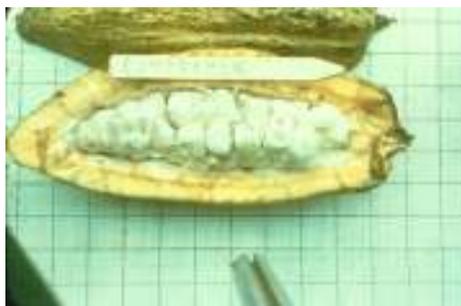
o verdadeiro cacau brasileiro (DILLINGER et al., 2000, CEPLAC, 2002). Porém, de acordo com historiadores, no Brasil, há evidências de que os índios brasileiros já utilizavam o cacau num período ao século XVII, os quais extraíam sua polpa e, através da fermentação desta, obtinham uma bebida alcoólica. O cacauzeiro era chamado *cacahuatl* pelas populações indígenas locais, sendo considerado sagrado e seu cultivo acompanhado por cerimônias religiosas. Este significado provavelmente influenciou Lineu a chamá-lo de “manjar dos deuses” (CEPLAC, 2002).



Fonte: www.indeca.com.br , 2004.

Figura 2. Detalhe da frutificação do cacauzeiro (*Theobroma cacao*).

O cacauzeiro pertence à família das Esterculiáceas, caracterizando-se por apresentar frutos ovóides, com superfície lisa (MAYDATA, 2002) (Fig. 3). O tamanho dos frutos maduros varia entre 15 a 30 centímetros de comprimento, por 8 a 13 cm de largura, apresentando formato ovalado. Cada fruto contém entre 20 a 40 sementes, envoltas numa polpa macia de cor marrom claro (INDECA, 2004).



Fonte: www.botgard.ucla.edu, 2004.

Figura 3. Detalhes dos frutos do cacauero (*Theobroma cacao*), evidenciando o formato ovóide e suas sementes.

O cacauero é uma árvore de altura mediana, com até 6 m de altura, com ramificação proeminente e com folhas longas e pendentes, as quais atingem até 35 cm de comprimento. Suas flores são reunidas em grupos que surgem no caule (caulifolia). As flores, brancas, amarelas ou róseas, são hermafroditas e surgem no período de dezembro a abril em inflorescências no tronco ou nos ramos lenhosos, nas chamadas almofadas florais, de onde se desenvolvem e formam os frutos (Fig. 4 - VALE, 2004).



Fonte: www.botgard.ucla.edu, 2004.

Figura 4. Detalhe da inserção das inflorescências do cacauero no tronco e nos ramos lenhosos.

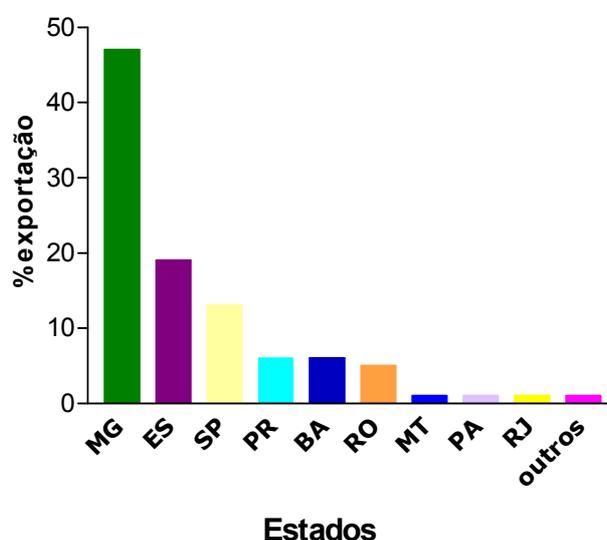
Para se desenvolver, o cacauzeiro exige solos profundos e ricos, e clima quente e úmido, com temperatura média de cerca de 25°C, adaptando-se bem ao clima do Sul da Bahia, região que produz hoje 95% do cacau brasileiro. De forma similar, condições climáticas favoráveis ao cultivo desta espécie são encontradas no Espírito Santo e Amazonas, os quais respondem por 3,5% e 1,5% da produção nacional, respectivamente (CEPLAC, 2002). Mais recentemente, esta atividade agrícola também se firmou no Pará e Rondônia (REIS *et al.*, 2003).

2.2 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DOS CULTIVARES DE CAFÉ E CACAU

O Brasil é o maior produtor mundial de café. No segundo levantamento da safra de café 2005/06, a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) estima uma produção de 32,46 milhões de sacas do produto. Este resultado representa uma redução de 16,1%, quando comparado à safra 2004/05, que foi de 38,6 milhões de sacas. A queda deve-se à baixa bialidade das lavouras de café arábica, que deve ser de 23,3 milhões de sacas, contra os 31,1 milhões da safra passada. (CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, 2005). Em contra partida, a indicação feita pelo vice-presidente da Volcafé/Suíça, Reto Ghilardi, aponta um número muito superior à estimativa da Conab, devendo atingir 38,5 milhões de sacas. Esta produção também supera a projeção do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), de 36,5 milhões de sacas ([News Cafeicultura, 2005](#)).

O país também é considerado o maior exportador mundial de café (CEPLAC, 2002; IAPAR, 2002; KASSAI, 2003; FAPEMIG, 2003). A receita cambial com exportação de café no ano agrícola 2004/05 (de julho de 2004 a junho de 2005) deve apresentar recorde de cerca de US\$ 2,3 bilhões, melhor resultado dos últimos oito anos. O resultado é 50% superior ao do período anterior, conforme projeções do diretor geral do Conselho dos Exportadores de Café (Cecafé), Guilherme Braga. O volume embarcado deve alcançar cerca de 27 milhões de sacas de 60 kg ([News Cafeicultura, 2005](#)).

Com relação aos estados brasileiros, de acordo com a previsão da safra 2004/2005 realizada em abril de 2004 pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), Minas Gerais situa-se como o maior pólo produtor, correspondendo a 47% da produção total de café *in natura* (crus), seguido pelos estados do Espírito Santo (19%), São Paulo (13,0%), Paraná e Bahia com 6,0% e Rondônia (5,0%). A produção dos demais estados representa apenas cerca de 4,0% do total nacional (Fig.5).



(Fonte: CONAB, 2005)

Figura 5. Participação relativa (%) do volume de produção de café dos estados para a safra 2004/2005.

No contexto econômico, o café é um produto cuja relação preço/demanda é inelástica, ou seja, por mais que o preço do café aumente ou reduza, o seu consumo mantém-se estável. Desta forma, sua demanda não apresenta variações significativas, ainda que um aumento no consumo venha sendo observado, porém como decorrência do crescimento da população e dos incentivos à sua ingestão (MATIELLI; RUGGIERO, 2003).

Com relação à produção e consumo de cacau, o Brasil ocupa o 5º lugar em nível mundial, tendo a Costa do Marfim (41% da produção mundial), a Indonésia (15%), Gana (14%) e Nigéria (6%) como os maiores produtores mundiais. O Brasil produz aproximadamente 4% do cacau mundial, caracterizando-se por ser um país tradicionalmente exportador desta matéria-prima. No continente americano, além do Brasil, o cacau é cultivado também no Equador, México, Colômbia, Venezuela e República Dominicana. Como parque chocolateiro mundial, o Brasil também se encontra em 5º lugar, havendo predominância do plantio dos cultivares Crioulo, Calabacillo, Soconusco, Esmeralda, Trinarios e Forastero (LIMA, 2004). Segundo a Secretaria de Política Agrícola, na safra 2003, o Brasil produziu 170 mil toneladas de cacau, sendo 90% desta produção destinada à exportação, gerando um volume de recursos de 321,037 milhões de dólares (REIS *et al.*, 2003; Secretaria de Política Agrícola/ MAPA, 2004). Para 2004, estima-se uma produção total de 178 mil toneladas (Secretaria de Política Agrícola/ MAPA, 2004).

Atualmente, além do processamento das sementes secas, que representam 10% do peso do fruto do cacau, também se aproveitam os 90% restantes, como polpa integral. A casca do fruto vem sendo utilizada na alimentação de bovinos, suínos, aves e algumas espécies de peixes; bem como para a produção de biogás e biofertilizante, via processo de compostagem, na obtenção de proteína microbiana ou unicelular, na produção de álcool e na extração de pectina. Mais recentemente, outros subprodutos do cacau têm sido comercializados, como o mel de cacau, o vinagre, o suco congelado, o néctar e a geléia. De suas amêndoas secas extraem-se a manteiga, o pó, o licor e o chocolate. De início, só se atribuía importância ao cacau por sua transformação em chocolate, popularizado como um estimulante contra o frio. Atualmente, em decorrência de descobertas de algumas de suas propriedades alimentícias e terapêuticas, o cacau passou a ser considerado como matéria-prima das indústrias alimentícia e farmacêutica (CEPLAC, 2002).

2.3 COMPOSTOS DE INTERESSE BIOLÓGICO

A preocupação do consumidor com relação ao alimento transformou-se consideravelmente durante as últimas décadas. Antigamente, o consumo de alimentos restringia-se à garantia da sobrevivência, de forma que a qualidade dos alimentos não era um aspecto prioritário. A pesquisa de alimentos tomou impulso nos anos 70 e 80, onde o enfoque dos estudos se deu, sobretudo, na eliminação de componentes prejudiciais à saúde. A partir dos anos 90, segundo evidências sobre os efeitos saudáveis de certos compostos (funcionais) presentes nos alimentos, estes passaram a ser vistos como sinônimos de bem-estar, reduzindo os riscos de determinadas doenças, e como veículos de uma melhor qualidade de vida, reforçando assim a idéia de que a alimentação é um fator crítico para a manutenção da saúde (TORRES, 2004).

Os compostos biologicamente ativos presentes nas biomassas de café e cacau, usualmente oriundos do metabolismo secundário em destaque os alcalóides e os (poli) fenóis, têm despertado o interesse das indústrias alimentícia, química e farmacêutica. Desde os tempos antigos, os metabólitos secundários vêm sendo utilizados nas sociedades humanas com propósitos terapêuticos, sendo que suas propriedades tóxicas ou curativas foram descobertas enquanto estas buscavam por alimento (MARASCHIN; VERPORTE, 2001). De fato, as plantas produzem uma variedade economicamente importante de metabólitos secundários, com aproximadamente 4000 novas descobertas ao ano, somando aos 100.000 compostos já conhecidos. A denominação de metabólitos secundários decorre do fato de que tais compostos não estão envolvidos em eventos primários da célula, essenciais para sua sobrevivência (ZHANGH; CURTIN; FRANCO, 2002). Entretanto, apresentam múltiplas funções no ciclo de vida da planta, entre elas: mediadores da interação plantas e ambiente, planta e insetos (inseticida), planta e microrganismos (fitoalexinas) e interações planta/planta

(alelopatia) (OKSMAN-CALDENTY; HILTUNEN, 1996; BOURGAUD *et al.*, 2001; VERPORTE; MEMELINK, 2002).

Diversos estudos realizados durante a última década, de caráter experimental e epidemiológico, mostraram que alimentos como grãos, vegetais e frutas contêm uma grande variedade de substâncias potencialmente quimioprotetoras. Esta abordagem refere-se a toda substância química biologicamente ativa de ocorrência nos tecidos vegetais. O maior grupo de fitoquímicos nos alimentos, entre outros constituintes biologicamente ativos, são os compostos fenólicos que incluem os flavonóides catequínicos encontrados no cacau (consumido na dieta sob a forma de seus derivados achocolatados, chocolates, bolachas, balas, por exemplo), no chá preto e vinhos tintos e os ácidos fenólicos tais como os ácidos gálico, clorogênico, cafeico, ferúlico e *p*-cumárico, presentes em sementes de café (ABREU; MEDEIROS; SPINELLI, 2004).

Estes compostos são classificados de acordo com sua rota biossintética, sendo seus precursores oriundos de vias metabólicas básicas como a via glicolítica, o ciclo de Krebs, ou a via do chiquimato, apresentadas nas figuras 6 e 7 (modificado de WINK, 1999).

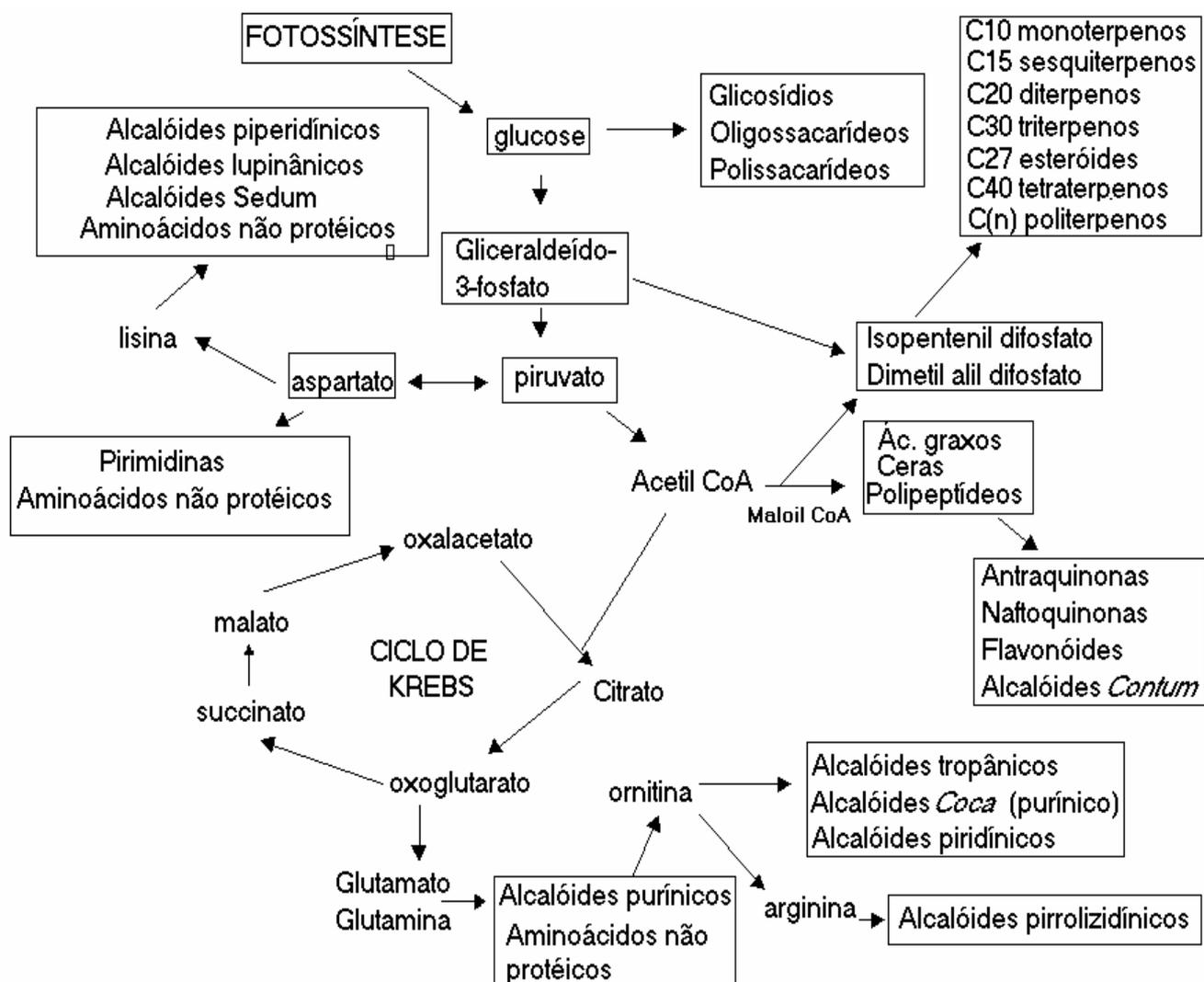


Figura 6. Vias de biossíntese de metabólitos secundários a partir de precursores oriundos da via glicolítica e do ciclo de Krebs.

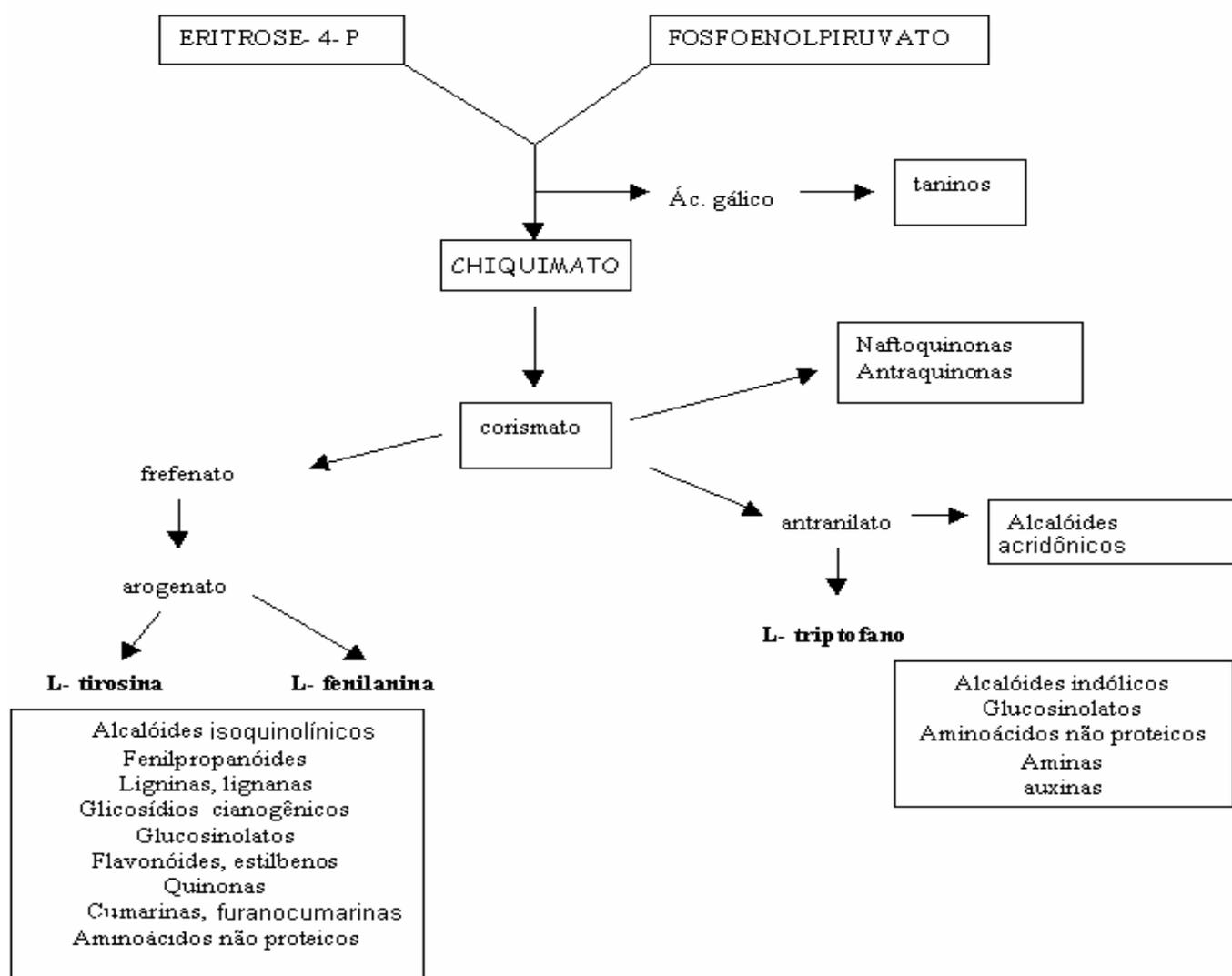


Figura 7. Vias de biossíntese de metabólitos secundários derivados do ácido chiquímico.

Dentre o conjunto de metabólitos secundários, os terpenos e esteróides, (poli)fenóis e alcalóides são consideradas as três grandes famílias (BOURGAUD *et al.* 2001). Os terpenos são originados da via do acetato-mevalonato, a partir de uma unidade isopreno. A classificação destes metabólitos é feita de acordo com a quantidade de unidades de isopreno em hemiterpenóides, C5; monoterpenóides, C10; sesquiterpenóides, C15;

diterpenóides, C₂₀; triterpenóides, C₃₀; e tetraterpenóides ou carotenóides, C₄₀. Tais compostos apresentam funções variadas nos vegetais, sendo que os monoterpenos são constituintes dos óleos voláteis, atuando na atração de espécies polinizadoras, por exemplo. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenóides dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenóides e seus derivados, os esteróides, apresentam uma gama de funções. Muitos atuam na proteção contra o ataque de herbívoros, alguns são anti-mitóticos, enquanto promovem a germinação de sementes ou a inibição do crescimento radicular (HARBONE; BAXTER, 1995; ROBBERS, 1996).

Os compostos (poli)fenólicos, outra grande família de moléculas, possuem em comum um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila, apresentando alta atividade biológica como, por exemplo, a capacidade antioxidante, i.e., um mecanismo de defesa em sistemas biológicos contra a ação de radicais livres de oxigênio ou espécies reativas de oxigênio - EROS (YUNES; CALIXTO, 2001). Uma das importantes fontes naturais de antioxidantes são as plantas, onde estes compostos podem ocorrer em diversos órgãos: frutas, caules, folhas, sementes e flores (WANASUNDARA *et al.*, citado por MATIUCCI, 1998).

Entre os compostos fenólicos, os fenilpropanóides apresentam cadeia C₃ como grupamento lateral, sendo os mais comuns os ácidos ferúlicos, *p*-cumárico, cafeico e clorogênico. Os fenilpropanóides representam um amplo grupo de produtos derivados dos aminoácidos aromáticos tirosina e fenilalanina e em alguns casos de intermediários da rota de biossíntese do ácido chiquímico. Várias categorias de fenilpropanóides incluem os ácidos hidroxicinâmicos (ácidos *p*-cumárico, ferúlico e cafeico - Fig. 8), os fenilpropenos (ácidos gálico e clorogênico - Fig. 8), as cumarinas e cromonas (isômeros de cumarinas), os fenilpropanóides condensados (ácidos benzóico e salicínico, por exemplo), as lignanas e neolignanas, os flavonóides (flavonas, flavononas, flavonóis, antocianidinas e isoflavonas), as ligninas e os taninos. A função ecológica destes compostos é usualmente relacionada com a defesa da planta contra insetos, herbívoros e microrganismos (ROBBERS, 1996).

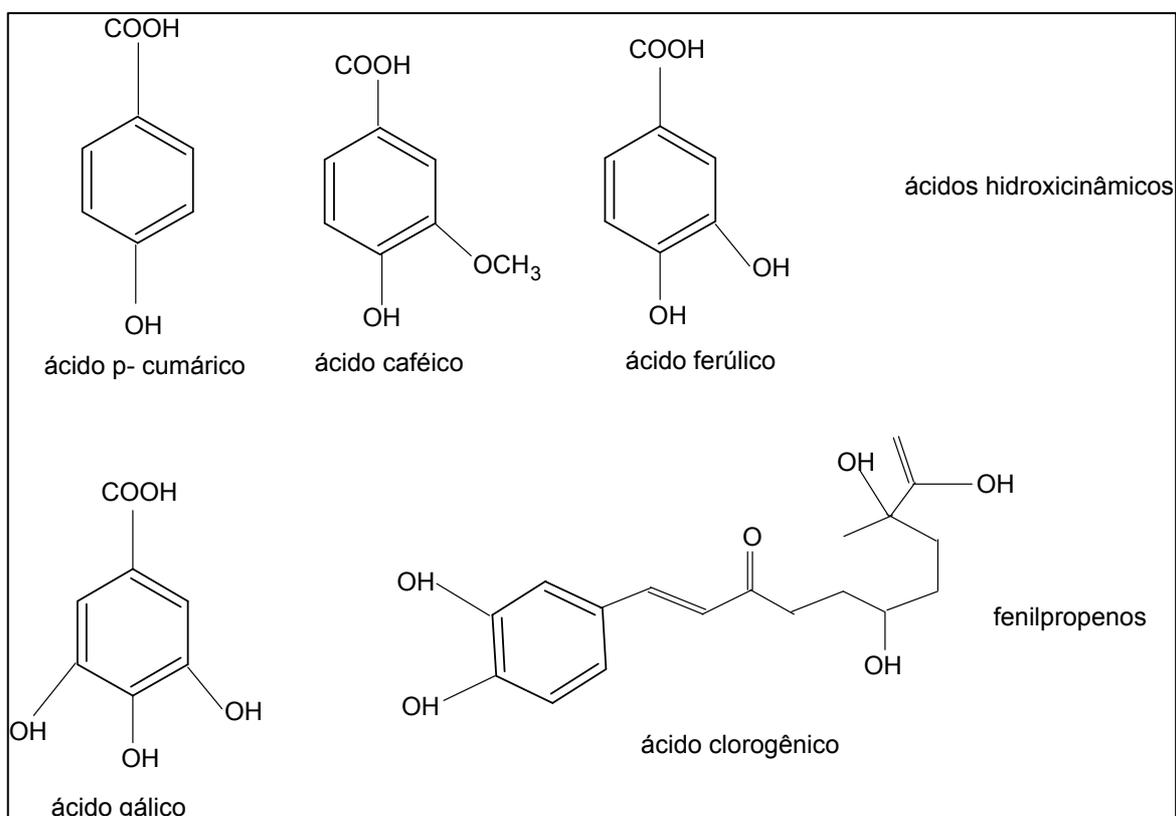


Figura 8. Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos (ácido *p*-cumárico, caféico e ferúlico) e fenilpropenos (ácido gálico e clorogênico) encontrados em biomassas de café e cacau.

2.3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ

O sabor característico do café deve-se à presença de vários constituintes químicos voláteis e não-voláteis, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos e também à ação de enzimas sobre alguns destes constituintes, gerando como produtos de reações compostos que interferem no sabor e odor deste (CARVALHO; CHAGAS; SOUZA, 1997). Somado a isto, cabe ressaltar a existência de distinções qualitativas e quantitativas na composição química entre as duas espécies de café cultivadas, *Coffea arabica*

e *C. conephora*, sendo a primeira, produtora de uma bebida de melhor qualidade (ILLY;VIANI, 1996).

O estudo da composição química dos grãos verdes do café, além de favorecer parâmetros relacionados com a qualidade da bebida, com vistas sobretudo ao atendimento às exigências mundiais de modernização do sistema de classificação da qualidade (SOUZA, 1996), pode ser uma alternativa para os produtores de café que visem direcionar seus grãos para outro setor, agregando valor ao produto, em especial, às indústrias farmacêuticas, químicas e alimentícias (nutracêuticos), no que concerne à ênfase sobre as atividades biológicas destes constituintes químicos.

O grão de café (café verde) possui uma grande variedade de minerais, sendo que as amplitudes de concentração dos principais elementos encontrados naquela biomassa são mostradas na tabela 2.

Tabela 2. Concentração de minerais (mg/Kg) em sementes de café verdes (crus) da espécie *C. arabica*.

Elementos	Teor (mg/Kg)
K	13816-18800
Ca	826-4000
Mg	1794-3000
Mn	17-60
Co	0,05-0,35
Fe	32-140
Zn	4,4-10,0
Cu	1-33
Ba	1,9-11,0

Fonte: KRIVAN; BARTH; MORALES, 1993; TSERERITNOV *et al.*, 1972

De forma similar, a composição e o conteúdo de aminoácidos e carboidratos são mostrados nas tabelas 3 e 4, respectivamente. Adicionalmente, o café também possui teores de ácidos alifáticos e quínicos, cujos valores médios são apresentados na tabela 5.

Tabela 3. Teor de aminoácidos (% em amostra fresca) encontrados nos grãos verdes das espécies *Coffea arabica* e *C. conephora*.

Aminoácidos	<i>Coffea arabica</i> (% amostra fresca)	<i>Coffea conephora</i> (% amostra fresca)
Alanina	0,05	0,09
Arginina	0,01	0,02
Ácido aspártico	0,05	0,09
Asparagina	0,05	0,09
Cisteína	Traços	Traços
Ácido glutâmico	0,13	0,08
Glicina	0,01	0,02
Histidina	0,01	Traços
Isoleucina	0,01	0,02
Leucina	0,01	0,02

Fonte: ILLY;VIANI, 1996.

Tabela 4. Teor (% em amostra fresca) de carboidratos presentes em grãos de café verdes (crus) das espécies *Coffea arabica* e *C. conephora*

Carboidratos	<i>Coffea arabica</i> (% amostra fresca)	<i>Coffea conephora</i> (% amostra fresca)
Sacarose	6 a 9	3 a 7
Arabinose	43 a 45	46,9 a 48,3
Manose	3,4 a 4,0	3,8 a 4,1
Manose	21,3 a 22,5	21,7 a 22,4
Glucose	6,7 a 7,8	7,8 a 8,7
Galactose	10, 4 a 11,9	12,4 a 14,0
Ramnose	0,3	0,3
Xilose	0 a 0,2	0,2

Fonte: ILLY;VIANI, 1996; ICO - International Coffee Organization, 2004.

Tabela 5. Teor (% em amostra fresca) de ácidos alifáticos e quínicos em grãos verdes das espécies *Coffea arabica* e *C. conephora*

Ácidos orgânicos	<i>Coffea arabica</i> (% em amostra fresca)	<i>Coffea conephora</i> (% em amostra fresca)
- alifáticos	1	1
- quínico	0,4	0,4

Fonte: ILLY;VIANI, 1996; ICO - International Coffee Organization, 2004.

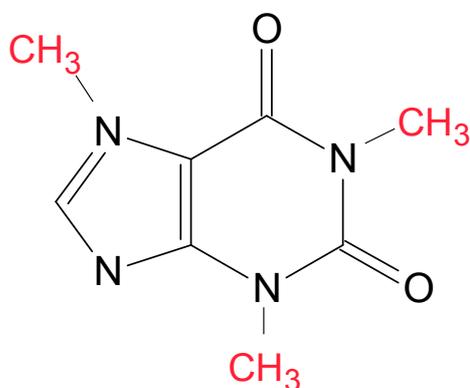
De especial interesse no contexto em discussão é o fato de que os compostos acima referidos podem ser preservados, formados, ou destruídos durante o processo de torrefação, para a elaboração da bebida café [ABIC, 2004]. Por isso, a necessidade de se investigar a composição dos grãos verdes *in natura*, comparativamente aos resultados encontrados na literatura sobre a composição das bebidas café, podendo-se estabelecer uma correlação entre a ocorrência de determinados constituintes químicos dos grãos verdes e qualidade da bebida, além de outras possíveis utilizações destes grãos sem processá-los, como para as indústrias química e farmacêutica.

O café é conhecido sobretudo pela ação estimulante de seu composto majoritário, a cafeína, sobre o sistema nervoso central (estimulante). A cafeína pertence ao grupo de compostos denominados *alcalóides*, sendo estes produtos do metabolismo secundário da planta.

O grupo de alcalóides comumente encontrado no café recebe a denominação de alcalóides purínicos, onde a xantina (base de seu esqueleto carbônico) é derivada de nucleotídeos purínicos (A-G), que são convertidos à xantosina, o primeiro intermediário da biossíntese destes alcalóides. Como destaque neste grupo de compostos tem-se a 1,3,7-trimetilxantina (cafeína), a 3,7-dimetilxantina (teobromina) e a 1,3-dimetilxantina (teofilina) (ASHIHARA; CROZIER, 2001).

A cafeína é o alcalóide mais popularmente conhecido e estudado, sendo de reconhecida atividade estimulante do sistema nervoso central (Fig. 9). É o

composto majoritário das bebidas mais populares como o café, o chá, os mates e os derivados do cacau, sendo termo-estável.



1,3,7- trimetilxantina

Cafeína

Figura 9. Detalhe da fórmula estrutural da cafeína (1,3,7-trimetilxantina).

Nas variedades de café cultivadas, o teor dos compostos alcaloidais varia entre as espécies *Coffea arabica* e *C. conephora*, conforme demonstrado na tabela 6.

Tabela 6. Teor de alcalóides (% amostra fresca) presentes nos grãos de café das espécies *Coffea arabica* e *C. conephora*.

Alcalóides purínicos	<i>Coffea arabica</i> (% amostra fresca)	<i>Coffea conephora</i> (% amostra fresca)
Cafeína	1	2
Teobromina	36 a 40	26 a 82
Teofilina	7 a 23	86 a 344
Trigonelina	0,6 a 1,3	0,3 a 0,9
Teocrina	0	11
Liberilina	5	7 a 110
Metiliberilina	0	3
Paraxantina	3 a 4	8 a 9

Fontes: ILLY; VIANI, 1996.

A cafeína foi isolada do café por Runge, em 1820. Este alcalóide é encontrado nas plantas na forma livre, ou combinada com taninos fracamente ácidos, sendo solúvel em água. Contudo, uma vez extraída dos grãos ou das folhas de café em água, traz consigo outras substâncias orgânicas, sendo esta mistura responsável pelo aroma característico do café. Para minimizar a extração destes compostos orgânicos juntamente com a cafeína, utiliza-se uma solução aquosa de carbonato de cálcio, aumentando assim o rendimento da extração deste alcalóide (MINATTI et al., 2004).

Outra classe de metabólitos secundários atualmente muito estudados vem a ser a dos compostos (poli) fenólicos. Estes compostos estão presentes em todos os vegetais e compreendem um grupo heterogêneo de substâncias. No café, contribuem de maneira altamente significativa para o sabor e aroma do produto final, ocorrendo em concentrações elevadas, conforme mostrado na tabela 7, com destaque para os ácidos clorogênico e cafeico. Os compostos fenólicos são termolábeis, ou seja, durante a torrefação sua decomposição gera compostos voláteis, materiais poliméricos (melanoidinas) e a liberação de CO₂ (PIMENTA; COSTA; CHAGAS, 2000; FERNANDES et al., 2002).

Tabela 7. Conteúdo (% amostra fresca) de ácidos (poli)fenólicos presentes nos cafés verdes das espécies *Coffea arabica* e *C. conephora*

Ácidos (poli)fenólicos	<i>Coffea arabica</i> (% amostra fresca)	<i>C. conephora</i> (% amostra fresca)
Ácido 5-clorogênico	3,0- 5,6	4,4- 6,5
Ácido 4-clorogênico	0,5- 0,7	0,7- 1,1
Ácido 3-clorogênico	0,3- 0,7	0,6- 1,0
*Ácido 3, 4-dicafeoilquínico	0,1- 0,2	0,5- 0,7
*Ácido 3, 5-dicafeoilquínico	0,2- 0,6	0,4- 0,8
*Ácido 4, 5-dicafeoilquínico	0,2- 0,4	0,6- 1,0
Ácido 3-feruloilquínico	traços	0,1
Ácido 4-feruloilquínico	traços	0,1
Ácido 5-feruloilquínico	0,2	1,0
*Ácido 5-feruloil 4-cafeoilquínico	0	traços

Fonte: www.ico.gov , 2004. * ácidos que possuem o ácido caféico como precursor.

Outros compostos fenólicos presentes nos grãos de café são os ácidos ferúlico, *p*-cumárico, sinápico, metilúrico, vanílico e hidroxibenzóico, os flavonóides campferol e quercetol, além de diterpenos como o cafestol e caveol e óleos essenciais (aldeído cinâmico, por exemplo), entre outros.

2.3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CACAU

Alimentos e bebidas derivadas de sementes de cacau têm sido consumidos pelo homem desde 460 A.C. (CARNÉSECCHI et al., 2002).

Os grãos de cacau são constituídos por mais de 500 substâncias (HURST et al., 2002), sendo que o número de compostos voláteis supera a 300, incluindo ésteres, hidrocarbonolactonas, pirazinas e pirróis, entre outros. Os componentes mais importantes para o *flavor* dos produtos derivados são os ésteres alifáticos, os (poli)fenóis, as pirazinas, as dicetopiperazinas e a teobromina (FAO, 2004; Purdue University, 2004). Os compostos de maior significância nutricional presentes em biomassas de sementes de cacau *in natura* são discriminados na tabela 8.

Tabela 8. Teor dos principais constituintes químicos em 100g de sementes (amostra fresca) de cacau *in natura*.

Constituintes	Sementes (100g – amostra fresca)
Celulose	3,38 g
Aminoácidos	
Arg	0,08 g
Glu	1,02 g
Gly	0,09 g
His	0,08 g
Ils	0,56 g
Leu	0,45 g
Lys	0,08 g
Phe	0,56 g
Thr	0,14 g
Água	3,6 g
Proteína	12,0 g
Lipídios	46,3 g
Carboidratos	34,7 g
Fósforo	537 mg
Cálcio	106 mg
Fibras	8,6 g
Ferro	3,5 mg
Fósforo	537 mg
Ácido ascórbico	3 mg
Niacina	1,7 mg
Riboflavina	0,14 mg
Tiamina	0,17 mg

Fonte: Purdue University, 2004.

A partir da biomassa das sementes de cacau são obtidos diversos produtos derivados, amplamente consumidos mundialmente, como chocolates, balas e achocolatados, entre outros. Para tal, as sementes de cacau *in natura*

são submetidas a processos de secagem, moagem e remoção de componentes lipídicos, gerando como matérias-primas o cacau em pó desengordurado e o cacau em pó solúvel. A tabela 9 apresenta a constituição em macro e micronutrientes de biomassas de cacau em pó desengordurado e solúvel.

Tabela 9. Teor de macro e micronutrientes presentes em 100g de biomassa de cacau em pó desengordurado e solúvel.

Compostos	Cacau em pó desengordurado (100g)	Cacau em pó solúvel (100g)
Proteínas (g)	23	4 a 7
Carboidratos (g)	16	78 a 82
Amido (g)	13	2 a 8
Açúcares (g)	3	70 a 78
Fibras (g)	23	7
Gorduras (g)	11	2,5 a 3,5
Gorduras saturadas (g)	6,5	-
Gorduras monoinsaturadas (g)	3,6	-
Gorduras polinsaturadas (g)	0,3	-
Energia (Kcal)	255	360 a 375
Sódio (g)	0,2	0,07 a 0,13
Potássio (g)	2	0,44 a 0,9
Cálcio (mg)	150	30 a 300
Fósforo (mg)	600	140 a 320
Ferro (mg)	20	4 a 9
Magnésio (mg)	500	100 a 125
Zinco (mg)	9	2
Tocoferol (mg)	1	0,2
Tiamina (mg)	0,37	0,07
Piridoxina (mg)	0,16	0,03
Ácido fólico (µg)	38	7,6

Fonte: ICC- Instituto del Cacao y el Chocolate, 2004.

Analisando-se de forma comparativa os dados relativos ao teor de alguns dos compostos presentes nas sementes de cacau *in natura* (tabela 8) e em pó (tabela 9), verifica-se uma redução nos teores de proteínas (1,7 a 3 ordens de magnitude), lipídios (13,2 a 18,5 ordens de magnitude), fósforo (1,7 a 3,8 ordens de magnitude), tiamina (2,4 ordens de magnitude) e, com menor intensidade, de fibras (1,2 ordem de magnitude). Por outro lado, um aumento no conteúdo de carboidratos (~2 ordens de magnitude) e ferro (1,1 a 2,5

ordens de magnitude) é observado, demonstrando a existência de alterações de composição química daquelas biomassas, principalmente oriundas do processamento, i.e., torrefação, moagem, prensa e pulverização das sementes *in natura* para a obtenção do cacau em pó.

O grupo de metabólitos secundários encontrados no cacau de natureza alcaloidal é representado particularmente pela teobromina (Fig.10- a), cujo teor médio situa-se em 1,5g%. Também são usualmente observados teores de cafeína (Fig. 9), que variam de 0,16 a 0,4g% e somente traços de teofilina (Fig. 10- b) (COSTA, 1994; PURDUE UNIVERSITY, 2004; KOYAMA et al., 2003).

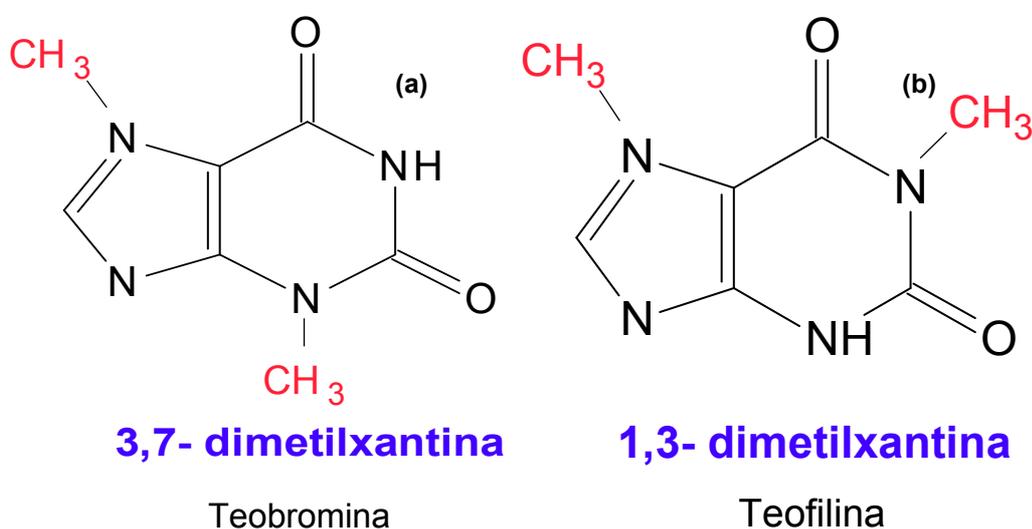


Figura 10. Detalhes das fórmulas estruturais dos alcalóides purínicos teobromina (a - 3,7-dimetilxantina) e da teofilina (b - 1,3-dimetilxantina) presentes em biomassas de cacau.

Além dos alcalóides, os compostos fenólicos compreendem cerca de 12 a 18% do amostra fresca das sementes de cacau, constituindo uma importante classe de metabólitos secundários nesta espécie. Cerca de 60% destes compostos encontram-se na forma de procianidinas (também chamadas leucocianidinas), havendo também flavonóides, especialmente as catequinas, cuja fórmula estrutural básica é mostrada na figura 11, e a quercetina (FIGUEIRA; JANICK; BeMILLER, 2004). Segundo Lee e colaboradores (2003),

o cacau possui maior quantidade de compostos fenólicos em relação aos chás preto e verde e ao vinho.

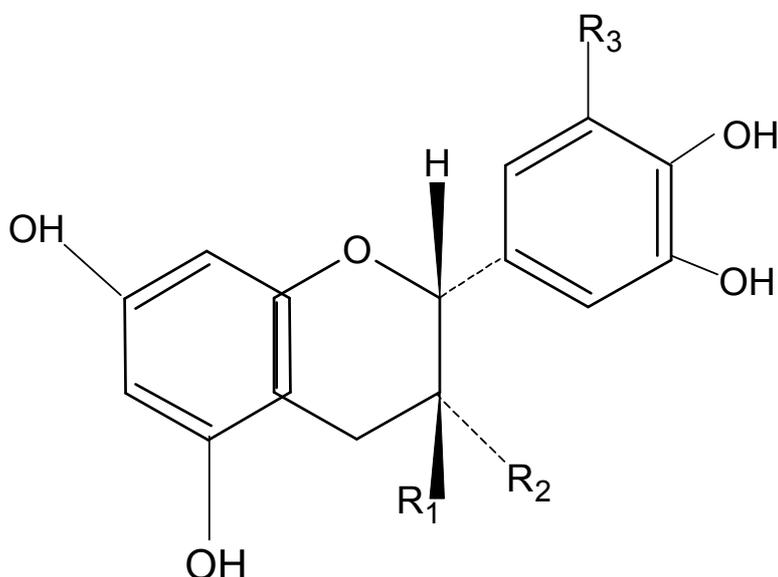


Figura 11. Fórmula estrutural de compostos flavonoídicos presentes no cacau. Catequina ($R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = H$), epicatequinas ($R_1 = R_3 = H$; $R_2 = OH$); epicatequina galato ($R_1 = R_3 = H$; $R_2 = \text{galoil}$), epigalocatequina ($R_1 = H$; $R_2 = R_3 = OH$); epigalocatequina galato ($R_1 = H$; $R_2 = \text{galoil}$; $R_3 = OH$).

Nos métodos convencionais para processamento das sementes de cacau, i.e. fermentação e torrefação, uma perda em torno de 70% do conteúdo de compostos fenólicos é observada, devido às complexas reações (bio)químicas que ocorrem na etapa de fermentação e que levam a uma diminuição do pH e aumento de temperatura (45-50°C), promovendo a oxidação química destes compostos e à sua degradação enzimática pela ação de polifenoloxidasas, β -galactosidasas e α -arabinosidasas presentes na polpa de cacau (CRUZ, 2004; HANSEN; DEL OLMO; BURN, 1998; WOLLGAST; ANKLAM, 2000). Na etapa subsequente do processamento da biomassa das sementes de cacau, i.e., a torrefação, também são observadas reduções no teor de compostos fenólicos. Em função disto, ressalta-se a importância de se estudar diferentes métodos

biotecnológicos e processos que visem um melhor aproveitamento dos constituintes químicos biologicamente ativos presentes, bem como um aumento na produção destes metabólitos pela espécie e uma redução de perda durante seu processamento. Avanços biotecnológicos acerca desta espécie são de amplo interesse tanto para a indústria de alimentos, como de fármacos e indústria química. Esta abordagem permite a caracterização refinada das biomassas utilizadas na elaboração dos produtos, conferindo-lhes qualidade superior e agregando-lhes valor econômico através da ênfase nutricional.

Vale ressaltar que o interesse pela caracterização química do cacau e seus derivados, e em particular a quantificação de compostos, é relativamente recente, quando comparado a outras fontes deste compostos, i.e. café, chás verde, chá preto e vinho (WOLLGAST; ANKLAM, 2000). Contudo, análises mais detalhadas dos fatores determinantes têm sido dificultadas, em diversos casos, devido à não disponibilização pelas empresas produtoras daquela biomassa dos parâmetros utilizados nesta etapa do processamento.

A preocupação do consumidor com relação à qualidade do alimento vem crescendo consideravelmente durante as últimas décadas, definindo, muitas vezes, um hábito de consumo de produtos que objetiva a prevenção de determinadas doenças. Em consequência disto, a busca por compostos biologicamente ativos benéficos à saúde e que estejam inseridos em biomassas presentes na dieta humana, assim como o café e cacau, altamente consumidos em todo mundo, tem se constituído em estratégia que corrobora, de forma mais significativa, na prevenção de certas enfermidades que acometem populações humanas na atualidade, notadamente aquelas relacionadas ao sistema cardiovascular e de natureza neoplásica.

Durante a última década, os avanços decorrentes dos vários estudos experimentais e epidemiológicos mostrando que o café o cacau e seus produtos derivados contêm uma grande variedade de substâncias potencialmente quimioprotetoras, despertou de forma mais acentuada o interesse das indústrias farmacêuticas para o desenvolvimento de novos fármacos, bem como a indústria de alimentos para a produção de alimentos funcionais. Segundo a Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999 da ANVISA

(Agência Nacional de Vigilância Sanitária), a alegação de propriedade funcional do alimento é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. A tendência para os próximos anos é de crescimento do mercado de produtos consumidos na dieta que reúnam propriedades profiláticas e curativas, devido à conquista de novos adeptos, pelo surgimento contínuo descobertas biotecnológicas provenientes das pesquisas científicas relacionando os produtos naturais (alimentícios e fitofarmacêuticos) a ganhos de saúde e qualidade de vida. Tais descobertas têm viabilizado a introdução de novos produtos no mercado, o que amplia o leque de alternativas ao consumidor e a dimensão do universo mercadológico. Entretanto, é possível observar de forma mais freqüente que a aceitação do consumidor, cada vez mais exigente aos novos produtos, depende da comprovação da eficácia e de garantia destes produtos pelas agências reguladoras internas e externas. Neste contexto, sugere-se como necessário e conveniente que os produtos de café e cacau disponham de seu particular perfil risco/benefício, estabelecido mediante legislação própria e adequadas provas científicas em nível clínico e epidemiológico, as quais fundamentam a sua utilidade e a eficácia.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as biomassas de café (frutos verdes) e cacau (em pó), no que concerne aos teores de metabólitos secundários de interesse: compostos alcaloidais, (poli)fenólicos e elementos minerais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos puros de alcalóides e (poli)fenóis de biomassas de cacau e café;
- Caracterizar o perfil quali/quantitativo dos extratos puros obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Analisar o efeito da composição química das amostras de café verdes (*in natura*), no que se refere ao conteúdo de fenóis totais e cafeína, em relação à qualidade da bebida café;
- Estabelecer uma análise comparativa entre os teores de, cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe), potássio (K), magnésio (Mg), manganês (Mn), zinco (Zn) e Níquel (Ni), e a qualidade da bebida café;
- Analisar os efeitos de processos de beneficiamento do café (seco e úmido), de tipos de cafés beneficiados (natural e cereja), da origem dos cafés (regiões de origem), sobre os teores de compostos químicos de interesse, i.e., fenólicos, alcalóides e minerais);
- Analisar o teor de fenóis totais do café torrado (tipo expresso);
- Avaliação comparativa entre as amostras de cacau em pó, referente aos teores de fenóis totais, cafeína, teobromina e teofilina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Obtenção da matéria-prima

As amostras de sementes de café *in natura* (café cru) e o café torrado expresso utilizadas neste trabalho foram cedidas pela Cooperativa de Cafeicultores de Guaxupé, MG (COOXUPÉ), em abril de 2003. As amostras de cacau em pó, por sua vez, foram cedidas por quatro empresas nacionais a saber: Indeca Indústria e Comércio de Cacau LTDA (Embu - SP), Allimentus Engenharia e Tecnologia LTDA (Chapecó – SC), Bretzke (Jaraguá do Sul - SC) e Frison Comércio e Representações de Gêneros Alimentícios Ltda (Rio das Pedras - SP). As características químicas das amostras de café e cacau são apresentadas nos itens a seguir, segundo a descrição dos fornecedores.

4.1.1.1. Café *in natura*

As amostras de café *in natura* (crus) utilizadas neste trabalho são da espécie *Coffea arabica*, cuja bebida é classificada pelo teste da xícara como mole (realizada na Cooperativa Cooxupé).

Segundo denominações da Cooperativa, foram utilizados quatro tipos de amostras de cafés arábica, diferenciados pelo tipo de processamento e/ou região de origem : café natural, café cereja, ,café cerrrado e café varredura.

- café natural: o fruto é seco na sua forma integral, com casca, após passagem ou não por lavadores para separação das porções bóia, dos verdes e cerejas. É o café das regiões de MG (Minas Gerais) e SP (São Paulo), porém não do cerrado.
- café cereja descascado: este processo é intermediário entre o via seca e o via úmida. Neste processo, o café é despulpado e encaminhado para secagem com a mucilagem. O perfil deste café caracteriza-se pelo equilíbrio entre acidez a corpo. Também aceita-se

como cerejas descascados os parcialmente desmucilados mecanicamente. É o café das regiões de MG (Minas Gerais) e SP (São Paulo), porém não do cerrado.

- café cerrado: é o café cultivado na região do cerrado, podendo ser natural ou cereja descascado.
- café varredura: é o café de varrição originário de qualquer região.

O tipo, a safra e os teores de minerais das amostras de grãos *in natura* estão apresentados na tabela 10. Os valores de conteúdo de minerais das respectivas amostras foram determinados no Laboratório de Química da Cooxupé, utilizando um espectrômetro de emissão atômica com plasma de argônio acoplado (ICP-AES), da Perkin Elmer, modelo Optima 3300 DVTM para os minerais, cálcio, magnésio, fósforo potássio, cobre, zinco, ferro, manganês e chumbo e espectrofotômetro UV/VIS (HITACHI modelo U2000) para o enxofre e bário.

Tabela 10. Teor dos constituintes minerais das amostras dos grãos de café *in natura*, conforme laudo da Cooperativa de Cafeicultores de Guaxupé (Cooxupé - MG, 2004).

Amostra/	Al	B	Ca	Cd	Pb	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Mo	Na	Ni	P	S	Zn
Tipo de café	mg/kg	mg/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	g/kg	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	g/kg	g/kg	mg/kg
40002871-natural	1,38	7,43	0,71	< 0.001	14,231	1,425	13,59	20,52	13,60	1,64	18,30	0,471	7,13	0,177	1,27	0,75	6,49
40002897-natural	4,08	5,74	0,89	< 0.001	13,652	1,860	11,84	22,57	11,45	1,57	50,77	< 0.001	5,22	0,581	1,09	0,91	6,56
40002923-cereja	5,93	3,90	1,10	< 0.001	11,535	1,652	11,98	21,54	16,86	2,08	37,80	< 0.001	14,76	0,020	1,41	1,19	8,41
40002929-varredura	0,21	4,05	0,80	0,021	13,130	1,559	14,06	21,74	14,85	1,84	26,93	0,469	10,40	0,364	1,28	1,17	6,93
40002949-cereja	< 0,01	3,64	0,87	< 0.001	14,135	1,246	14,42	26,94	16,49	1,98	19,10	< 0.001	8,58	0,543	1,30	1,13	6,77
40002959-cereja	3,19	3,64	0,92	< 0.001	11,571	2,140	12,44	22,35	15,67	1,80	25,67	< 0.001	13,31	0,573	1,20	1,07	5,68
40002964-cereja	2,92	2,41	0,91	< 0.001	12,467	2,262	12,76	21,55	16,04	1,83	27,23	0,126	14,86	0,625	1,23	1,15	5,83
40002965-cerrado	< 0,01	2,46	1,04	0,030	13,867	2,099	14,35	27,35	15,19	1,82	19,42	< 0.001	7,86	0,860	1,29	1,16	6,63
40002878-natural	1,75	3,03	0,83	< 0.001	11,724	1,567	11,33	30,01	13,32	1,70	25,24	0,404	7,72	0,286	1,10	0,85	8,68
40002882-natural	1,44	3,33	0,90	< 0.001	12,743	2,114	11,19	20,06	14,67	1,53	24,38	0,612	11,3	0,756	1,26	0,83	8,01
40002890-natural	1,46	3,85	0,87	< 0.001	13,086	2,225	11,49	21,04	12,28	1,49	28,81	0,842	9,13	0,070	1,12	0,64	6,60
40002901-natural	1,06	11,33	0,76	< 0.001	13,935	2,345	12,46	18,90	12,20	1,45	11,99	0,011	9,66	0,084	1,27	0,86	6,13
40002905-natural	1,50	4,46	0,68	< 0.001	13,786	1,970	11,92	30,22	12,75	1,59	19,18	< 0.001	3,74	0,256	1,20	0,92	6,75
40002928-cerrado	1,38	2,92	1,11	< 0.001	12,775	1,476	13,07	19,90	17,43	1,74	22,82	0,367	14,98	0,277	1,26	0,97	7,69
40002939-cerrado	1,42	7,07	1,06	0,059	13,119	2,030	13,50	26,89	16,66	2,18	41,23	< 0.001	13,26	0,424	1,36	0,88	9,55
Média	2,13	4,62	0,90	0,04	13,05	1,86	12,69	23,44	14,63	1,75	26,59	0,41	10,13	0,39	1,24	0,97	7,11
Desvio Médio	1,17	1,75	0,10	0,01	0,73	0,30	0,92	3,23	1,62	0,17	7,10	0,19	2,93	0,21	0,07	0,14	0,90

4.1.1.2. Café torrado

Café PRIMA QUALITÀ ESPRESSO ESPORTAZIONE, elaborado a partir de seleção dos melhores e mais perfeitos grãos de café (café cereja descascado), com *blend* 100% arábica, provindos do Sul de Minas Gerais, atendendo aos exigentes padrões do mercado europeu, sendo caracterizado como “especial” ou “premium” (torrefação especial). Na amostra de café torrado os elementos minerais não foram quantificados.

4.1.1.3. Cacau em pó

As características organolépticas e fisico-químicas das amostras de cacau em pó em estudo estão descritas nas tabelas 11, 12, 13 (Indeca Indústria e Comércio de Cacau LTDA), 14 (Allimentus Engenharia e Tecnologia LTDA), 15 (Bretzke) e 16 (Frison Comércio e Representações de Gêneros Alimentícios Ltda).

Tabela 11. Características organolépticas e fisico-químicas da amostra de cacau em pó natural INDECA.

PÓ DE CACAU NATURAL	
1. Características organolépticas	ODOR - próprio, isento de odores estranhos SABOR - próprio, isento de odores estranhos COR – característica
2. Características físico-químicas	
pH	5,0 a 5,7
Umidade	Max. 5,0 %
Gordura	10 a 12%
Granulometria	Min. 97,5%, em tela de 200 mesh
Cinzas	Max. 8,0 %
Casca	Max .1,75 %

Tabela 12. Características organolépticas e físico-químicas da amostra do pó de cacau alcalino INDECA T-350

PÓ DE CACAU ALCALINO (T-350)	
1. Características organolépticas	ODOR - próprio, isento de odores estranhos SABOR - próprio, isento de odores estranhos COR – característica
2. Características físico-químicas	
pH	6,6 a 7,0
Umidade	Max. 5,0 %
Gordura	10 a 12%
Granulometria	Min. 96%, em tela de 200 mesh
Cinzas	Max. 9,0 %
Casca	Max. 1,75 %

Tabela 13. Características organolépticas e físico-químicas da amostra de cacau em pó alcalino T-800 (cacau preto) INDECA.

PÓ DE CACAU ALCALINO (T-800)	
1. Características organolépticas	ODOR - próprio, isento de odores estranhos SABOR - próprio, isento de odores estranhos COR – característica
2. Características físico-químicas	
pH	7,3 a 8,0%
Umidade	Max. 5,0 %
Gordura	10 a 12%
Granulometria	Min. 97,5%, em tela de 200 mesh
Cinzas	Max. 13,50 %
Casca	Max. 1,75 %

Tabela 14. Características químicas da amostra de cacau em pó alcalino da ALLIMENTUS ENGENHARIA E TECNOLOGIA LTDA.

CACAU EM PÓ ALCALINO	
Umidade	< 5,0%
Lipídeos	10,0 a 12,0%
Cinzas	< 8,0%
pH	6,8 a 7,6%
Proteína	22,0 a 27,0%
Granulometria	> 99,6%

Tabela 15. Características químicas da amostra de cacau em pó alcalino lecitinado BRETZKE (Cargil).

PÓ DE CACAU ALCALINO (lecitinado)	Quantidade em 100g de biomassa seca	
Gordura:		
Saturada		6,6 %
Mono insaturada		4,1%
Poli insaturada		1,5%
Total		12,3%
Lecitina		3,3%
Proteína		20,9%
Amido		13,6%
Açúcares simples		0,5%
Total		14,1%
Fibras insolúveis (alimentar)		28,5%
Teobromina		2,3%
Cafeína		0,5%
Umidade		3,5%
Cinzas totais		8,9%
MINERAIS (mg/100g)		
K	3880	Ca 130
Na	100	Fe 30
Sulfato (como SO ₃)	130	P 580
Mg	450	Cl 40
VITAMINAS* (mg/100g)		
A	< 0,2	B3 0,57
E	2,38	Ácido pantotênico 1,43
B	10,1	
B2	0,38	
B6	0,11	

* Lecitina contém aproximadamente 35% de óleo de soja e 65% de fosfolipídios.

Tabela 16. Características químicas da amostra de cacau em pó alcalino FRISON.

CACAU EM PÓ ALCALINO (lecitinado)	
Umidade (%)	4,2
Gordura (%)	11,20
Cascas (%)	0,80
Granulometria (200 mesh)	99,6
Cinzas	9,0
Lecitina (%)	0,29
pH	6,4

As amostras descritas neste item foram utilizadas para realização de análise quantitativa dos alcalóides e fenóis totais.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Obtenção dos extratos vegetais alcaloidais e (poli)fenólicos: isolamento, purificação e dosagem.

4.2.1.1. Extração dos alcalóides

A 2g da amostra fresca moída de café e cacau foram adicionados 15 ml de solução de CaCO_3 4,7% (p/v), seguido de aquecimento brando. Em seguida, a solução foi transferida para aparato de *soxhlet*, mantendo-a sob fervura por 20 minutos. Após este período, a solução foi resfriada em temperatura ambiente e filtrada a vácuo. O extrato aquoso foi coletado e transferido para funil de separação, adicionando-se 60 ml de diclorometano, e deixado em repouso no período de três horass. O extrato diclorometânico, contendo a fração alcaloidal foi coletado, concentrado em evaporador rotativo, ressolubilizado em 3 ml de diclorometano e armazenado a -18°C .

4.2.1.2. Extração dos fenóis totais

A 2g da amostra fresca moída de café e cacau foram adicionados 15 ml de solução de CaCO_3 4,7% (p/v), seguido de aquecimento brando. Em seguida, a solução foi transferida para aparato de *soxhlet*, tendo como líquido extrato água, e mantendo-a sob fervura por 20 minutos. Após este período a solução foi resfriada em temperatura ambiente e filtrada a vácuo. O extrato aquoso obtido foi dosado para fenóis totais utilizando o reativo de Folin-Ciocalteau (MARASCHIN *et al.*, 2002), e a leitura realizada em absorbância de 725 nm (Shimadzu LC 2300).

4.2.1.3. Análise de alcalóides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foram injetadas 10 μL /amostra da fração diclorometano em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10), equipado com coluna C_{18} termostaticada (40°C), tendo como fase móvel 0,05 M NaH_2PO_4 (pH=3,9):acetonitrila:2-metoxi-etanol (80:15:5 – 2,0 ml/min). A ocorrência dos compostos de interesse foi determinada utilizando-se um detector UV-visível (Shimadzu SP-1) operando em duplo canal de leitura (207 e 276 nm). Os compostos foram identificados de acordo com seus valores de R_t , em relação aos padrões (1 mg/ml, teobromina, teofilina e cafeína – Sigma, MO - USA) previamente cromatografados e a sua dosagem foi calculada considerando-se as áreas dos picos de interesse.

4.2.1.4. Determinação dos elementos minerais Ca, Mg, P, K, Cu, Zn, Fe, Mn e Pb por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio acoplado (ICP-AES)

As amostras foram digeridas por via úmida, conforme descrito a seguir: 500 mg de amostra seca e moída foram transferidos para um tubo de ensaio, seguido da adição de 6ml de solução de HNO_3 e HClO_4 (8:1). Este material foi

incubado em bloco digestor, com aumento gradual da temperatura (50, 75, 120, 160 e 210 °C), agitando levemente. Em seguida, o extrato foi resfriado em temperatura ambiente e transferido para balão volumétrico de 50 ml, completando-se o volume com água deionizada, seguido de agitação.

O material digerido e diluído para 50 ml, então é injetado. A emissão da amostra é comparada com a emissão dos padrões de concentração conhecida STDLOW / STD1 / STD2 / STDHIGH.

ST= Standard = Padrão

STDLOW = Padrão de calibração com concentração ZERO

STD1 = PRIMEIRO PADRÃO DE CALIBRAÇÃO

STD2 = SEGUNDO PADRÃO DE CALIBRAÇÃO

STDHIGH = PADRÃO COM A MAIOR CONCENTRAÇÃO

Os padrões são preparados em balão de 100ml. A tabela 17 apresenta a concentração dos padrões expressos em mg/L.

Tabela 17. Concentração dos padrões utilizados para análise quantitativa dos minerais Ca, Mg, P, K, Cu, Zn, Fe, Mn e Pb em grãos de café *in natura*.

	STDLOW (mg/L)	STD1 (mg/L)	STD2 (mg/L)	STDHIGH (mg/L)
P	0	9,783	19,566	39,132
Ca	0	75	150	300
Mg	0	25	50	100
K	0	150	300	600
Na	0	2,5	5	10
B	0	1,5	3	6
Cu	0	0,125	0,25	0,5
Fe	0	2,5	2	10
Mn	0	2,5	5	10
Zn	0	0,25	0,5	1
Mo	0	0,05	0,1	0,2
Cd	0	0,05	0,1	0,2
Cr	0	0,05	0,1	0,2
Ni	0	0,05	0,1	0,2
Pb	0	0,125	0,25	0,5
Al	0	2,5	5	10

4.2.1.5. Determinação do enxofre por Espectrofotômetro UV/VIS, método de turbidimetria com cloreto de bário (BaCl_2)

Soluções:

- Solução-estoque de enxofre (1000 ppm);
- Soluções-padrão de sulfato (0,0; 10,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 7,0 ml da solução-estoque de 0 ppm de enxofre);
- Solução de HCl 6,0N (contendo 20 ppm de enxofre);
- Cristais de cloreto de bário ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - pureza 99%) : foram utilizados cristais de cloreto de bário (capazes de passar pela peneira de 20 mesh e que fiquem retidos na de 60 mesh) e armazenados.

Métodos e critérios de execução:

Foram adicionados 10 ml das soluções-padrão de sulfato e das amostras em erlenmeyer de 125 ml. Em seguida, adicionado 1 ml da solução de HCl 6,0 N contendo 20 ppm de enxofre e 500 mg de cristais de BaCl_2 , deixado em repouso durante um minuto, sem agitação. Após este período, a mistura foi agitada durante 30 segundos, dissolvendo os cristais, e a leitura foi realizada no prazo máximo de até oito minutos após a adição do cloreto de bário, em um colorímetro ou espectrofotômetro a 420 nm (Espectrofotômetro UV/VIS HITACHI modelo U2000).

4.2.1.6. Determinação do elemento Boro

Soluções:

- Solução 1000 ppm de boro: pesados 2,8589g de ácido bórico (conservado em dessecador) e dissolvido para balão volumétrico de 500 ml com água deionizada.
- Solução 100 ppm de boro: foram pipetados 5 ml da solução de 1000 ppm para balão volumétrico de 50 ml, completar o volume com HCl 0,1N.

- Solução 25 ppm de boro: foram pipetados 25 ml da solução 100 ppm para balão volumétrico de 100 ml, completar o volume com HCl 0,1N.
- Solução de trabalho: foi pipeta da solução de 25 ppm de boro para balão de 50 ml.
- Solução de HCl 0,1 N: foram medidos 8,5 ml de ácido clorídrico concentrado para balão de 1000 ml e completo com água deionizada.
- Azometina 0,45%: foram dissolvidos 1 g de ácido ascórbico e 0,45 g de azometina em balão de 100 ml e completo o volume com água deionizada.
- Solução Tampão: foram pesados em béquer de 600 ml, 100 g de acetato de amônio, 6 g de EDTA. Em seguida, adicionou-se 160 ml de água deionizada. Foi acrescentado vagarosamente 50 ml de ácido acético.

Métodos e critérios de execução:

Pesou-se 0,25 g da amostra seca e moída em cadinho de porcelana. Em seguida, foi calcinado (colocado em Mufla) por 2 horas a 550° C. Após este período, foi resfriado. A esta amostra, adicionou-se 10 ml de HCl 0,1 N, e deixada em repouso durante uma hora. Pipetou-se 1 ml do extrato e dos padrões, já descritos acima (0.00, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00 e 4.00 mg/L) em copos de plástico descartáveis de 50 ml, sem pipetar os resíduos presentes. Subseqüentemente, adicionou-se 1 ml de solução tampão. Nesta solução foi adicionado 1 ml de solução de azometina 0,45%, agitada (30 minutos). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 420 nm (Espectrofotômetro UV/VIS HITACHI modelo U2000).

5 RESULTADOS

5.1 Análise quantitativa de fenóis totais em biomassas de cafés crus (*in natura*) e café expresso

5.1.1. Teor de fenóis totais em amostras de café classificadas como bebida mole

A análise estatística dos valores médios do teor de fenóis totais das amostras de café, bebida tipo mole, demonstrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todas as amostras (Fig. 12).

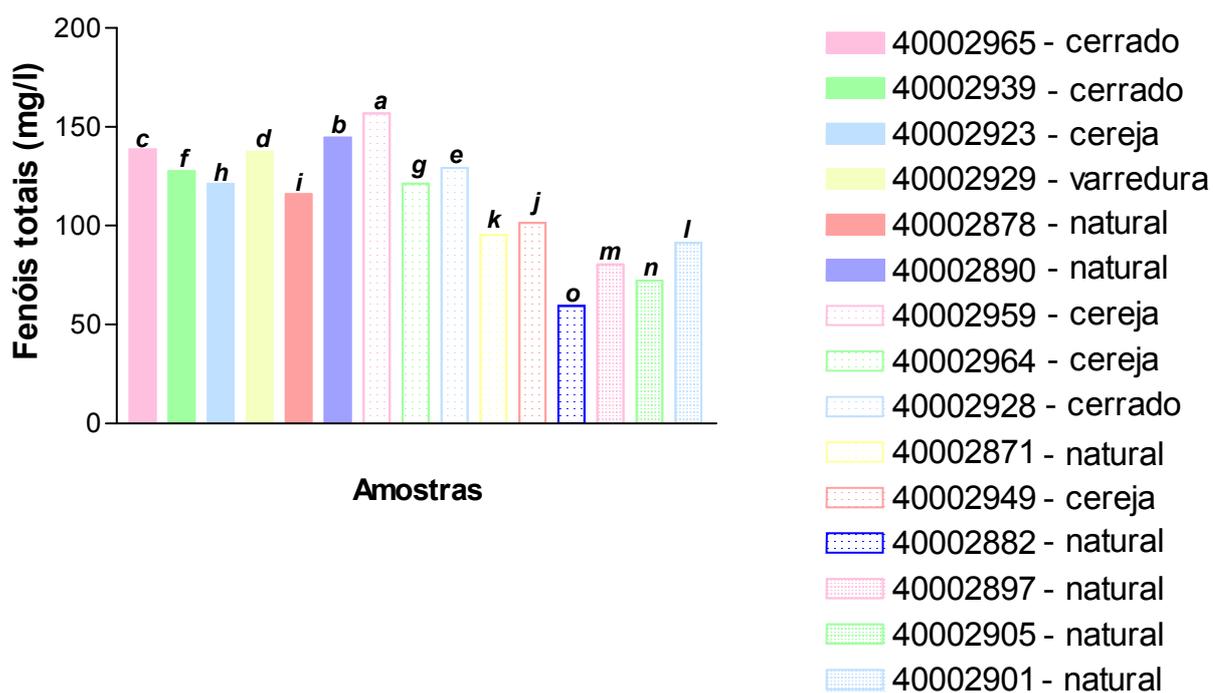


Figura 12. Teor de compostos fenólicos totais (mg/l) em amostras de grãos crus de café natural, cereja, cerrado e varredura, previamente classificados quanto à qualidade como bebida mole.

As diferenças significativas entre as amostras de cafés natural, cereja, cerrado e varredura estão expressas pelas letras (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o), determinadas pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

5.1.2. Análise do teor de fenóis totais encontrados em cafés processados por dois métodos, úmido e seco, respectivamente, cereja e natural

A análise comparativa dos teores de fenóis das amostras de cafés natural e cereja demonstrou uma diferença significativa no teor destes compostos, na faixa de 59,65 a 156,8 mg/l, apresentados na Tabela 18. Também foi observada uma maior variação no teor de fenóis entre as amostras de café natural.

Tabela 18. Resultados da média de concentração de fenóis totais \pm EPM (erro padrão da média) das amostras de cafés cereja e cafés naturais.

Amostra/ tipo de café	Fenóis totais (mg/l) *
40002959/cereja	156,783 \pm 0,001 a **
40002890/natural	144,513 \pm 0,001 b
40002964/cereja	121,881 \pm 0,003 c
40002923/cereja	121,063 \pm 0,001 c
40002878/natural	115,883 \pm 1,9 d
40002949/cereja	101,397 \pm 0,002 e
40002871/natural	95,195 \pm 0,007 f
40002901/natural	91,343 \pm 0,02 g
40002897/natural	80,436 \pm 0,01 h
40002905/natural	72,256 \pm 0,01 i
40002882/natural	59,646 \pm 0,07 j

* Média de 3 repetições por amostra.

**As diferenças significativas entre as amostras de cafés cereja e natural estão expressas pelas letras (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j), determinadas pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

5.1.3. Análise do teor de fenóis totais entre as amostras de cafés tipo natural e suas cidades de origem

Devido à diferença significativa no teor de fenóis totais entre as amostras de cafés naturais, procurou-se estabelecer uma relação com uma das variáveis que podem influenciar no teor destes, qual seja a região de origem das biomassas. De fato, a análise estatística dos dados revelou a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$) para o teor de compostos fenólicos totais, de acordo com as regiões de origem das mesmas (Fig. 13).

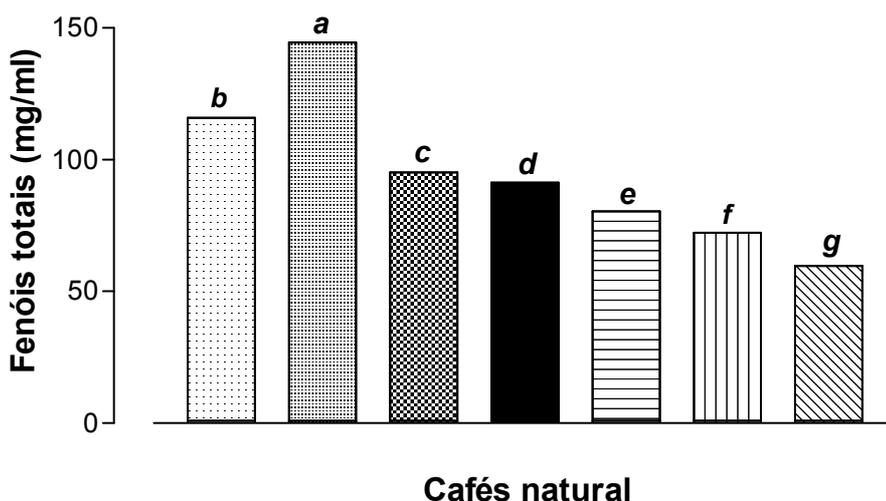


Figura 13. Média do teor de fenóis totais (mg/l) em amostras de café natural, segundo a região de origem das amostras.

As diferenças significativas entre as amostras de café estão expressas pelas letras (a,b,c, d, e, f, g), determinadas pelo Teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

5.1.4. Análise do teor de fenóis totais entre as amostras de cafés tipo varredura, cerrado e cereja.

Outro ponto relevante neste estudo refere-se à análise comparativa entre o teor de fenóis totais encontrados no café varredura e os cafés cereja e cerrado, cuja análise dos dados demonstrou haver diferenças significativas ($p > 0,05$ – Fig. 14).

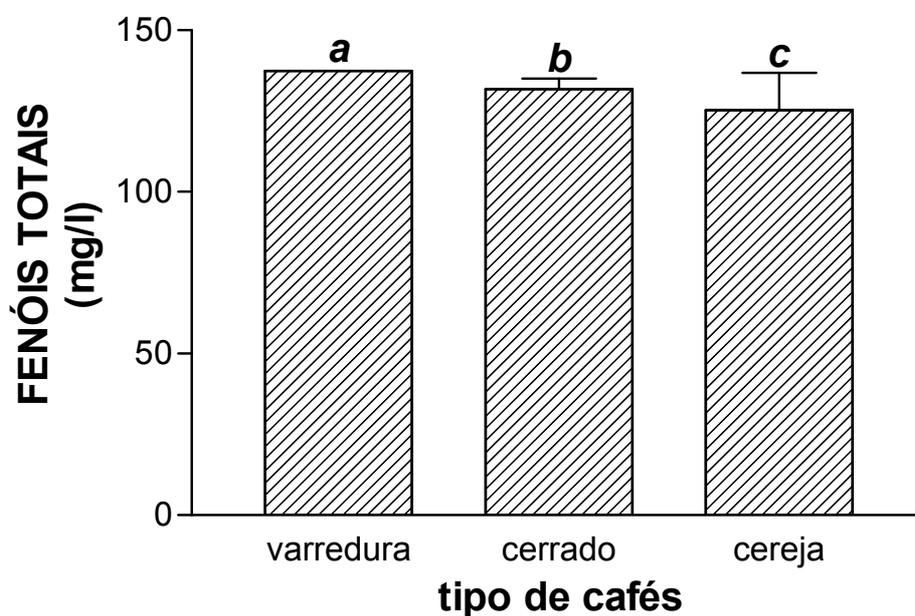


Figura 14. Média do teor de fenóis totais (mg/l) em amostras de cafés varredura e os cafés cerrado e cereja.

Diferenças significativas entre as amostras de café estão expressas pelas letras (a,b,c), analisadas pelo teste de Tukey (5%).

5.1.5. Análise do teor de fenóis totais entre as amostras de cafés *in natura* (crus) tipo natural, cerrado, cereja e varredura com café torrado tipo expresso.

Outro fato interessante é a diferença significativa observada entre os conteúdos de fenóis totais entre as amostras de café *in natura* (crus) analisados (natural, cereja, cerrado, varredura) e a amostra de café expresso (café processado - Fig. 15).

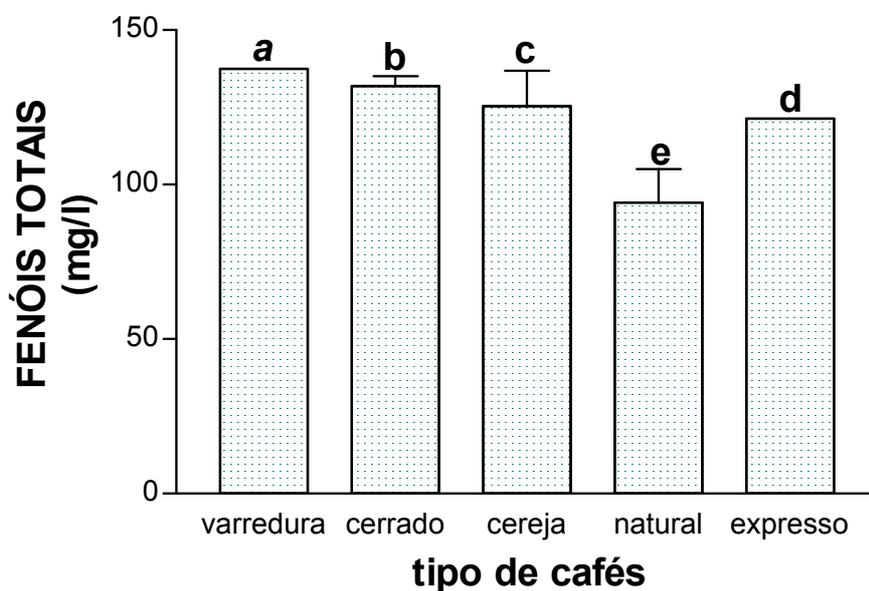


Figura 15. Média do teor de fenóis totais (mg/l) em amostras de cafés tipo *in natura* (crus) e tipo expresso.

Diferenças significativas entre as amostras de café estão expressas pelas letras (a,b,c, d, e), analisadas pelo teste de Tukey (5%).

5.1.6. Análise do teor médio de fenóis totais entre as amostras de cafés *in natura* (cru) tipo cereja e café torrado tipo expresso, elaborado a partir de cereja (ou seja, cerejas torrados).

Observou-se uma diferença altamente significativa ($p < 0,01$) correspondente aos valores médios de concentração de fenóis totais das amostras de cafés tipo cereja cru (127,94 mg/l) e a amostra de café cereja torrado (café tipo expresso - 121,45 mg/l) (Fig. 15).

5.2 Análises quantitativas de fenóis totais na biomassa de cacau em pó

Os teores de fenóis totais para as amostras de cacau em estudo estão mostrados na tabela 19.

Tabela 19. Média dos teores de fenóis totais (mg/l) entre as biomassas de cacau em pó.

Amostras (tipo/empresa)	Fenóis totais (mg/l - equivalentes ácido gálico)*
Cacau em pó alcalino/ <i>Allimentus Eng. Tec. Ltda.</i>	213,906 b**
Cacau em pó alcalino lecitinado/ <i>Bretzke</i>	150,102 d
Cacau em pó natural/ <i>INDECA</i>	187,457 c
Cacau em pó alcalino/ <i>INDECA T-350</i>	119,973 e
Cacau em pó alcalino/ <i>INDECA T-800</i>	267,382 a
Cacau em pó alcalino/lecitinado/ <i>Frison</i>	74,676 f

* Média de 3 repetições por amostra.

**Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

De forma interessante, ressalta-se que todas as biomassas em estudo diferiram significativamente ($p < 0,05$) no que se refere ao teor de compostos fenólicos totais.

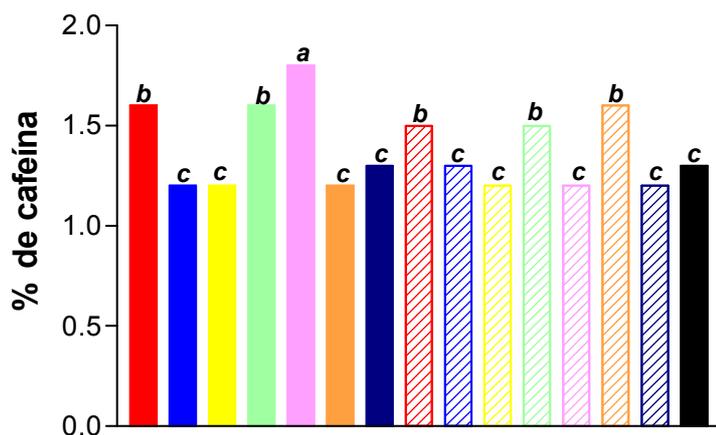
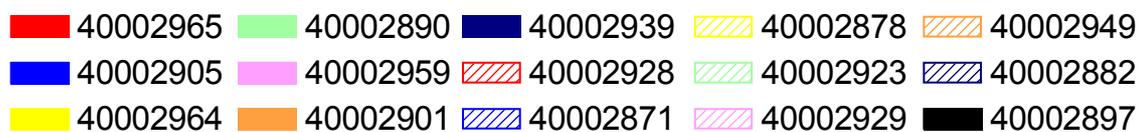
Ao comparar os dados da tabela 19 podemos constatar que as amostras de cacau em pó alcalino tipo T-800 (INDECA) e o cacau alcalino da empresa Allimentus Engenharia e Tecnologia Ltda apresentaram os maiores teores de fenóis totais, sendo estas amostras de cacau alcalinizadas.

A partir destes resultados, também foram selecionadas amostras, cacau em pó alcalino lecitinado/Bretzke (150,102 mg/l), cacau em pó natural Indeca (187,457 mg/l) e cacau alcalino Indeca T-800 (267,382 mg/l) para as análises das atividades antioxidantes citadas no capítulo a seguir.

5.3 Análises quantitativas do alcalóide cafeína na biomassa de cafés *in natura* (crus)

O composto alcaloidal de interesse farmacológico encontrado em maior quantidade tanto nas amostras de café como cacau é a cafeína. A análise cromatográfica dos extratos de cada amostra permitiu a identificação destes compostos e o cálculo dos valores de concentração.

Para as amostras de café *in natura* em estudo, o teor de cafeína detectado é demonstrado na figura 16, observando-se diferenças significativas entre as mesmas.



Amostras de cafés

Figura 16. Média do teor de cafeína entre as amostras de cafés *in natura* (crus).

Diferenças significativas entre as amostras de café estão expressas pelas letras (a,b,c), analisadas pelo teste de Tukey (5%).

O teor de cafeína presente nas amostras de cafés crus situou-se na faixa de 1,2 a 1,8 % (amostra fresca). O maior valor de concentração foi verificado nas amostra 40002959, de café tipo cereja.

5.4 Análises quantitativas de cafeína, teobromina e teofilina em biomassas de cacau em pó

O café, comparativamente ao cacau e seus derivados, é o produto que mais contribui para a ingestão de cafeína, devido ao fato de ser um dos mais consumidos e apresentar as maiores concentrações deste composto (CAMARGO, 1996). Entretanto, outras fontes ricas neste alcalóide purínico necessitam ser estudadas com maior profundidade e para tal selecionamos amostras de cacau para o desenvolvimento do estudo em tela, por ser uma biomassa altamente consumida mundialmente, notadamente sob a forma de produtos derivados.

Foram analisadas amostras de cacau quanto ao teor dos três alcalóides purínicos presentes nesta biomassa, cafeína, teobromina e teofilina, cujos resultados estão apresentados na tabela Figura 17.

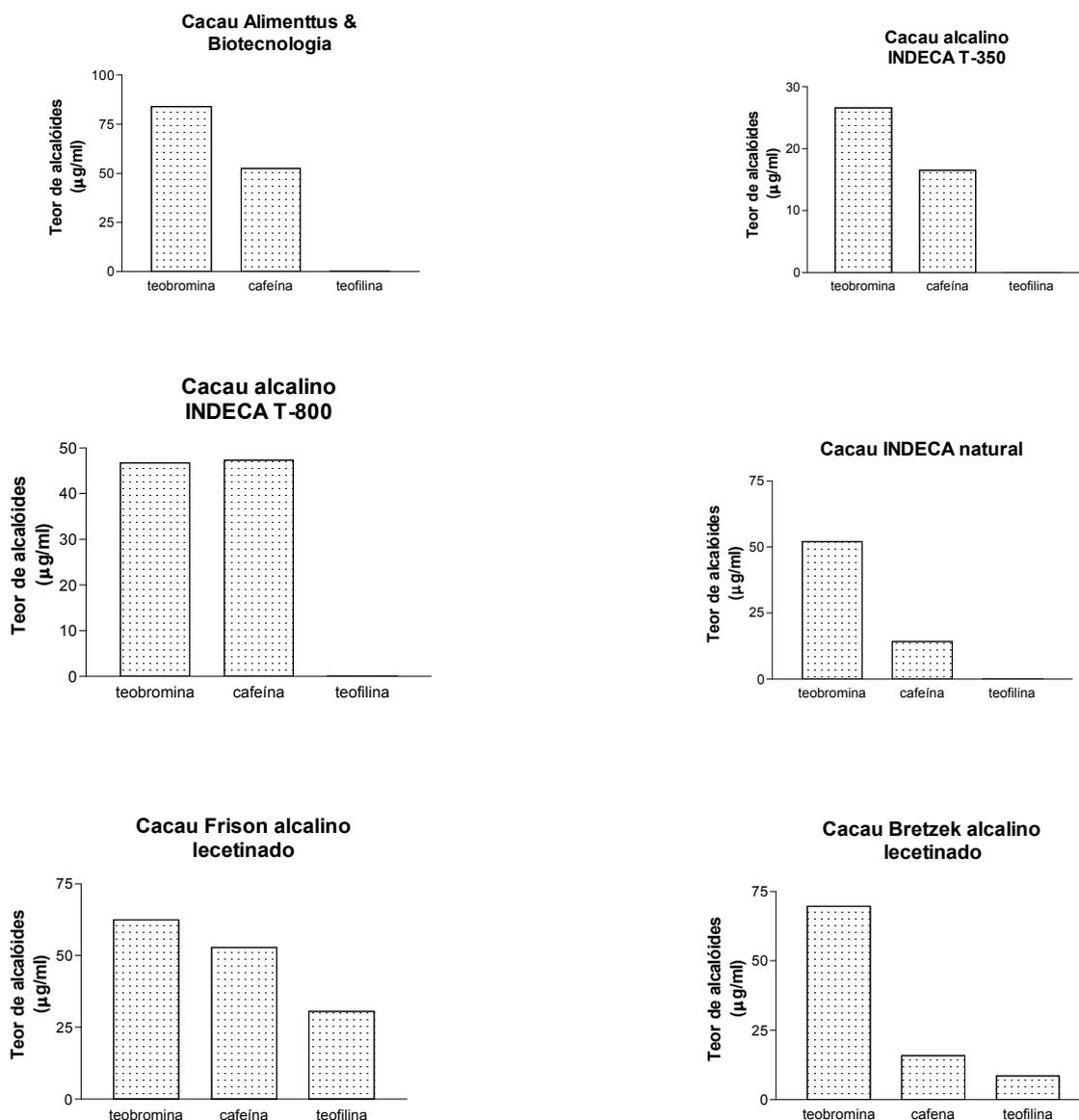


Figura 17. Resultado dos teores de alcalóides presentes nas amostras de cacau alcalino da empresa Alimentus & Biotecnologia, cacaos alcalino T-350, alcalino T-800 e natural da empresa Indeca, cacau alcalino lecetinado empresa Frison e cacau alcalino lecetinado empresa Bretzek.

Observa-se diferenças significativas ($P < 0,05$) entre todas as amostras de cacau com relação aos teores dos três alcalóides. A amostra de cacau alcalino da marca Allimentus & Biotecnologia apresentou maior teor de teobromina ($\sim 84 \mu\text{g/ml}$), seguida da amostra alcalino lecitinado Bretzek ($\sim 70 \mu\text{g/ml}$), cacau alcalino lecitinado Frison ($\sim 62 \mu\text{g/ml}$), cacau natural Indeca ($\sim 52 \mu\text{g/ml}$), cacau alcalino T-800 Indeca ($\sim 47 \mu\text{g/ml}$) e cacau alcalino T-350 Indeca ($\sim 27 \mu\text{g/ml}$).

O teor de cafeína encontrado nas amostras de cacau variou de 14 a $52 \mu\text{g/ml}$, sendo que a maior concentração foi detectada em cacau alcalino lecitinado (Frison), enquanto o menor teor foi observado na amostra de cacau natural Indeca.

O alcalóide teofilina foi observado somente nas amostras de cacaos alcalinos lecitinados das marcas Bretzke e Frison, correspondendo respectivamente a $8,62 \mu\text{g/ml}$ e $30,48 \mu\text{g/ml}$.

5.5 Análise dos teores de minerais presentes em biomassas de cafés crus

A qualidade do café também se encontra relacionada aos seus constituintes minerais, ainda que este seja um aspecto pouco estudado, comparativamente ao efeito de compostos orgânicos sobre a qualidade daquela bebida. Em função disto, e numa abordagem complementar à análise dos metabólitos secundários de interesse, determinou-se o conteúdo de elementos minerais nas amostras de café cru em estudo, conforme descrito a seguir.

5.5.1. Análise dos teores de cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe), potássio (K), magnésio (Mg), manganês (Mn), Níquel (Ni), fósforo (P) e zinco (Zn) presentes na biomassa de cafés crus.

Os teores destes minerais estão apresentados na tabela 20, comparados com os teores encontrados na literatura, segundo Tsereritnov e colaboradores (1972) e Krivan; Barth; Morales (1993).

Tabela 20. Análise dos teores médios de minerais de cafés crus (mg/Kg amostra fresca) quantificados pela Cooperativa Cooxupé, comparados com teores encontrados em literatura.

Amostras	Ca (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Fe (mg/kg)	K (mg/kg)	Mg (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Ni (mg/kg)	P (mg/kg)	Zn (mg/kg)
40002871- natural	710***	14	21	13600	1640	18	0,2	1270	6
40002897- natural	890	12	23	11450	1570	51	0,6	1090	7
40002923- cereja	1100	12	22	16860	2080	38	0,0	1410	8
40002929- varredura	800	14	22	14850	1840	27	0,4	1280	7
40002949- cereja	870	14	27	16490	1980	19	0,5	1300	7
40002959- cereja	920	12	22	15670	1800	26	0,6	1200	6
40002964- cereja	910	13	22	16040	1830	27	0,6	1230	6
40002965- cerrado	1040	14	27	15190	1820	19	0,9	1290	7
40002878- natural	830	11	30	13320	1700	25	0,3	1100	9
40002882- natural	900	11	20	14670	1530	24	0,8	1260	8
40002890- natural	870	11	21	12280	1490	29	0,1	1120	7
40002901- natural	760	12	19	12200	1450	12	0,1	1270	6
40002905- natural	680	12	30	12750	1590	19	0,3	1200	7
40002928- cerrado	1110	13	20	17430	1740	23	0,3	1260	8
40002939- cerrado	1060	14	27	16660	2180	41	0,4	1360	10
Literatura*	826	1	32	13816	1794	17	n.d.	n.d.	4
Literatura**	4000	33	140	18800	3000	60	n.d.	n.d.	10

* TSERERITNOV et al., 1972.

** KRIVAN; BARTH; MORALES, 1993.

*** Em azul estão grifadas as amostras que apresentam valores inferiores aos da literatura.

Da análise comparativa dos dados obtidos para as amostras de café cru em relação aos valores reportados na literatura citada, observa-se que em quatro amostras foram obtidos valores inferiores aos níveis encontrados em literatura no que se refere ao cálcio (< 826 mg/Kg – 4 amostras), ferro (< 32

mg/Kg - todas as amostras), potássio (< 13816 mg/Kg - seis amostras), magnésio (< 1794 mg/Kg - oito amostras), manganês, (< 17 mg/Kg - uma amostra). Com relação aos elementos zinco e cobre, todas as amostras apresentaram valores similares ao descrito na literatura anteriormente referida. Ressalta-se, contudo, que para nenhum dos minerais analisados foram observados valores acima dos encontrados na literatura.

5.5.2. Análise dos teores de cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), magnésio (Mg), fósforo (P), Níquel (Ni), zinco (Zn) e potássio (K), em grãos crus de cafés tipo natural, cerrado, cereja e varredura.

Comparativamente, entre todos os elementos minerais analisados, observou-se em ordem decrescente, teores superiores de potássio, seguido do magnésio, fósforo e cálcio. Também observou-se apenas traços de níquel nas amostras em estudo (0,2- 0,9 mg/Kg) (Fig. 18).

Entre os cafés natural, cerrado, cereja e varredura os elementos que não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) foram o magnésio, potássio, fósforo e cobre.

Na figura 18 estão apresentados os teores médios dos minerais mencionados, comparando-os com os tipos de cafés analisados: cerrado, natural, cereja e varredura.

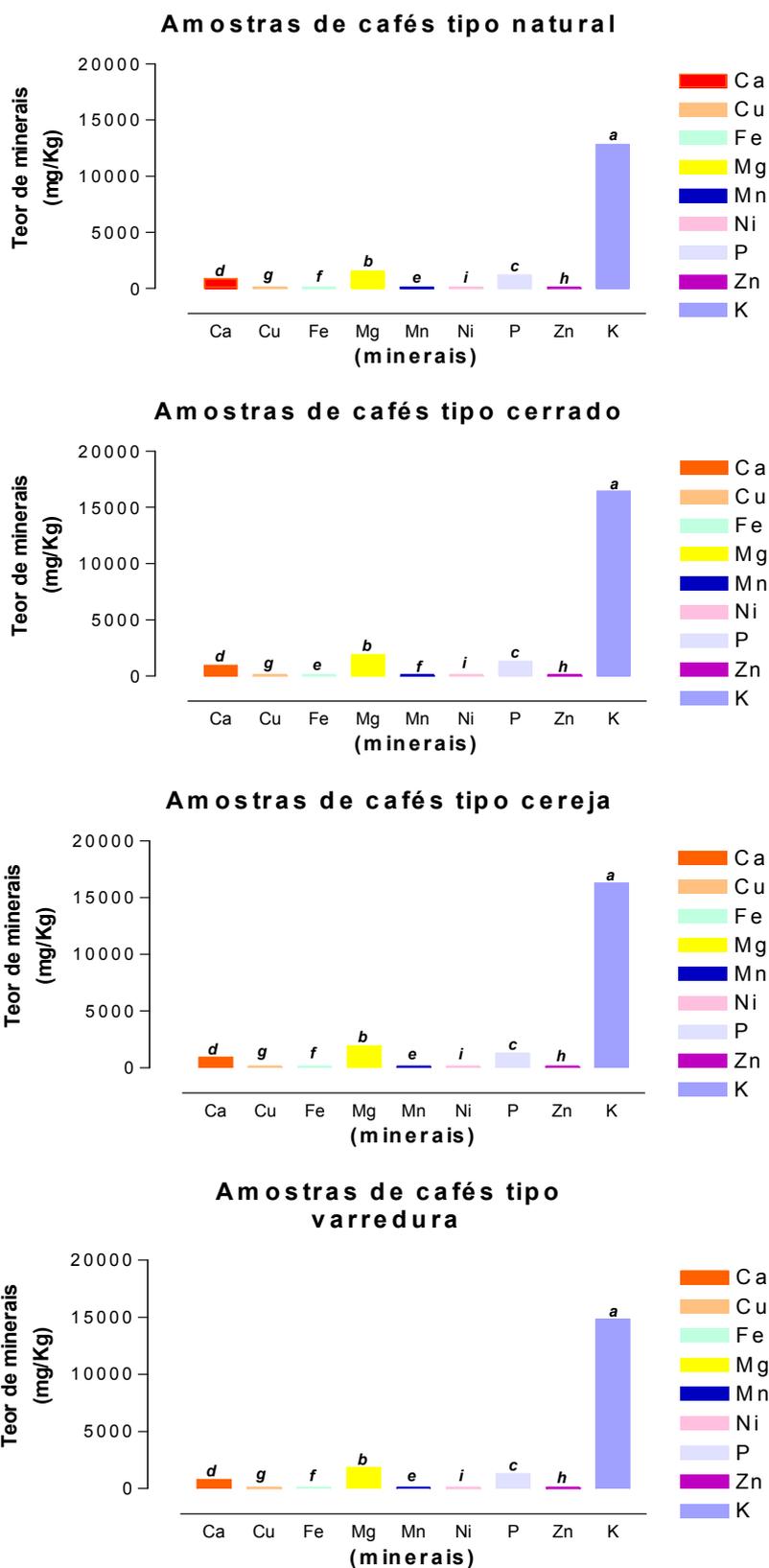


Figura 18. Análise do teor médio dos minerais Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Zn e K, presentes nas amostras de café *in natura*: cerrado, natural, cereja e varredura, respectivamente. Diferenças significativas entre as amostras de café expressas pelas letras (a, b, c, d, e, f, g, h, i), analisadas pelo Teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

Este estudo objetivou a quantificação de compostos fenólicos, alcaloidais e de elementos minerais em biomassas de café *in natura* e cacau em pó e sua relação com a qualidade destas.

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de otimizar os métodos analíticos para a caracterização dos tipos de bebidas de café, relacionando a composição físico-química dos grãos e a qualidade da bebida obtida. Atualmente, esta classificação nas unidades produtoras (cooperativas, por exemplo) é realizada pelo teste de xícara (teste sensorial).

Tal abordagem decorre do fato de que diversos estudos têm demonstrado a correlação da composição química dos grãos de café, as atividades das polifenoloxidase e peroxidase nestas biomassas e a qualidade da bebida de café, por exemplo (AMORIM, 1978; LEITE, 1991; CHAGAS, 1994; CARVALHO et al, 1994; PIMENTA, 1995; SOUZA, 1996; LOPES, 2000; FERNANDES, 2001). Carvalho e colaboradores (1994) realizaram avaliações físico-químicas e químicas de grãos beneficiados de café previamente classificados quanto à qualidade em bebida e, a partir de seus resultados, elaboraram uma tabela de classificação da bebida baseada na atividade da polifenoloxidase. Para Amorim e Silva (1968), a polifenoloxidase age sobre os polifenóis diminuindo sua ação antioxidante sobre os compostos aldeídicos, interferindo negativamente no sabor e aroma do café após a torrefação.

No presente trabalho, analisando-se os teores de compostos fenólicos totais em um mesmo tipo de bebida, elaborada a partir de grãos crus de café previamente classificados quanto à qualidade da bebida (bebida mole), foram verificadas diferenças significativas, ($p < 0,05$) entre as amostras, com valores de concentração distribuídos na amplitude de 59,6 mg/l a 156,8 mg/l. Tal variação indica a existência de um conjunto de fatores (a)bióticos determinantes da qualidade da biomassa, cuja ação poderá se dar de forma isolada ou interativa, dificultando a elaboração de conclusões precisas a respeito da relação entre o conteúdo de compostos fenólicos e a qualidade das amostras de café cru. Neste contexto, é sugerida a realização de estudos mais

detalhados com vistas a detectar os fatores ecológicos relevantes à obtenção de biomassas de café de qualidade superior, bem como envolvendo um número maior de variedades desta bebida (estritamente mole, apenas mole, dura, riada, rio e rio zona- BÁRTHOLO; GUIMARÃES, 1997), no intuito de desenvolver um padrão de classificação relacionado com o teor dos compostos em estudo (cafeína, fenóis totais e elementos minerais).

Com base no conhecimento dos efeitos dos estádios de maturação sobre a qualidade da bebida café, tem sido observado que os cafés mais maduros, como o tipo cereja, produzem uma bebida de melhor qualidade decorrente de sua menor concentração de substâncias fenólicas, fato que torna a bebida mais suave ao paladar (CARVALHO; CHAGAS; SOUZA, 1997). No presente trabalho, esta afirmação pode ser comprovada, pois o café cereja apresentou um teor inferior de fenóis totais em relação às amostras de café tipo cerrado e varredura.

A análise comparativa dos teores de fenóis das amostras de café natural e cereja (assim denominados pela Cooperativa), oriundas de distintos processos de beneficiamento, revelou uma diferença significativa no teor deste composto, na faixa de 5% a 7%, respectivamente. O café natural é processado pela via seca, onde os grãos são colocados no “terreiro” de concreto e expostos ao sol, sendo removidos periodicamente para impedir fermentações indesejáveis (i.e. causadas por fungos das espécies *Fusarium*, *Cladosporium*, *Penicillium*) (CARVALHO; CHAGAS; SOUZA, 1997). Para o café tipo cereja, a casca e a polpa do fruto são retirados e as sementes com a mucilagem é colocada para secar no terreiro. Segundo Santos (2004), a bebida de melhor qualidade é obtida quando as biomassas são preparadas conforme o descrito para o café tipo cereja descascados. Sabendo-se que uma maior concentração de fenóis é responsável pela adstringência da bebida, observou-se no café cereja uma alta concentração dos compostos, quantidade essa que foi insuficiente para influenciar no sabor da bebida, sendo esta classificada como bebida mole (SANTOS, 2004). O café cereja deveria, segundo o mesmo autor, apresentar uma menor quantidade de fenóis, porém, isto não foi observado neste estudo.

Devido às diferenças significativas no teor de fenóis totais entre as amostras de cafés naturais analisadas, procurou-se estabelecer uma relação entre o teor destes compostos e as características climáticas de suas regiões de origem. Vale ressaltar que todas as amostras analisadas foram previamente classificadas pelo teste da xícara como bebida mole. Entretanto, apesar de observado um maior teor de compostos fenólicos totais (144,5 mg/l) no café natural provindo da região de Arceburgo (Sul de Minas Gerais) com relação aos grãos de café da região de Mococa (59,6 mg/l - Nordeste de São Paulo), sugere-se que a aptidão climática destas regiões não influenciou na qualidade da bebida, conforme determinado pelo teste da xícara. Segundo Cortez (1997), os fatores climáticos representam uma variável capaz de modificar ou acentuar a qualidade da bebida. Em estudos compreendendo as regiões da zona da mata (Caratinga, Manhuaçu), do vale do Jequetinhonha (Itamarandina, Novo Cruzeiro, Capelinha, Minas Novas), centro-sul (Bambuí, Carmo do Rio Claro), centro-oeste (Machado, Ouro Fino), o triângulo mineiro, o alto Paranaíba e regiões de cultura irrigada (Paracatu, Bonfinópolis de Minas, Araguari), o referido autor verificou haver diferenças de qualidade das biomassas decorrentes da região de origem, as quais foram atribuídas aos fatores climáticos típicos de cada procedência (CHAGAS; MALTA, 2003).

Outro ponto relevante neste estudo ao comparar-se o teor de fenóis totais do café varredura com as demais amostras, é o fato de terem sido detectadas diferenças significativas entre as amostras para o teor destes compostos. Tal fato está em concordância com dados de literatura, uma vez que os grãos colhidos no chão (varredura) podem apresentar acentuadas modificações nos teores de compostos fenólicos, i.e., redução, pois estão mais suscetíveis à contaminação por fungos, leveduras e bactérias, os quais podem acarretar mudanças de composição daquelas biomassas, via processo fermentativo, com a produção de compostos químicos indesejáveis, além da degradação de compostos desejáveis ao bom sabor da bebida. Além disto, é importante considerar que qualquer injúria no grão (lesão mecânica pela queda, por exemplo) pode levar à deterioração da qualidade da biomassa final (CARVALHO; CHAGAS; SOUZA, 1997; SOUZA; CARVALHO, 1997). É

importante considerar que no presente estudo apenas uma amostra de café tipo varredura foi analisada, de modo que se faz necessário um estudo incorporando um maior número de amostras de cafés desta classificação para que um perfil conclusivo deste parâmetro possa ser traçado.

De posse dos teores médios de fenóis totais (mg/l) de todas as amostras de cafés crus (*in natura*), i.e cereja, natural, cerrado e varredura, selecionou-se uma amostra de café expresso (café torrado), para fins comparativos. A análise dos dados demonstrou haver diferença altamente significativa nos teores destes compostos entre os cafés ($p < 0,01$). Este resultado corrobora com estudos de Illy e Vianni (1996), pois os fenóis apresentam instabilidade à temperatura, sendo degradados durante a torra. Tal fato explica, em alguma extensão, o teor diferenciado destes metabólitos secundários das amostras de cafés crus, comparativamente à amostra de café expresso. Entretanto, faz-se necessário ressaltar que diferenças significativas entre as amostras de cafés crus também foram detectadas. De forma similar, um segundo aspecto analisado foi a relação no teor de fenóis entre o café cereja cru (*in natura*) e o café expresso, uma vez que este último foi elaborado de cafés tipo cereja, porém, torrados. A análise dos dados revelou a existência de diferença altamente significativa no teor destes compostos ($p < 0,01$), corroborando os resultados obtidos no experimento anteriormente.

Assim como o café, a biomassa de cacau também é uma rica fonte de substâncias fenólicas. Porém, a quantificação destes é relativamente recente, quando comparada a outras biomassas fontes destes compostos que não o café, i.e. chá verde, chá preto e vinhos tintos. A pequena disponibilidade de dados científicos acerca deste produto também se deve à falta de informações disponibilizadas pelas empresas produtoras de derivados do cacau (WOLLGAST; ANKLAM, 2000).

O cacau consumido tanto na forma de cacau em pó como de seus produtos derivados é uma rica fonte de compostos fenólicos, sobretudo catequinas (37%), antocianinas (4%) e proantocianidinas (58% - WOLLGAST; ANKLAM, 2000). Durante o processamento das amêndoas de cacau, são observadas mudanças na composição química desta biomassa, decorrentes do

processo fermentativo e da torrefação, por exemplo. Na etapa de fermentação, o teor de compostos fenólicos solúveis é reduzido em cerca de 20%, como consequência não somente de eventos oxidativos, mas da difusão destes compostos no meio de fermentação (HANSEN; DEL OLMO; BURN, 1998; WOLLGAST; ANKLAM, 2000). De forma similar, ao teor de procianidinas são acarretadas reduções da ordem de 3% a 5%, enquanto as antocianinas são convertidas a antocianidinas. Há uma correlação negativa entre o teor de procianidinas e a duração do período fermentativo, ocorrendo uma alteração de cor das sementes de púrpura para marrom (WOLLGAST; ANKLAM, 2000). Na etapa subsequente do processamento da biomassa das sementes de cacau, i.e. a torrefação, também são observadas reduções no teor de compostos fenólicos.

As biomassas de cacau em pó analisadas no presente trabalho são comercializadas e destinadas para fins alimentícios em indústrias de biscoitos, bolos e confeitos, balas, bombons, chocolates e coberturas, achocolatados, leites achocolatados, além das indústrias farmacêuticas e de aromas. Todavia, não foram encontrados dados na literatura, que permeassem estabelecer alguma relação entre a composição química destas biomassas e a qualidade do produto final.

Comparativamente, as médias dos teores de fenóis totais (mg/l) entre as biomassas de cacau em pó estudadas apresentaram diferenças significativas, com valores de concentração situando-se na faixa de 74,7mg/l a 267,4 mg/l. De forma similar ao verificado para as amostras de café, a amplitude de variação no teor de fenóis entre as amostras é atribuída às inúmeras variáveis relacionadas tanto à origem das biomassas como às etapas de processamento.

O maior teor de compostos fenólicos totais foi detectado nas amostras de cacau em pó alcalinizadas, T-800 (INDECA) e Allimentus Engenharia e Tecnologia Ltda, respectivamente, 213,9 mg/l e 267,4 mg/l. O processo de alcalinização, segundo Wollgast e Anklam (2000), gera mudanças na cor do produto e no *flavor*, assim como pode determinar reduções do conteúdo de compostos fenólicos. Todavia, a análise comparativa em relação

ao cacau natural destas amostras, uma vez que não foram disponibilizadas amostras de cacau natural pelos fornecedores acima mencionados.

Outros compostos do metabolismo secundário que têm sido bastante estudados são os alcalóides, notadamente a cafeína, a teobromina e a teofilina. Contudo, resultados contraditórios quanto ao efeito da concentração destes compostos em relação à qualidade da bebida existem, de forma que estudos mais aprofundados necessitam ser realizados como estratégia para a obtenção de um melhor entendimento do contexto em tela.

O alcalóide cafeína está presente em quantidades variáveis nas espécies de café, sendo que os teores médios deste alcalóide obtidos no presente trabalho, corroboram com aqueles encontrados por Tango (1971), Clifford (1975) e Njoroge (1981), citados por Pimenta (1995), Illy; Vianni (1996) e ICO (2004), onde uma amplitude de concentração de 0,6% a 1,5% (p/p) foi observada.

Segundo Illy e Vianni (1996), o teor de cafeína não tem efeito direto na qualidade sensorial da bebida, enquanto para Fernandes e colaboradores (2002), a cafeína é responsável por 10% do amargor da bebida, ainda que os valores de concentração normalmente observados e similares aos detectados no estudo em tela não interfiram na qualidade da mesma.

É de interesse ressaltar que todas as amostras de café cru analisadas e também o café torrado apresentaram teores de cafeína dentro da legislação vigente. A legislação 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde estabelece o mínimo de 1% (p/p) de cafeína em cafés crus, enquanto a portaria 377 do mesmo órgão, publicada em 26 de abril de 1999, estabelece um mínimo de 0,7g de cafeína/100g de café torrado (0,7%, p/p).

No que se refere ao cacau, segundo Costa (1994) e Koyama e colaboradores (2003), a teobromina é o alcalóide predominante nesta biomassa, fato que pode ser comprovado no presente estudo, com exceção à amostra de cacau alcalino T-800 INDECA, onde a cafeína mostrou-se como o composto majoritário. Além disto, para todas as amostras em estudo a teofilina mostrou-se como o alcalóide de interesse com a menor concentração.

A lecitina é muito utilizada na indústria alimentícia por ser um agente emulsificante (HAN, 1994). As amostras de cacau alcalinas lecitinadas Frison e Bretzke apresentam conteúdos de teofilina de 3,0% (p/p) e 3,3% (p/p), respectivamente, sendo estas as únicas amostras que apresentaram tal composto. Porém, possíveis relações químicas entre a molécula de lecitina e teofilina não foram encontradas na literatura.

É de interesse ressaltar que todas as amostras de cacau analisadas, apresentam teores de teobromina dentro da legislação vigente. Todavia, com relação à cafeína, 50% das amostras não apresentaram valores de concentração adequados à legislação vigente, i.e., cacau natural e cacau alcalino T-350 Indeca e cacau alcalino lecitinado Bretzek. A legislação 12/78, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), do Ministério da Saúde, estabelece o mínimo de 1% a 4% (p/p) de teobromina e cafeína em amostras de biomassas de cacau em pó, todavia, sugere-se que estudos mais aprofundados no contexto do presente trabalho sejam realizados, a fim de estabelecer uma relação entre composição química das biomassas de cacau e a qualidade da matéria-prima e dos produtos derivados.

Numa terceira abordagem da relação composição química-qualidade de biomassas vegetais, observa-se que este último parâmetro também se mostra como função de seus constituintes minerais. Assim, e considerando que alguns elementos minerais são essenciais ao funcionamento metabólico normal do organismo humano, o café cru constitui-se em fonte de macrominerais tais como o cálcio, potássio, magnésio e sódio, além dos microminerais cromo, cobre, ferro, manganês, zinco, bário alumínio e cobalto (NORTHMORE, 1965; UKERS, 1976; CARVALHO; CHAGAS; SOUZA, 1997; OLIVEIRA; MARCHINI, 1998; MORGANO et al., 2002).

Comparativamente aos dados obtidos por TSERERITNOV et al. (1972) e KRIVAN; BARTH; MORALES (1993), foram obtidos valores inferiores de concentração ferro (< 32 mg/Kg) para todas as amostras em estudo, de cálcio (< 826 mg/Kg – 3 amostras), potássio (< 13816 mg/Kg - 6 amostras), magnésio (< 1794 mg/Kg – 8 amostras) e manganês (< 17 mg/Kg – 1 amostra). Com relação aos elementos zinco e cobre, todas as amostras apresentaram valores

de concentração consoantes ao descrito na literatura, sendo que para nenhum dos minerais analisados foram observados valores acima dos encontrados na literatura.

Uma consideração importante refere-se à relação entre os teores de K, Ca e N e a qualidade da bebida. Segundo Carvalho, Chagas e Souza (1997), altos níveis de cálcio e potássio nos grãos são depreciativos da qualidade da bebida, respectivamente, em concentrações superiores a 0,11 % (p/p) e 1,75 % (p/p). Já a concentração de nitrogênio apresenta baixa influência sobre a qualidade da bebida, observando-se apenas pequenas modificações de classificação da bebida de apenas mole para mole, ou seja, de bebida de sabor suave com leve adstringência para bebida de sabor suave, acentuado e adocicado, sendo esta última de melhor qualidade (AMORIM et al., 1973).

A composição mineral dos tecidos vegetais pode ser influenciada por uma série de fatores pertinentes à própria planta e ao ambiente, i.e. espécie, variedade ou porta-enxerto, estágio vegetativo e idade da planta, tipo e manejo do solo e interações entre nutrientes e estado fitossanitário da planta (MARTINEZ et al., 2003). Assim, a obtenção de padrões de qualidade apropriados a partir da análise da composição dos grãos de café é de fundamental importância.

As análises realizadas para os teores de minerais entre os tipos de cafés, natural, cerrado, cereja e varredura mostrou diferenças significativas, sobretudo nos teores de magnésio e potássio. Contudo, faz-se importante ressaltar a carência de dados científicos relacionados às variações de composição mineral entre os cafés oriundos de diferentes práticas de cultivo, regiões de plantio e processamento dos grãos, por exemplo, com a qualidade da bebida, um fato que dificulta sobremaneira a elaboração de conclusões acerca dos efeitos deste parâmetro em relação à qualidade fina do produto e da bebida. Para tanto, sugere-se a realização de estudos mais aprofundados como forma de avançar no entendimento dos efeitos destes elementos sobre a qualidade da bebida café.

A caracterização química qualitativa e quantitativa de biomassas de café e cacau é importante na busca da padronização do perfil químico de biomassas

que possam estar relacionados à qualidade de produtos finais derivados. Com isto, é possível vislumbrar a possibilidade de redução do tempo e dos custos das análises, através do desenvolvendo e validação de métodos analíticos padronizados, disponibilizando ao consumidor produtos mais seguros e, portanto, de qualidade superior, dada à ação benéfica à saúde humana de um conjunto de compostos químicos presentes nestas biomassas.

7. CONCLUSÕES

- Em razão das diferenças significativas encontradas nas amostras de cafés *in natura* analisadas, referentes aos teores de compostos químicos (fenóis totais, cafeína e elementos minerais), podemos concluir que estes não são parâmetros satisfatórios para utilizar como padrão de classificação da bebida de café.
- Os cafés torrados apresentam menores teores de fenóis totais com relação aos cafés *in natura*, fato que corrobora com a literatura.
- A relação entre composição química das amostras de cacau em pó e a qualidade de seus produtos requer estudos mais aprofundados, uma vez que neste trabalho foram analisadas somente cacaos em pó, sem compará-los com produtos derivados destes (i.e achocolatados, bolachas e chocolate).
- Com relação às diferenças significativas nos teores de fenóis totais, cafeína, teobromina e teofilina das amostras de cacaos em pó, não é possível estabelecer conclusões relacionado-os com a qualidade, devido a ausência de dados científicos.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- A caracterização química do café *in natura* (cru) pode apresentar-se como método para averiguação da qualidade do produto final, podendo constituir um método analítico para classificação da bebida, uma vez que esta classificação até hoje é realizada pelo teste da xícara (teste sensorial), utilizando-se grãos processados.
- A caracterização química do cacau em pó pode contribuir para estudos relacionados a qualidade do produto (relação química-qualidade), assim como seus derivados.

CAPÍTULO II

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES EM BIOMASSAS DE CACAU E CAFÉ

9 INTRODUÇÃO

Uma parte considerável das substâncias de origem vegetal com ação preventiva de doenças que acometem a população humana provém do metabolismo secundário de plantas, sendo que os alcalóides e compostos fenólicos constituem exemplos significativos. Estes compostos, denominados fitoquímicos segundo a *America Dietetic Association*, são definidos como : “substâncias encontradas em vegetais, que podem ser ingeridos diariamente, em quantidades da ordem de gramas, e apresentam potencial para modular o metabolismo humano, prevenindo contra diversas doenças e disfunções”. Estes compostos também vêm sendo designados como “quimiopreventivos”, i.e, substâncias presentes nos alimentos cuja investigação científica definiu uma ação, ou um conjunto de ações profilática(s), sobre o organismo humano, tal como inibidores da carcinogênese (*America Dietetic Association*, 2004).

Em função disso, e por estarem presentes em biomassas inseridas na alimentação cotidiana do homem, como é o caso do café e cacau, tem sido denotado aos compostos fenólicos e alcaloidais interesse crescente por parte da comunidade científica. Estudos epidemiológicos *in vitro* e *in vivo* sugerem que estes compostos podem prevenir doenças cardiovasculares, neoplásicas e degenerativas, as quais encontram-se associadas ao desenvolvimento de novos vasos sanguíneos.

10 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

10.1 Atividades biológicas de compostos alcaloidais

Mesmo sendo distinguidos por apresentarem diferentes propriedades organolépticas (cor, sabor e aroma), tanto o café como o cacau produzem alguns efeitos similares no organismo humano (i.e. excitação, diminuição da sensação de cansaço), os quais são indicativos de certos constituintes químicos comuns na composição de suas biomassas. Dentre os compostos químicos em comum, destaca-se o grupo dos alcalóides purínicos ou xantínicos, representados com maior significância pela cafeína, teobromina e teofilina (FOYE; LEMKE; WILLIAMS, 1995; RANG; DALE; RITTER, 2001) e cujas estruturas químicas são mostradas na figura 19.

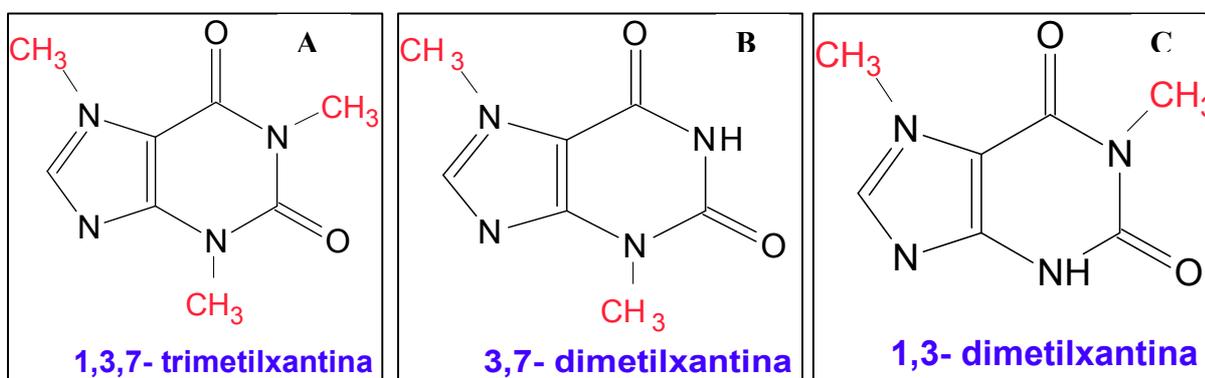


Figura 19. Estruturas químicas dos alcalóides purínicos. cafeína (A), teobromina (B) e teofilina (C), encontrados em biomassas de café e cacau.

A figura 19 evidencia uma grande semelhança de estruturas químicas entre esses alcalóides purínicos, sendo o grau de metilação e a posição dos grupamentos $-CH_3$, fatores de diferenciação deste parâmetro, concorrendo de modo determinante para a atividade biológica observada.

A cafeína e a teofilina são constituintes do café, dos chás verde e preto e do cacau, enquanto a teobromina é o componente majoritário do cacau (TYER;

BRADY; ROBBERS, 1988; HELDT, 1997; MATISSEK et al, 1997; FLATEN, 1998; REES; ALLEN; LADER, 1999; HINDMARCH et al., 2000; WEISBURGER, 2001; JANAVEL et al, 2001; RANG; DALE; RITTER, 2001; ALTIMARI et al., 2001; TOKUSOGLU; ÜNAL, 2002; ALMEIDA et al., 2003; ROGERS et al, 2003; SIMÕES et al., 2003; COSIC, 2003).

A tabela 21 apresenta um resumo das principais atividades biológicas da cafeína, da teobromina e da teofilina sobre o sistema nervoso central, sistema respiratório, a musculatura cardíaca e diurese.

Tabela 21. Propriedades farmacológicas dos alcalóides purínicos cafeína, teofilina e teobromina, em ordem decrescente (1 a 3) de intensidade de ação nos sistemas nervoso central e respiratório, musculatura cardíaca e diurese.

Alcalóide	Sistema nervoso central, respiratório e estimulação no músculo liso	Estimulação cardíaca, dilatação coronária, relaxamento do músculo liso, diurese
Cafeína	1	3
Teofilina	2	1
Teobromina	3	2

Modificado de FOYE; LEMKE; WILLIAMS, 1995.

As xantinas são utilizadas há muito tempo por populações humanas. Muito provavelmente, a cafeína tem sido utilizada desde o período paleolítico, por seu efeito estimulante do sistema nervoso central (BARONE; ROBERTS, 1984).

Na medicina, a xantina mais utilizada, segundo Rang, Dale e Ritter (2001), é a teofilina, que também pode ser utilizada sob a forma de aminofilina, i.e. teofilina-etileno-diamina. Vários estudos clínicos demonstraram que as preparações de teofilina podem ser eficazes no alívio de crises agudas e crônicas de asma, principalmente devido ao seu efeito broncodilatador. Adicionalmente, este alcalóide exerce efeitos sobre o sistemas nervoso central, cardiovascular e o trato gastrointestinal (TYER; BRADY; ROBBERS, 1988; HELDT, 1997; COSIC, 2003; SIMÕES et al., 2003; The American College of Allergy, Asthma & Immunology, 2003).

A maior parcela de pesquisas em curso na área farmacológica refere-se, contudo, à cafeína, devido à diversidade de produtos naturais que a contém,

estando presente em mais de 60 espécies de plantas distribuídas na biosfera, e por ser consumida diariamente por 80% da população em geral, através da ingestão de café, chás, chocolates, refrigerantes e medicamentos. Esta diversidade de fontes e formas de ingestão de cafeína dificulta a quantificação de seu consumo (FOCCHI, 2004). De qualquer forma, nas últimas décadas, o uso de cafeína tem crescido, sobretudo entre os adolescentes, atribuído ao aumento do consumo de refrigerantes (JAMES, 1997; STRAIN; GRIFFITHS, 2000). Em função disto, é considerada seguramente o psicotrópico mais consumido mundialmente (COSIC, 2003; ICCO, 2004).

Dentre as três xantinas citadas acima, a teobromina é considerada a de menor toxicidade (FOYE; LEMKE; WILLIAMS, 1995). O metabolismo deste alcalóide tem sido investigado e, segundo Miners, Attwood e Birkett (1982), sua eliminação é dependente da atividade da xantina oxidase, além de outros sistemas enzimáticos, presumidamente das oxidases hepáticas de função mista.

As xantinas agem no sistema nervoso central e periférico, sobretudo a cafeína, como estimulantes, inibidores do sono, diminuem a sensação de fadiga, facilitam a atividade intelectual e a criatividade, mantendo o indivíduo desperto e em estado de alerta (ALMEIDA et al., 2003; ALTIMARI et al., 2001; FLATEN, 1998; REES; ALLEN; LADER, 1999; HINDMARCH et al., 2000; RUIJTER; DE RUIJTER ; SNEL; LORIST, 2003; JANAVEL et al, 2001; ROGERS et al, 2003; SIMÕES et al., 2003; TOKUSOGLU; ÜNAL, 2002). Estes efeitos implicam em um incremento nos níveis de adrenalina e noradrenalina séricos (SIMÕES et al., 2003). Mais recentemente, a cafeína tem sido usada como coadjuvante em muitos medicamentos analgésicos, de controle do peso e alívio de alergias (ALTIMARI et al., 2001, TOKUSOGLU; ÜNAL, 2002). O mecanismo de ação da cafeína envolve a indução do acúmulo de adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (AMPc), através da inibição da atividade da fosfodiesterase (PDE) e, com isso, os sinais excitatórios da adrenalina persistem por maior período de tempo. Este alcalóide também age no bloqueio de receptores de adenosina (SNYDER, 1984; HELDT, 1997; FREDHOLM, 1999; SIMÕES et al., 2003), agindo como um antagonista. Segundo Daly e Fredholm (1998), existem quatro receptores diferentes de adenosina em

humanos e outros mamíferos. Em condições fisiológicas do cérebro, a cafeína e a teofilina bloqueiam os receptores A_{2A} , A_1 . O primeiro, presente principalmente nos terminais dendríticos, sendo alguns encontrados nos terminais sinápticos com importante efeito modulatório sobre o sistema dopaminérgico. O segundo está presente em alta proporção nos terminais sinápticos, cuja ativação inibe a liberação de neurotransmissores como o glutamato e a dopamina. Em estudos comportamentais pré-clínicos, agonistas dos receptores A_1 produziram efeitos anticonvulsivantes, ansiolíticos, sedativos e antipsicóticos. Quanto aos receptores A_{2A} , seus agonistas têm perfil principalmente de antipsicótico, enquanto camundongos sem esse receptor (*knock-out*) são mais agressivos.

A cafeína, por ser vasoconstritora, atua na cefaléia, compensando a dilatação dos vasos sangüíneos do crânio que normalmente causam a dor de cabeça. Além disso, a cafeína parece potencializar os efeitos de outros analgésicos, além de melhorar as dores de cabeça por razões emocionais (BALLONE, 2004). A cafeína em combinação com um analgésico, como o ácido acetil-salicílico, é comumente utilizada no tratamento de dores de cabeça. Também, quando combinada com o alcalóide ergotamina é utilizado no tratamento de enxaquecas (OWEN, 2004).

A cafeína, a teofilina e menos acentuadamente a teobromina, atuam como broncodilatadores, provocando um relaxamento da musculatura dos brônquios (TYER; BRADY; ROBBERS, 1988; HELDT, 1997; SIMÕES et al., 2003; COSIC, 2003).

A teobromina e a teofilina atuam como diuréticos, cujo efeito é mais duradouro para o primeiro alcalóide (TYER; BRADY; ROBBERS, 1988; EVANS, 1991; HELDT, 1997; COSIC, 2003; SIMÕES et al., 2003).

Com relação à ação destes compostos no sistema cardiovascular, eles aumentam a frequência e o débito cardíaco. A cafeína causa vasoconstrição do sistema vascular cerebral e vasodilatação periférica (SIMÕES et al., 2003). Estudos recentes indicam que o hábito de beber café exerce uma pequena influência no aumento da pressão sanguínea, mas não parece acentuar o risco do

desenvolvimento de hipertensão (BALLONE, 2004; IFIC, 2004; ALMEIDA et al., 2003).

A cafeína também tem sido associada a um aumento nos níveis de ácidos graxos livres no sangue, portanto, funcionaria como uma substância capaz de mobilizar gorduras. Este efeito termogênico ocorre muito provavelmente em consequência de sua ação como antagonista dos efeitos da adenosina no tecido adiposo (BALLONE, 2004). O consumo de cafeína também produz um moderado aumento no volume de urina e na excreção de sódio, diminuindo a reabsorção de sódio e água nos túbulos renais (BALLONE, 2004) e estimula a secreção gástrica de ácido clorídrico e da pepsina, em doses a partir de 250 mg/L (BALLONE, 2004).

Outros estudos têm sugerido que a cafeína pode estar relacionada à prevenção da doença de Parkinson (ROSS et al, 2000; JOGHATAIE et al., 2004). Como exemplo disto, Chen e colaboradores (2001) elaboraram estudos epidemiológicos associando o consumo de cafeína à ocorrência da doença de Parkinson. Os resultados obtidos estabelecem uma base neurológica potencial para a associação inversa da cafeína com o desenvolvimento da doença de Parkinson, ou seja, quanto maior a frequência deste alcalóide na dieta do indivíduo, menores eram as probabilidades de ocorrência desta doença. A cafeína atuaria impedindo as deficiências dopaminérgicas características da doença de Parkinson (SCHWARZSCHILD; CHEN; ASCHERIO, 2002). O estudo de Ross (2000) enfocou dados colhidos durante 30 anos, tendo como um universo 8.004 homens participantes de um programa cardíaco. Os dados sugeriram que o não consumo de café determinava um maior risco de desenvolvimento da doença de Parkinson em cinco ordens de magnitude, comparativamente aos indivíduos que consumiam cinco ou mais xícaras de café por dia. Ascherio e colaboradores (2001) estudaram uma população de 47.351 homens e 88.565 mulheres sem sintomas da doença de Parkinson, mediante a aplicação de um detalhado questionário dietético sobre o estilo de vida, atualizando-os a cada dois ou quatro anos. Os resultados apontaram para um possível efeito protetor de doses moderadas da cafeína no desenvolvimento da referida doença.

Estudos demonstram que o consumo de cafeína (i.e. 3 xícaras de café), reduz em até 40% o risco do desenvolvimento de doenças renais (COSIC, 2003).

Um estudo comparativo realizado com 7949 diabéticos tipo 2, de idade entre 35 e 56 anos, residentes em Estocolmo (Suécia), realizado por Agardh e colaboradores (2004), demonstrou que o alto consumo de café (consumo diário de 3 ou mais xícaras) reduz o risco de desenvolvimento da doença e reduz a tolerância à glicose. Este efeito benéfico pode estar relacionado tanto a um aumento na sensibilidade da insulina como a resposta mais acentuada desta. Em estudo semelhante realizado por Salazar e colaboradores (2004), observou-se que um consumo em longo prazo (diário) de café está associado com uma redução significativa no risco de diabetes tipo 2.

Existem evidências do efeito protetor da cafeína no desenvolvimento de cânceres de colo e reto. O efeito protetor deste alcalóide foi reportado um estudo na Suíça, analisando-se 352 casos de câncer de colo e 217 casos de câncer retal, com 512 pacientes-controles. Os resultados revelaram que o consumo de café apresentou um efeito protetor do câncer de colo, enquanto o consumo de chá determinou um efeito protetor do câncer de reto. Estudo similar, conduzido na Itália, demonstrou que o risco de câncer de colo foi reduzido com a ingestão de 4 xícaras por dia de café, sendo esta resposta dose-dependente (COSIC, 2003; MADDEN, 2004).

Tavani e colaboradores (2003) demonstraram uma diminuição do risco de desenvolvimento de cânceres oral, de esôfago e de faringe associada ao consumo de café por populações na Itália e Suíça. Em outros estudos relacionados ao câncer de esôfago, o consumo da bebida café não foi associado ao risco de desenvolvimento da neoplasia, ainda que a temperatura da bebida consumida esteja relacionada ao aumento do risco deste tipo de câncer (CASTELLSAGUÉ et al., 2000).

Não há evidências de risco de aborto e consumo de cafeína, porém alguns autores indicam o consumo moderado desta (~300 mg/dia) durante o período de gestação (COSIC, 2003).

Menos de 5% de cafeína administrada oralmente é recuperada inalterada na urina. A cafeína tem um meia-vida plasmática de 3 a 7 horas, sendo metabolizada no fígado, através do complexo citocromo P450. Os metabólitos ativos da cafeína são a paraxantina, a teofilina e a teobromina. A cafeína é absorvida rapidamente por via oral, atingindo o pico sérico cerca de uma hora após sua ingestão. A nicotina aumenta a eliminação da cafeína, explicando em alguma extensão o porquê dos fumantes apresentarem a tendência ao consumo aumentado de cafeína. Por outro lado, os antibióticos, principalmente as quinolonas, aumentam a concentração sérica deste alcalóide. A cafeína atravessa a barreira hemato-encefálica, tendo uma série de efeitos neurobiológicos, i.e estimulante (STRAIN;GRIFFITHS, 2000). A dose letal de cafeína para o ser humano é de cerca de dez gramas, lembrando-se que uma xícara de café contém cerca de 100 a 125 mg de cafeína (FOYE; LEMKE; WILLIAMS, 1995). Segundo Minatti (2003), a dose necessária para matar 50% de um grupo de humanos adultos (LD-50) é de 75mg/Kg, o que equivaleria a um indivíduo de cerca de 80 Kg beber 150 xícaras de café. O consumo normal de cafeína diariamente está na faixa de 2 a 3 xícaras, i.e., aproximadamente 300mg cafeína/dia (<http://www.diabetic-lifestyle.com>, 2003). Doses superiores a 750 mg/dia (7 xícaras) podem produzir reações similares ao ataque de ansiedade, incluindo delírio, sonolência, zumbido no ouvido, diarreia, vômitos, dificuldade respiratória e convulsões (EROWID, 2003).

A ação da teofilina como broncodilatadora tem sido atribuída à inibição da fosfodiesterase (PDE), com conseqüente aumento no AMP cíclico. O aumento no AMP cíclico também pode atenuar as ações das células inflamatórias e explicar o efeito da teofilina na fase tardia. Entretanto, as concentrações necessárias para inibir a PDE isolada ultrapassam acentuadamente a faixa terapêutica. Há algumas evidências de que o relaxamento da musculatura lisa pode estar relacionado ao efeito sobre uma fosfodiesterase dependente de GMP cíclico. Outro modo de ação proposto refere-se ao antagonismo competitivo da adenosina nos receptores de adenosina. Entretanto, o inibidor da PDE, emprofilina, um broncodilatador mais potente, não atua como antagonista da adenosina (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Vale ressaltar que muitos fatores podem interferir nos níveis séricos e na utilização destes alcalóides pelo organismo humano, tais como a taxa de absorção ao longo do trato digestivo, a distribuição tecidual, a meia-vida dos compostos e a taxa de degradação metabólica, por exemplo.

10.2 Atividades biológicas dos compostos fenólicos

Diversos estudos epidemiológicos *in vitro* e *in vivo* indicam a correlação positiva entre o consumo de compostos fenólicos e a saúde. Esta relação tem sido atribuída à presença, sobretudo, de um subgrupo de compostos fenólicos, conhecidos como flavonóides, os quais apresentam uma variedade de atividades biológicas (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994; RAUHA, 2001; KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Atualmente, tem sido atribuído a estes compostos atividade anti-carcinogênica, anti-aterogênica, anti-trombótica, anti-ulcerogênica, anti-inflamatória, anti-alérgica, antibiótica, anti-viral, anti-parasitários, analgésicos, vasodilatador, de inibição da permeabilidade capilar e imunomoduladora, entre outras (YAMANE, 1996; KUO, 1996; FOTSIS et al., 1997; BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; CHUNG; LU; CHOU, 1998; HANSEN; DEL OLMO; BURN, 1998; YANG, 1998; MATIUCCI, 1998; FITZPATRICK; BING; ROHDEWALD, 1998; PEARSON et al., 1998; LOPES, 2000; WEISBURGER, 2001; GEE, J.M.; JOHNSON, 2001; FERRARI; ELIZABETH; TORRES, 2002; MAYDATA, 2002; KRIS-ETHERTON; KENN, 2002; FERNANDES; BARROS, 2004). Além disto, apresentam ação antioxidante (IOKU, 1995; SIQUEIRA; OETTERER; REGITANO-D'ARCE, 1997; CATAPANO, 1997; HAN, 1997; FERNANDES; BARROS, 2004), em função de sua capacidade de seqüestrar radicais livres ($\cdot\text{OH}$ e O_2^- , por exemplo) e espécies reativas de oxigênio (ROS - i.e. H_2O_2), formar complexos com metais (i.e. quelação - Fe^{+2} , Cu^{+1}) e inibir a peroxidação lipídica de membranas celulares. Além disto possuem efeito inibitório de sistemas enzimáticos tais como a DNA topoisomerase II, a proteína quinase C e a proteína tirosina quinase, modular a atividade de enzimas como a citocromo P-450, a ciclooxygenase e a lipoxigenase

(COOK; SAMMAN, 1996; BRAVO, 1998; RAUHA, 2001; SUGIHARA, 2001; TRUEBA, 2003; FERNANDES; BARROS, 2004; NARDINI, NATELLA, SCACCINI, 2005).

Segundo Vinson e colaboradores (1998), os flavonóides apresentam capacidade antioxidante superior às vitaminas C e E e ao β -caroteno (RICE-EVANS, 1996). De forma similar, Kris-Etherton e colaboradores (2002) menciona a ocorrência do estilbeno *trans*-resveratrol, com forte ação antioxidante, em vinhos tintos e nos sucos de uvas tintas.

A habilidade antioxidante dos flavonóides reside na disponibilidade de hidroxilas livres no anel B, doando o átomo de hidrogênio (Fig. 20) e na capacidade de quelar metais como o ferro e o cobre (SUGIHARA et al., 2001). Segundo Fernandes e Barros (2004), os flavonóides são capazes de inibir enzimas responsáveis pela formação de íons superóxidos, como a xantina oxidase e a proteína C quinase, assim como a ciclooxigenase, a monooxigenase microsomal e a succinoxidase mitocondrial, as quais encontram-se envolvidas em processos de geração de espécies livres de oxigênio (ROS).

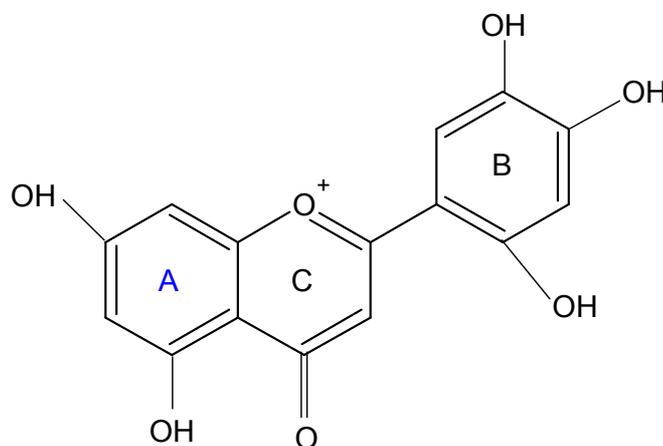
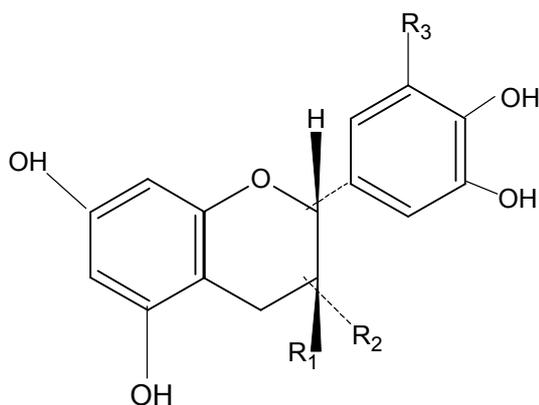


Figura 20. Detalhe da estrutura química básica de compostos fenólicos, evidenciando os anéis A, B (homocíclicos) e C (heterocíclico).

Em mamíferos, os radicais livres (RL) podem ser provenientes da re-oxigenação de tecidos isquêmicos, do resultado de processos inflamatórios agudos e crônicos, da radiação ionizante, da lesão causada por substâncias químicas e da reação com metais (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1989; OLSZEWER, 1995; SHILS; OLSON; SHIKE, 1997). A ação de agentes poluentes, do fumo, do álcool, a exposição solar excessiva, os distúrbios do sono, o uso de drogas de abuso, as alterações constantes de peso e o excesso de atividade física, entre outros, contribuem para o aumento da formação de radicais livres, um processo denominado de estresse oxidativo. Com isso, para combater o aumento da formação de radicais livres é indicada a ingestão de alimentos antioxidantes, ou seja, alimentos ricos em substâncias capazes de seqüestrar estes radicais, evitando danos ao organismo (OLSZEWER, 1995; PUNCHARD; KELLY, 1996; MAGNONI, 2001; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; KAUR; KAPOOR, 2002; FERNANDES; BARROS, 2004).

No cacau e seus derivados, encontra-se uma rica fonte de compostos fenólicos, sobretudo da classe dos flavonóides, com destaque às catequinas (Fig. 21 – epicatequina (EC), epigallocatequina galato (EGCG), epicatequina galato ([EGCG) e procianidinas). Comparada com outros antioxidantes conhecidos, a EGCG é considerada 100 vezes mais eficaz que a vitamina C e superior à vitamina E em 25 ordens de magnitude. De forma interessante, ressalta-se que as catequinas auxiliam na proteção da vitamina E e do β -caroteno, e potencializam a ação da vitamina C, além de protegê-la da termolabilidade por mecanismos ainda não elucidados (PORTER; MA; CHAN, 1991; WAN et al., 2001; WEISBURGER, 2001; SUGIHARA et al., 2001; CAO; CAO; BRAKENHIELM, 2002; CARNÉSECCHI et al., 2002; LU et al., 2002; OSAKABE et al., 2002; KRIS-ETHERTON et al., 2002; MAYDATA, 2002; KEEN, 2002; LEE et al., 2003).



Catequina (R1 = OH; R2 = R3 = H), epicatequinas (R1 = R3 = H; R2 = OH);
 epicatequina galato (R1 = R3 = H; R2 = galoil), epigalocatequina (R1 = H; R2 = R3 = OH);
 epigalocatequina galato (R1=H; R2= galoil; R3=OH).

Figura 21. Detalhe da estrutura química de compostos fenólicos encontrados em biomassas de cacau.

Algumas comparações foram realizadas em estudos enfocando as propriedades antioxidantes do chocolate e outros alimentos e bebidas, revelando que o cacau e seus produtos derivados como o chocolate tem maior conteúdo de (poli) fenóis que determinadas biomassas vegetais (FERNANDES; BARROS, 2004).

Sabe-se que a porção referencial normalmente consumida de chocolate é de 40g/dia, o que fornece, em princípio, 349 mg e 951 mg de antioxidantes (poli) fenólicos, respectivamente a partir da ingestão de chocolate ao leite e chocolate amargo. Segundo Vinson (1995), o valor médio de concentração de compostos (poli) fenólicos encontrado no chá preto é de 943 mg/240 ml e no vinho tinto de 431 mg/240 ml. Contudo, 240 ml de chocolate em pó para preparo instantâneo fornecem 45 mg de polifenóis, enquanto o cacau em pó possui 211 mg de polifenóis.

Segundo Wan e colaboradores (2001), o consumo de cacau em pó e chocolate preto pode apresentar um efeito protetivo das doenças

cardiovasculares, reduzindo a susceptibilidade da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), aumentando a capacidade antioxidante total sérica e a concentração da fração da lipoproteína de alta densidade (HDL) do colesterol.

A modificação oxidativa da LDL *in vitro* mostra ser a chave na iniciação do processo aterosclerótico. Estudos têm mostrado que os flavonóides previnem a oxidação da LDL *in vitro* pelo seqüestro das espécies reativas de oxigênio, ou pelo seqüestro de íons metálicos (KONDON, 2002; ENGLER; ENGLER, 2004).

Richelle e colaboradores (1999) demonstram maior absorção de epicatequinas após o consumo de 40mg de chocolate amargo em humanos. Vale ressaltar que ainda não foi demonstrado se os polifenóis dos chocolates de mercado podem agir como antioxidantes após ingestão, uma vez que a gordura presente naqueles produtos atua como pró-oxidante *in vivo*.

Para Osakabe e colaboradores (2002), a atividade antioxidante entre a catequina, a epicatequina e seus estereo-isômeros é significativamente diferente. A epicatequina apresenta atividade mais efetiva na oxidação da fração da lipoproteína de baixa densidade (LDL) do colesterol. Entretanto, seu estudo revelou a capacidade antioxidante da catequina, fato não demonstrado anteriormente.

Assim como o cacau e seus derivados, o café é outra fonte rica em compostos fenólicos, cujo efeito benéfico do seu consumo também está relacionado à capacidade antioxidante de compostos presentes naquela biomassa.

Diversos estudos demonstram que o composto fenólico majoritário com propriedade antioxidante na biomassa de café é o ácido clorogênico, porém outras substâncias fenólicas também são observados naquela espécie, entre as quais destacam-se os ácidos gálico, cumárico, cafeico e ferúlico (MAYDATA, 2002; PANZELLA; NAPOLITANO; d'ISCHIA, 2003; HUANG; PAULIS; MAY, 2004).

Comparativamente, uma xícara de café contém cerca de 200 a 500 mg de (poli) fenóis, enquanto uma xícara de chá preto e um cálice de vinho tinto contém 150–200mg e 200–800mg, respectivamente (LAKENBRING; LAPEZYNSKI; MAINWALD, 2000).

Segundo Maydata (2002), os ácidos clorogênico e cafeico apresentam aspectos funcionais similares às catequinas, porém, com diferentes estruturas químicas (Fig. 22) e funções metabólicas.

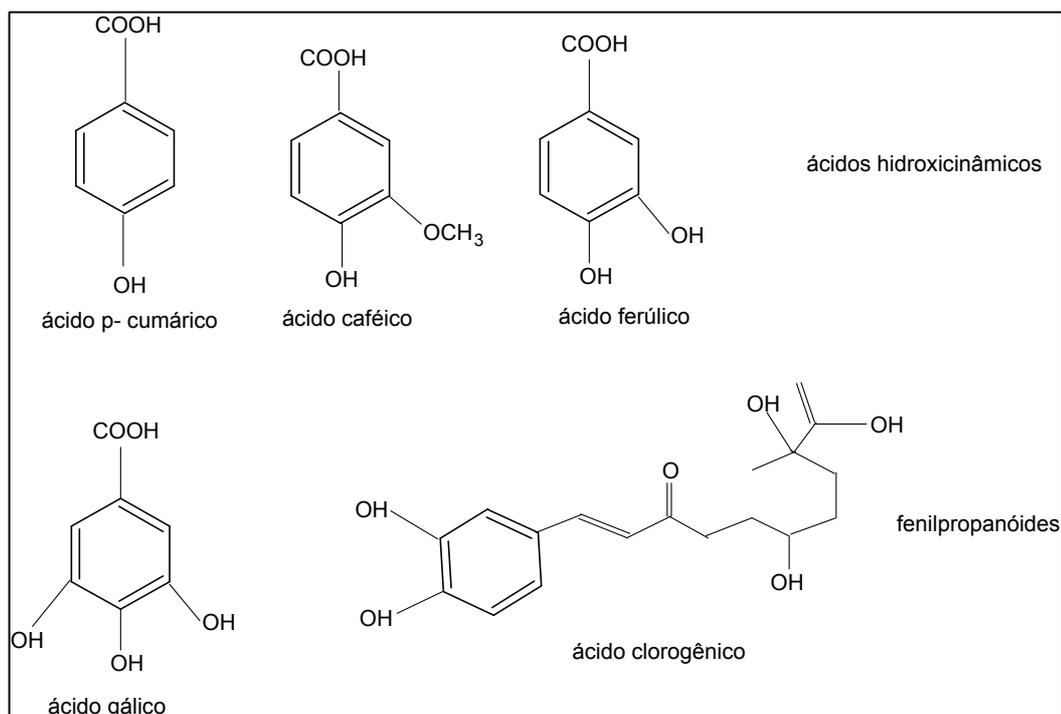


Figura 22. Detalhes da estrutura química de ácidos hidroxicinâmicos e fenilpropanóides encontrados comumente em biomassas de café.

Estudos realizados por Daglia, Papetti e Gregotti (2000) demonstraram as propriedades antioxidantes *in vitro* dos ácidos clorogênico, cafeico e ferúlico, via inibição da oxidação da fração LDL do colesterol, corroborando na prevenção de enfermidades cardiovasculares.

É importante ressaltar que o teor de compostos (poli) fenólicos presentes em biomassas de café *in natura* (cru) e torrado é diferente, devido à perda destes metabólitos durante a torrefação dos grãos (i.e. reação de Maillard), levando à formação de outros compostos antioxidantes menos efetivos como as melanoidinas, as quais fornecem ao café sua cor característica (RICHELLE et al., 2001; MAYDATA, 2002). Também há diferenças nos teores dos compostos (poli)

fenólicos entre as espécies *Coffea arabica* e *C. conephora*, conforme demonstrado por Clifford (1999), onde uma xícara (200 ml) da bebida preparada com grãos de *C. arabica* contém cerca de 70 a 200 mg de ácido clorogênico, enquanto valores de 70 a 350 mg de ácido clorogênico foram encontrados para a bebida preparada a base de grãos de *C. conephora*.

Olthof e Hollman (2001) estimam que o consumo diário de ácido clorogênico pelo homem é de aproximadamente 1 grama. Outros compostos fenólicos presentes nos grãos de café que vêm sendo estudados quanto aos seus efeitos biológicos são os ácidos ferúlico, *p*-cumárico, sináptico, vanílico, hidroxibenzóico, os flavonóides campferol e quercetol, além dos diterpenos cafestol e caveol, e de constituinte da fração óleo essencial (ácido cinâmico e aldeído cinâmico), entre outros (PIMENTA; COSTA; CHAGAS, 2000; FERNANDES; BARROS, 2004). O café tem mostrado vantagens como fonte de compostos antioxidantes em relação a outras bebidas presentes na dieta humana porque representa uma das bebidas mais comuns do mundo.

A capacidade antioxidante de inúmeras biomassas vem sendo mensurada por diferentes métodos. Segundo SÁNCHEZ-MORENO (2002) e RAUHA (2001), podemos classificar os testes antioxidantes tanto de alimentos como de sistemas biológicos em dois grupos: 1) métodos para avaliar a peroxidação lipídica, no qual um substrato de natureza lipídica ou lipoproteica em condições padronizadas é usado, determinando-se o nível de inibição de oxidação do substrato, ou, 2) métodos que avaliam a habilidade do composto em estudo em seqüestrar radicais livres, i.e. radical superóxido - O_2^- e hidroxil - HO^- . O ânion superóxido é um radical livre instável, com vida média de milissegundos, em pH neutro; é instável em meio aquoso e de forma espontânea produz peróxidos e oxigênio molecular. O superóxido é um agente oxidante fraco, oxidando somente alguns substratos, porém, tem sido demonstrado que este composto é um componente redutor de várias substâncias i.e. ferro iônico e seus complexos, hemoproteínas (citocromo c, metaglobina, mioglobina peroxidase e quinonas). Algumas pesquisas indicam que este ânion pode exercer sua citotoxicidade inativando enzimas específicas essenciais à célula, entre as quais a tRNase e a gliceraldeído3-fosfato

desidrogenase (OLSZEWER, 1995). O radical hidroxil é considerado o mais reativo radical livre nos sistemas biológicos, uma vez que não há enzimas que catalisem a sua remoção (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1989; OLSZEWER, 1995).

Como é sabido, os radicais livres apresentam um papel importante no desencadimento prevenção e defesa de inúmeras doenças crônicas, sobretudo aquelas de natureza cardiovascular e neoplásica. Estas doenças podem estar associadas aos mecanismos celulares envolvidos na formação de vasos sanguíneos (SIMONS; WARE, 2003).

Estudos baseiam-se no fato de que o surgimento e a expansão do sistema vascular são requisitos fundamentais para a ocorrência de diversos processos patofisiológicos, além dos citados acima (i.e. doenças degenerativas). Com isso, recentes avanços no conhecimento científico têm lançado perspectivas para o desenvolvimento de fitoterápicos capazes de estimular a revascularização, com vistas à restauração de tecidos em doenças isquêmicas, ou ao bloqueio da formação de vasos em casos de neoplasias (JAVANEL et al., 2001; SIMONS; WARE, 2003).

Os processos bioquímicos relacionados ao desenvolvimento de novos vasos são denominados de vasculogênese e angiogênese. Tem sido considerado que o primeiro é limitado somente à embriogênese e acredita-se não ocorrer em adultos normais, i.e. sem disfunções. Já a angiogênese ocorre tanto durante a embriogênese como na vida pós-natal. Entretanto, a distinção entre estes processos não é absoluta, porque ambos requererem a proliferação de células endoteliais, a migração e a remodelagem para a formação de novos vasos, independentemente de vasos pré-existente (RIBATTI et al., 2001).

A vasculogênese é definida como o processo de formação de vasos primitivos (JONES et al., 2001; CHARNOCK-JONES; KAUFMANN; MAYHEW, 2004; ZAMMARETTI; ZISCH, 2004), enquanto a angiogênese refere-se ao processo de formação de novos vasos, a partir de vasos pré-existentes (BOLONTRADE et al., 1998; TARTA et al., 2000; CAO; CAO; BRAKENHIELM, 2002; LaRUC; LANSFORD; DRAKE, 2003; RIBATTI et al., 2003). Recentes

estudos indicam que a vasculogênese não está restrita somente à embriogênese, mas também encontra-se envolvida em funções fisiológicas, ou ainda contribui para patologias de doenças vasculares em adultos. As maiores evidências em favor destes novos aspectos são: (1) a demonstração da presença de células endoteliais circulantes e de precursores de células endoteliais; (2) mecanismos recentemente descritos relacionados à formação de vasos sanguíneos em tumores (RIBATTI et al, 2001; SIMONS; WARE, 2003; ZAMMARETTI; ZISCH, 2004).

A vasculogênese é um processo essencial para o crescimento do embrião, iniciando-se com o agrupamento de progênitores mesodermis (hemangioblastos), seguido pela diferenciação em angioblastos e células tronco/progenitoras hematopoéticas. Estes agrupamentos são chamados de ilhotas sanguíneas, contendo células tronco centralizadas envolvidas por angioblastos na periferia. A fusão de múltiplas ilhotas sanguíneas do embrião gera vasos sanguíneos primitivos que constituem redes de plexos capilares (ZAMMARETTI; ZISCH, 2004). Mais recentemente, estudos demonstraram a existência de angioblastos ou células progenitoras endoteliais (endothelial progenitor cells - EPCs) em adultos, presentes na medula óssea e na circulação sanguínea, sugerindo que estes são funcionalmente semelhantes aos angioblastos embriônicos. Tal fato reforça a idéia que estas células participam da neovascularização local em adultos (ASAHARA et al., 1997, 1999).

Outros trabalhos têm demonstrado que os angioblastos derivados da medula óssea são ativamente recrutados em situações de traumas, isquemia, ou infarto e, ao diferenciarem-se em células endoteliais maduras, integram os novos vasos. Assim, conseqüentemente, o conceito de indução e modulação da *vasculogênese em adulto* ou *vasculogênese pós-natal* pode ser considerado como uma estratégia terapêutica (WARE, SIMONS, 1997; RIBATTI et al, 2001; JANAVEL et al., 2001; FELMEDEN; BLANN; LIP, 2003; LaRUC; LANSFORD; DRAKE, 2003).

O processo de desenvolvimento de novos vasos é altamente regulado por diversos tipos de células indiferenciadas, i.e. angioblastos, ou diferenciadas, i.e.

monócitos, mastócitos, endoteliócitos e outras células, e diferentes moléculas sinalizadoras, como por exemplo o fator de crescimento fibroblástico (JANAVEL et al., 2001).

Os fatores de crescimento fibroblástico básico (bFGF) interagem nos mecanismos de proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência de células endoteliais, envolvidas na formação destes vasos primários. É o primeiro fator de crescimento descoberto, pertencendo a uma família de 20 moléculas com grande potencial mitogênico, e representando o mais potente peptídeo angiogênico conhecido até o momento. São produzidos por células do endotélio vascular e células musculares, fibroblastos e certas células tumorais. Todas estas células expressam pelo menos um dos quatro receptores tirosina-quinase (FGFR, *fibroblast growth factor receptor*): FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 e FGFR-4). Outra característica desta família de fatores de crescimento é a sua habilidade de interagir com glicosaminoglicanas semelhantes à heparina da matriz extra-celular (JANAVEL et al., 2001; FELMEDEN; BLANN; LIP, 2003).

Outra molécula sinalizadora amplamente estudada é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), cuja função é estimular a proliferação e migração das células endoteliais e sua organização tubular, inibindo a apoptose das mesmas. A combinação destes dois fatores *in vitro* representa um poderoso estímulo à formação de vasos sanguíneos, porém, estudos demonstram que somente o aumento da concentração de FGF (fator de crescimento fibroblástico) é suficiente para ativar toda a cascata de eventos necessários para este processo. Além disto, o FGF regula a permeabilidade vascular, favorecendo o extravasamento de proteína e permitindo assim a formação de um gel de fibrina, apto para a migração e organização das células endoteliais (MUROHARA; HOROWITZ; SILVER, 1998; JANAVEL et al., 2001; FELMEDEN; BLANN; LIP, 2003).

Estudos epidemiológicos *in vivo* e *in vitro* sugerem que a epigallocatequina galato (EGCG), presente no cacau e seus derivados, inibe a ação do fator de crescimento endotelial (VEGF) (CAO; CAO, 1999; CAO; CAO; BRAKENHIELM, 2002). No presente trabalho, a atividade angiogênica de extratos aquosos de café e cacau foi avaliada pelo modelo de estudo da vascularização de embriões de

Gallus domesticus (CAM - membrana cório-alantóica). Este modelo apresenta uma série de vantagens em relação a outros modelos animais, incluindo a simplicidade, o baixo custo, valendo-se também da imunodeficiência natural que os embriões de galinha apresentam, além da diversidade de células e tecidos presentes naquelas estruturas (LEIGHTON; NASSAUER; TCHAO, 1985; McNATT et al., 1992; NGUYEN; SHING; FOLKMAN, 1994; NIKIFORIDIS et al., 1999; RIBATTI et al., 2001; DIAS et al., 2002; SEIDLITZ et al., 2004).

Diversos autores (LEIGHTON; NASSAUER; TCHAO, 1985; McNATT et al., 1992; NGUYEN; SHING; FOLKMAN, 1994; NIKIFORIDIS et al., 1999; RIBATTI et al., 2001; DIAS et al., 2002; SEIDLITZ et al., 2004) concordam que o entendimento dos mecanismos envolvidos na atividade anti-tumoral de compostos naturais é uma tarefa bastante complexa. Contudo, são unânimes na concordância quanto aos efeitos inibitórios de determinados compostos fenólicos sobre a angiogênese, i.e. resveratrol, presente no vinho tinto, e a EGCG, presente no chá verde, segundo um modelo de ação inibitória dose-dependente para este último composto. De forma similar, outros estudos sugerem ação anti-carcinogênica e anti-mutagênica aos flavonóides presentes em biomassas de cacau (WEISBURGER, 2001; KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Aos compostos fenólicos presentes em biomassas de café também têm sido reportados efeitos anti-carcinogênicos e anti-mutagênicos, notadamente aos ácidos clorogênico, cafeico, fenílico e cumárico. Estas atividades foram comprovadas em ensaios *in vitro* e *in vivo* recentemente (MAYDATA, 2002) e, segundo MICHELS e colaboradores (2002), além destes compostos, a cafeína, alcalóide majoritário do café, apresenta ação inibitória de processo celulares que pode estar associada à carcinogênese.

É consenso no meio científico que o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos é essencial para o crescimento do embrião e para reparar processos fisiológicos como a cicatrização de ferimentos, a restauração de tecidos pós-isquêmicos, as mudanças endometriais no ciclo menstrual, entre outros. Entretanto, o desenvolvimento anormal de novos vasos está relacionado a

numerosos processos patofisiológicos, mencionando-se como exemplo a inibição do crescimento de vasos sanguíneos associada à atresia intestinal e úlceras. De modo geral, os focos de intensa proliferação de vasos sanguíneos encontram-se associados ao crescimento de tumores, porém, um aumento no crescimento vascular tem sido demonstrado ocorrer em doenças não malignas como artrite reumatóide, lupus, psoríases, retinopatias proliferativas e aterosclerose (FELMEDEN; BLANN; LIP, 2003). De qualquer forma, a relação existente entre vasculogênese e angiogênese com os processos fisiopatológicos de natureza neoplásica ainda é pouco conhecida, justificando a realização de estudos mais detalhados como estratégia para a obtenção de métodos e processos profilático/terapêuticos que viabilizem maiores índices de sucesso na prevenção/cura.

11. OBJETIVOS

11.1 OBJETIVO GERAL

- Análise de extratos aquosos de café e cacau na atividade antioxidante e no processo de vasculogênese.

11.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a atividade antioxidante dos (poli) fenóis presentes na fração aquosa de biomassas de café e cacau, em ensaios *in vitro*, a saber: capacidade seqüestrante dos radicais superóxido (O_2^-) e hidroxil ($OH\cdot$);
- Determinar o efeito dos extratos aquosos e da cafeína sobre o processo de vasculogênese e desenvolvimento dos embriões de *Gallus domesticus*.

12. MATERIAL E MÉTODOS

12.1 MATERIAL

12.1.1 Amostras de biomassas de café e cacau

A amostra de café *in natura* (cru) analisado, 40002871 (selecionada aleatoriamente), foi cedida pela Cooperativa de Cafeicultores de Guaxupé, MG (COOXUPÉ), em abril de 2003. Os valores referentes aos teores de fenóis e cafeína desta amostra estão apresentados na tabela 22.

Tabela 22. Teores de fenóis totais (mg/l) e cafeína (mg/g) em amostra de café *in natura*, cru de registro número 40002871.

Amostra	Fenóis totais (mg/l)	Cafeína (mg/g)
40002871	95,20	0,87

A amostra de cacau analisado foi o cacau alcalino lecitinado (selecionado aleatoriamente), cedido pela Empresa Bretzke de Jaraguá do Sul – SC, no ano de 2003. Os valores de concentração de compostos fenólicos totais e cafeína referente àquela amostra estão apresentados na tabela 23.

Tabela 23. Teores de fenóis (mg/l) e cafeína (ug/ml) da amostra de cacau alcalino lecitinado Bretzke

Amostra	Fenóis totais (mg/l)	Cafeína (ug/ml)
Cacau alcalino lecitinado Bretzke	150,10	15,82

12.1.2. Determinação da atividade antioxidante dos extratos aquosos de café e cacau

As amostras de café utilizadas nesta análise estão apresentadas na tabela 24.

Tabela 24. Conteúdo de fenóis totais (mg/l) das amostras de tipos de cafés selecionados para avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*.

Amostra/tipo de café	Fenóis totais (mg/l)
40002959/café cereja descascado	156,78
40002871/café natural	95,20
40002928/café do cerrado	129,24
Café expresso	121,34

As amostras de cacau selecionadas para os ensaios *in vitro* da atividade antioxidante e suas respectivas concentrações estão apresentadas na tabela 25.

Tabela 25 Concentração de fenóis totais (mg/l) de amostras de cacau selecionadas para avaliação da capacidade antioxidante *in vitro*.

Amostra/empresa	Fenóis totais (mg/l)
Cacau em pó alcalino lecitinado Bretzke	150,10
Cacau em pó natural Indeca	187,46
Cacau alcalino Indeca T-800	267,38

12.1.3. Material biológico

Para a avaliação do processo de vasculogênese foram utilizados embriões de galinha da espécie *Gallus domesticus*, linhagem *Ross*, cedidos pela empresa Macedo Koerich (Palhoça, SC). Os ovos foram coletados e, 24 horas após a postura, incubados em estufa a 37,5°C, 65% de umidade relativa do ar, ao longo de 4 dias.

12.2 METODOLOGIA

12.2.1 Obtenção dos extratos de café e cacau

A 2g (peso fresco) de amostra foram adicionados 15 ml de solução de CaCO_3 4,7% (p/v), seguido de aquecimento brando (20 segundos em forno de microondas). Vale ressaltar que as amostras de café utilizadas foram: 40002959, 40002871, 40002928 e café expresso, enquanto as amostras de cacau foram: cacau alcalino lecetinado Bretzke, natural Indeca e alcalino Indeca T-800. Em seguida, a solução aquecida foi transferida para um aparato de *soxhlet*, mantendo-a sob fervura, por 20 minutos. Após este período, a solução foi resfriada em temperatura ambiente e filtrada sob vácuo. Os extratos aquosos obtidos foram secos em estufa, a 50°C, por 24 horas. Os extratos secos foram armazenados em tubos de micro-centrífuga (Eppendorf), adicionados de nitrogênio e mantidos a temperatura de 8°C.

12.2.2 Avaliação do efeito dos extratos aquosos de café *in natura* (cru) e cacau em pó alcalino lecetinado sobre a vasculogênese *in vivo*

Os ensaios foram realizados avaliando-se o efeito dos extratos aquosos de café *in natura* (cru) e cacau em pó **alcalino lecetinado** sobre o processo de vasculogênese de embriões de *G. domesticus* (fig. 23). Além dos extratos aquosos citados, avaliou-se a atividade vasculogênica da cafeína pura, para fins de comparação. Uma solução de metilcelulose (0,45% - p/v) foi utilizada como controle negativo e uma associação de heparina (50 UI) e hidrocortisona (diluição 1:50 - 156 µg/disco), foi utilizada como controle positivo.

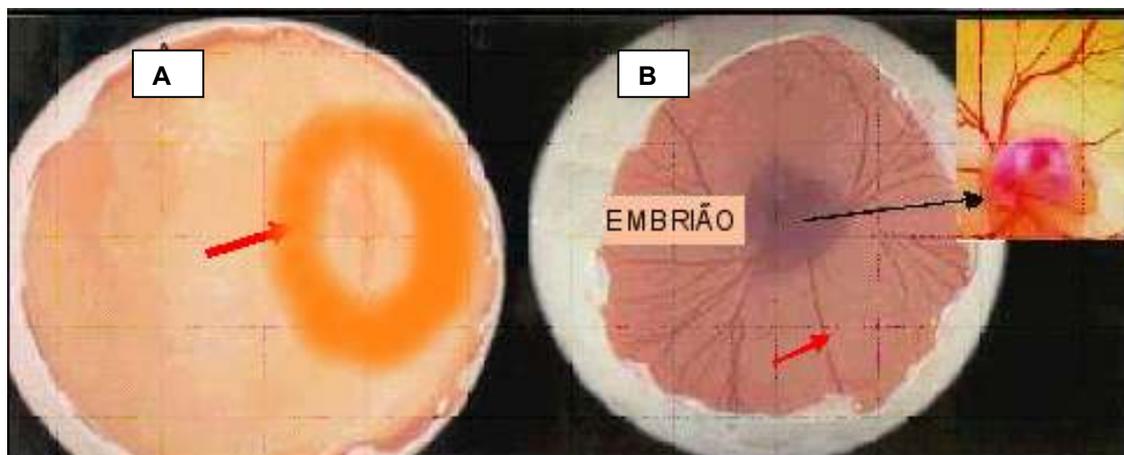


Figura 23. Micrografia ótica (25x) da vesícula vitelínica de embriões de galinha utilizados como modelo de estudo da vasculogênese. **A)** embrião com 48 horas de incubação - ilhotas sanguíneas destacadas em vermelho; **B)** embrião com 96 horas de incubação (**seta preta**), vasos sanguíneos iniciais (**seta vermelha**).

12.2.2.1. Adsorção dos extratos aquosos de café e cacau, cafeína e heparina-hidrocortisona aos suportes de metilcelulose

Os compostos em estudo foram solubilizados em água e adsorvidos em suportes (discos) de metilcelulose (0,45% p/v; Sigma, MO/ USA). Os discos foram preparados retirando-se com micro-pipetas um volume correspondente a 5 μ l, e ao final apresentaram diâmetro aproximado de 3 mm. A solução adsorvida ao suporte de metilcelulose foi seca ao ar, em ambiente de fluxo laminar, em bandeja de metal revestida com Teflon™. As concentrações dos extratos aquosos de café e cacau em estudo variaram de 0,07 μ g/ml a 2,1 μ g/ml, enquanto utilizou-se uma concentração de 0,21 μ g/ml para cafeína.

12.2.2.2. Cálculos das dosagens

Para efeito do cálculo das concentrações dos tratamentos, foi utilizada como referência o consumo diário de cafeína de 300 mg/dia, para um homem de 60 Kg (1,5 a 5,0 mg por Kg de peso) (CAVALCANTE et al., 2000; ALTIMARI et al., 2001), sendo a média dos pesos dos embriões correspondente a 42 mg (Tabela 26).

Tabela 26. Concentração ($\mu\text{g}/\text{disco}$) dos tratamentos utilizados para os tratamentos dos embriões de *G. domesticus*, em valores relativos ao consumo humano (mg/dia) dos compostos em estudo.

Homem - 60Kg (mg/dia)	Embrião - 42 mg ($\mu\text{g}/\text{disco}$)
30	0,021
100	0,07
300	0,21
1000	0,7
3000	2,1

12.2.2.3. Tratamentos

Os suportes de metilcelulose foram implantados sobre as ilhotas sanguíneas, na periferia da área vascular da vesícula vitelínica, no 2º dia de incubação do ovo, através de uma abertura na casca (10 mm). Posteriormente, o orifício foi fechado com fita adesiva (celofane) e os ovos foram reincubados por um período complementar de 48 horas, totalizando 96 horas de incubação (Fig. 24).



Figura 24. Detalhe do procedimento de reincubação dos ovos em estufa, após a aplicação dos discos de metilcelulose contendo os tratamentos.

12.2.2.4. Análise do material e quantificação dos vasos sanguíneos

Transcorridas 48 horas de incubação após a aplicação dos tratamentos, os ovos ($n = 8$) foram retirados do incubador e a zona em torno do implante do disco de metilcelulose (Fig. 25) foi analisada com o auxílio de um microscópio estereoscópio (25x). Para a quantificação do efeito dos compostos estudados sobre a vasculogênese foi determinado o número de vasos sanguíneos capilares que interceptam os limites dos discos de metilcelulose, conforme descrito previamente (DIAS *et al.*, 1999).

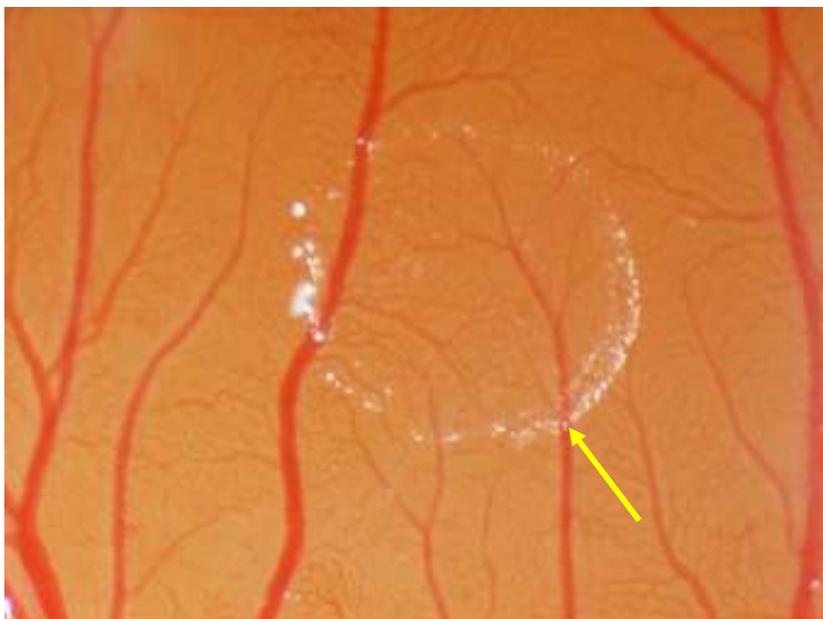


Figura 25. Micrografia ótica (25x) indicando (seta amarela) a ocorrência de vasos sanguíneos que interceptam o disco de metilcelulose (0,21 $\mu\text{g}/\text{disco}$). A contagem destes vasos foi utilizada como indicador do efeito dos tratamentos em estudo sobre a vasculogênese em embriões de *G. domesticus*.

12.3. Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos (poli) fenólicos de café e cacau

Para esta avaliação, dois ensaios foram realizados: **a)** teste da medida da degradação da desoxirribose, para determinação da capacidade seqüestradora do radical $[\cdot\text{OH}]$ e **b)** teste NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*), onde a detecção da capacidade seqüestradora do radical ânion superóxido foi avaliada.

12.3.1. Determinação de danos oxidativos à desoxirribose (capacidade seqüestradora de $\text{OH}\cdot$)

O sistema gerador de espécies reativas de oxigênio (EROs) para detecção de danos oxidativos em desoxirribose foi realizado de acordo com Nishida e colaboradores (1991). A detecção dos produtos oxidados (TBARs) foi realizada como descrito em Halliwell e Gutteridge (1989), sendo os ensaios realizados em triplicatas, num volume final de 1,2 ml, em tubos Pyrex de 10ml. O meio de reação consistiu de tampão fosfato de potássio (pH 7,4), na concentração final de 0,01M. Inicialmente, foi realizada uma pré-incubação de 25 μ l de solução estoque de FeCl₃ (c.f. 25 μ M) e 100 μ l da solução estoque de NTA (ácido nitrilotriacético)(c.f. 100 μ M) por 10 minutos, a temperatura ambiente, para a formação do quelato. Posteriormente, foram adicionados sequencialmente: água (volume necessário para completar 1,2 ml), 150 μ l de tampão fosfato (c.f. 0,01M, pH 7,4); 100 μ l de solução de desoxirribose (c.f. 2,8mM) e H₂O₂ (c.f. 1,4mM). Os tubos foram incubados por 20 minutos, em banho-maria, a 37°C. Ao final da incubação, foi realizada a reação com ácido tiobarbitúrico (TBA), através da adição de 1ml da solução de TBA 1% (v/v) e 1ml de ácido tricloroacético 2,8% (TCA – v/v). Os tubos de ensaios foram então incubados por mais 15 minutos, a 100°C, para a formação de pigmento e ao final do tempo, resfriados imediatamente em banho de gelo. A absorbância (532nm) das soluções foi medida em espectrofotômetro UV-visível (HITACHI mod. U-2001), a temperatura ambiente, contra um branco contendo todos os reagentes, com exceção da desoxirribose.

Nos tubos teste foram adicionados 120 μ l, nas concentrações de 1; 10; 100; 100 e 1000 μ g/ml dos extratos aquosos das amostras de café verde e cacau ao meio de reação, previamente à adição de H₂O₂. A absorbância das soluções foi medida contra um branco específico, contendo a mesma concentração dos compostos utilizados no ensaio.

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) dos valores de percentagem de degradação da desoxirribose, considerando-se os valores médios da absorbância dos controles como 100% de oxidação.

12.3.2. Detecção da capacidade sequestradora de radical ânion superóxido (NBT- *Nitro Blue Tetrazolium*)

Para avaliar a capacidade seqüestradora do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) foi utilizado o sistema gerador deste radical: fenazina-metasulfato-NADH, segundo Robak e Gryglewski (1988). O meio de incubação consistiu de fenazina-metasulfato ($10\mu\text{M}$); nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH - $78\mu\text{M}$) e “nitro blue tetrazolium” (NBT - $25\mu\text{M}$) em tampão fosfato ($0,1\text{M}$, pH 7,8). Nesse sistema, o $O_2^{\cdot-}$ gerado, reduz o NBT produzindo o formazan. Após 2 minutos de incubação, a temperatura ambiente, a reação foi interrompida adicionando-se aos tubos teste $100\mu\text{l}$ de HCl $0,1\text{N}$. Em seguida, determinou-se o valor da absorbância (560nm) das soluções em estudo, contra um branco que não continha fenazina-metasulfato. Concentrações de 1; 10; 100; 100 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ dos extratos aquosos das amostras de café verde e cacau foram adicionadas aos tubos teste antes da adição de fenazina-metasulfato.

Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M. dos valores percentuais, sendo considerado 100% da redução do NBT a reação sem a presença dos compostos testados.

12.3.3. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) das porcentagens, considerando-se os valores médios da absorbância dos controles sem a presença dos extratos analisados, utilizando-se o *Teste de Tukey*. Foram realizadas três determinações em triplicata.

13. RESULTADOS

13.1. Avaliação do efeito do extrato aquoso de café *in natura* (cru), extrato aquoso de cacau em pó e cafeína sobre a vasculogênese *in vivo*

No presente trabalho, foi analisado o efeito dos extratos aquosos de café *in natura* (cru)- 40002871, e cacau em pó alcalino lecitinado Bretzke[®] sobre o processo de formação de vasos sanguíneos.

13.1.1 Análise da vasculogênese nos tratamentos com extrato aquoso de café

O extrato aquoso de café mostrou efeito positivo sobre o processo de formação de vasos em relação ao controle negativo. A rede de vasos observada nos grupos tratados é típica do processo de vasculogênese, com vasos similares no que se refere ao diâmetro, não apresentando, portanto, uma hierarquia no que se refere a este parâmetro (Fig.26)

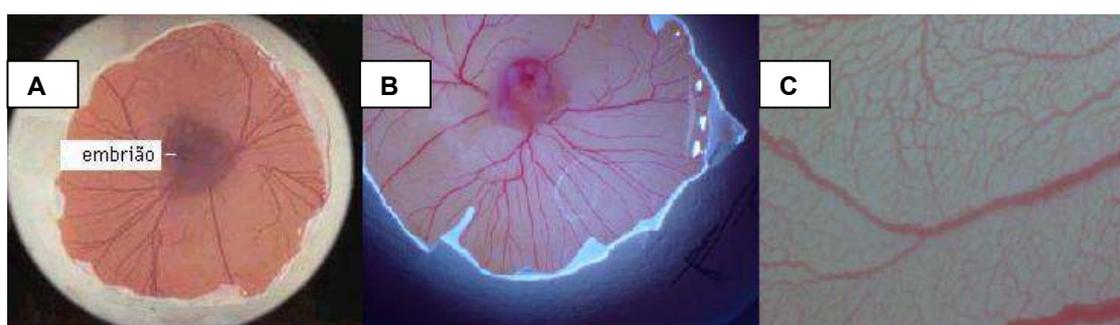


Figura 26. Micrografias óticas do processo de vasculogênese observado na vesícula vitelínica de embriões de galinha tratados com extrato aquoso de café (0,21 µg/disco), após 96 h de incubação: (A) controle negativo- objetiva 0,5; (B e C) objetivas de 0,5 e 1,0 respectivamente.

Os valores médios do número de vasos sanguíneos detectados 96 horas após a implantação dos discos de metilcelulose na vesícula vitelínica de embriões de galinha contendo os extratos aquosos de café cru são mostrados na tabela 27.

Tabela 27. Valores médios \pm EPM do número de vasos sanguíneos observados no limite do disco de metilcelulose, implantado na vesícula vitelínica de embriões de galinha, no período de 48 a 96 h de incubação, segundo as concentrações de extrato aquoso cru de café administradas.

Todos os tratamentos apresentaram diferenças altamente significativas ($p < 0,001$) em relação ao controle (ANOVA- *Teste de Tukey*). Valores médios de número de

Extrato aquoso cru de café (mg/disco)	Número de vasos formados ***
Controle negativo*	101 \pm 5
0,021	140 \pm 4 <i>b</i>
0,07	140 \pm 4 <i>b</i>
0,21	157 \pm 4 <i>a</i>
0,7	151 \pm 3 <i>a</i>
2,1	133 \pm 5 <i>c</i>
Controle positivo**	37 \pm 3

vasos formados significativamente distintos ($p < 0,05$) são acompanhados pelas letras **a**, **b** e **c**.

* Solução de heparina (50UI) e hidrocortisona (diluição 1:50- 156 μ g/disco).

** Solução de metilcelulose 0,45%.

A análise dos dados revelou que em todos os tratamentos o número de vasos dos embriões excedeu ao do controle negativo, evidenciando a atividade pró-vasculogênica de compostos presentes no extrato aquoso de café cru. Os tratamentos com doses de 0,21 e 2,1 μ g/disco estimularam, respectivamente, a maior e a menor proliferação de vasos sanguíneos, com valores de 157 \pm 3 e 133 \pm 5 vasos/embrião. Foi possível verificar que os tratamentos não apresentaram um perfil dose-dependente, sendo que na maior concentração testada (2,1 μ g/disco), observou-se a menor atividade pró-vasculogênica (tabela 27).

13.1.2. Análise da vasculogênese de embriões tratados com o extrato aquoso de cacau

O extrato aquoso de cacau apresentou uma ação negativa no processo de formação de vasos sanguíneos na vesícula vitelínica de embriões de galinha em relação ao controle negativo, conforme demonstra a figura 27.

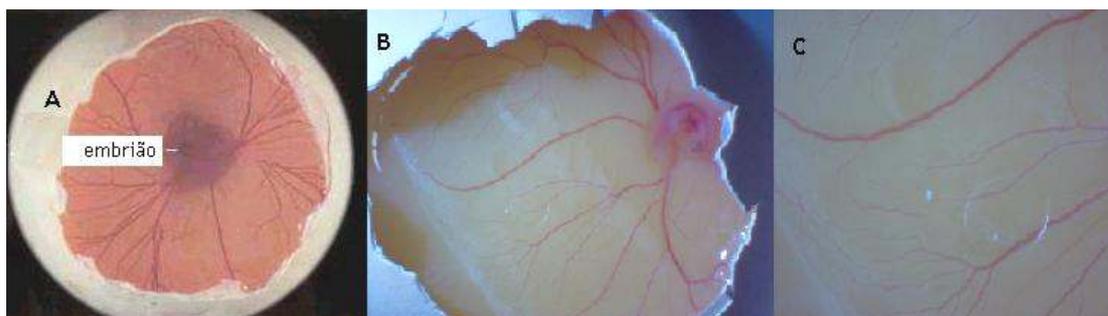


Figura 27. Micrografia ótica do processo de vasculogênese observado em embriões de galinha tratados com extrato aquoso de cacau. **(A)** controle negativo- objetiva 0,5; **(B e C)** ação do extrato de cacau (0,21 µg/disco)-objetivas de 0,5 e 1,0, respectivamente.

Nos tratamentos correspondentes às doses de 0,07, 0,21 e 0,7 µg/disco foram obtidos valores inferiores a 50% no número de vasos formados em relação ao controle.

No tratamento com menor concentração de extrato aquoso, i.e. 0,021 µg/disco, foi verificado uma redução de 85% dos vasos sanguíneos, porém, nenhum dos tratamentos em estudo apresentou valores percentuais de vasos superior ao do controle negativo (tabela 28).

Tabela 28. Número de vasos sanguíneos (médias \pm EPM) detectados nos limites dos discos de metilcelulose implantados na vesícula vitelínica de embriões de galinha, segundo o tratamento com extrato aquoso de cacau.

Extrato aquoso de cacau (mg/disco)	Número de vasos formados ***
Controle negativo*	101 \pm 5
0,021	15 \pm 1d
0,07	51 \pm 2 a
0,21	57 \pm 1 a
0,7	49 \pm 3 b
2,1	45 \pm 2 c
Controle positivo**	37 \pm 3

Todos os tratamentos apresentaram diferenças altamente significativas ($p < 0,001$) em relação ao controle (ANOVA). Valores médios de número de vasos formados significativamente distintos ($p < 0,05$) são acompanhados pelas letras **a**, **b** e **c**.

* Solução de heparina (50UI) e hidrocortisona (diluição 1:50- 156 μ g/disco).

** Solução de metilcelulose 0,45%.

13.1.3. Análise da vasculogênese de embriões tratados com cafeína

O café e o cacau são espécies que destacam-se por seus teores de cafeína, em relação a outras espécies vegetais. Devido ao fato deste alcalóide estar presente em ambas as biomassas em estudo e por apresentar ação sobre os processos de neovascularização (ROSS et al., 2000; MICHELS et al., 2002; LU et al., 2002; BALLONE, 2004) o efeito da administração deste metabólito secundário sobre a vasculogênese de embriões de *G. domesticus* foi estudado no presente trabalho.

O resultados comparativos entre as atividades vasculogênicas foram apresentados somente para o tratamento correspondente a concentração intermediária (de 0,21 μ g/disco), pelo fato de que, em análises anteriores, verificou-se que nesta concentração a atividade sobre a vasculogênese foi mais evidente para todos os extratos e também a cafeína.

A administração de cafeína nas doses em estudo mostrou um aumento no número de vasos sanguíneos nos embriões de galinha, apresentando 120 ± 7 vasos (Figura 28).

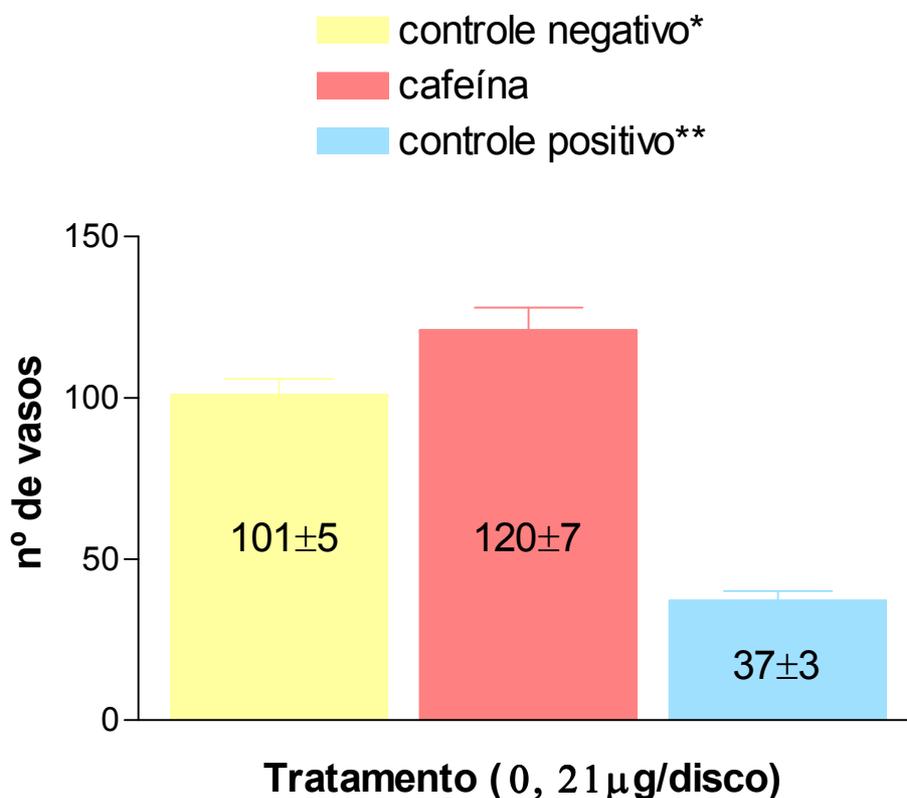


Figura 28. Número de vasos sanguíneos (média \pm EPM) formados resultante dos tratamentos com cafeína e controles negativo e positivo (concentração equivalente a $0,21 \mu\text{g}/\text{disco}$) em embriões de *Gallus domesticus*.

* Solução de heparina (50UI) e hidrocortisona (diluição 1:50- $156 \mu\text{g}/\text{disco}$).

** Solução de metilcelulose 0,45%.

13.2 Atividade antioxidante *in vitro* dos extratos aquosos de café e cacau

13.2.1 Determinação da capacidade sequestradora do radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$) medida da degradação da desoxirribose

13.2.1.1. Efeito dos extratos aquosos de café

Analisando os dados da figura 29 referentes à medida da degradação da desoxirribose, observa-se comparativamente que a amostra 40002871 apresentou melhor capacidade antioxidante. Já, com relação às diferentes concentrações analisadas para cada amostra, ou seja, independente da amostra de café, foram as duas maiores concentrações em estudo (10 e 100 $\mu\text{g/ml}$), que apresentaram maior atividade antioxidante (próxima a 100%). Enquanto a menor defesa antioxidante foi verificada nas menores concentrações (0,1; 1,0 $\mu\text{g/ml}$). Além disto, os resultados obtidos indicam que a inibição da degradação da desoxirribose mostrou-se dependente da concentração dos extratos, sendo evidenciada de maneira significativa nas maiores concentrações (1,0; 10,0 e 100,0 $\mu\text{g/ml}$).

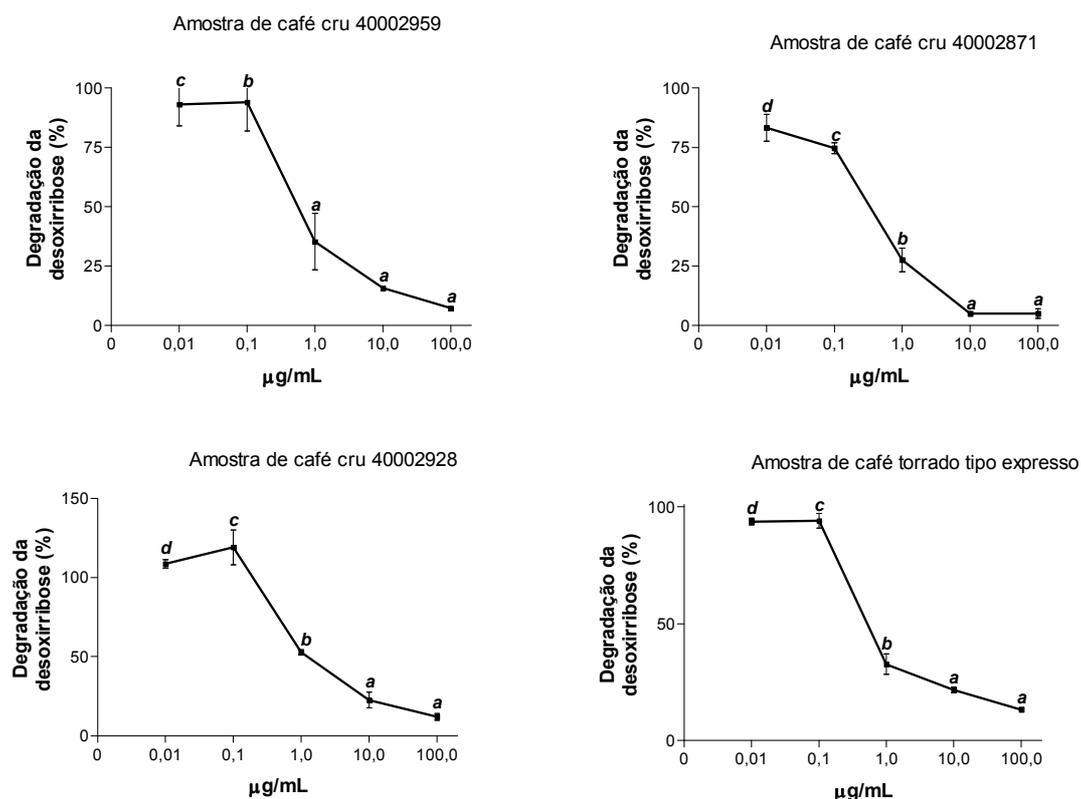


Figura 29. Atividade antioxidante apresentada pelos extratos aquosos de café: 40002928, 40002817, 40002959 e café expresso em diferentes concentrações (0,01; 0,1; 1,0; 10,0 e 100 $\mu\text{g/ml}$).

Diferenças significativas expressas pelas letras *a*, *b*, *c* e *d* (valor médio \pm EPM de três determinações, em triplicata), analisadas pelo teste de Tukey (5%), Avaliação dos extratos de cacau

13.2.1.2. Avaliação dos extratos de cacau

Na figura 30 estão representados graficamente os efeitos quantitativos da administração dos tratamentos de extrato aquoso de cacau natural (Indeca) sobre a capacidade sequestradora do radical $\text{OH}\cdot$ *in vitro*. É possível observar no histograma que a inibição da degradação da desoxirribose foi dependente da concentração do extrato de cacau, sendo evidenciada de maneira significativa já nas menores concentrações.

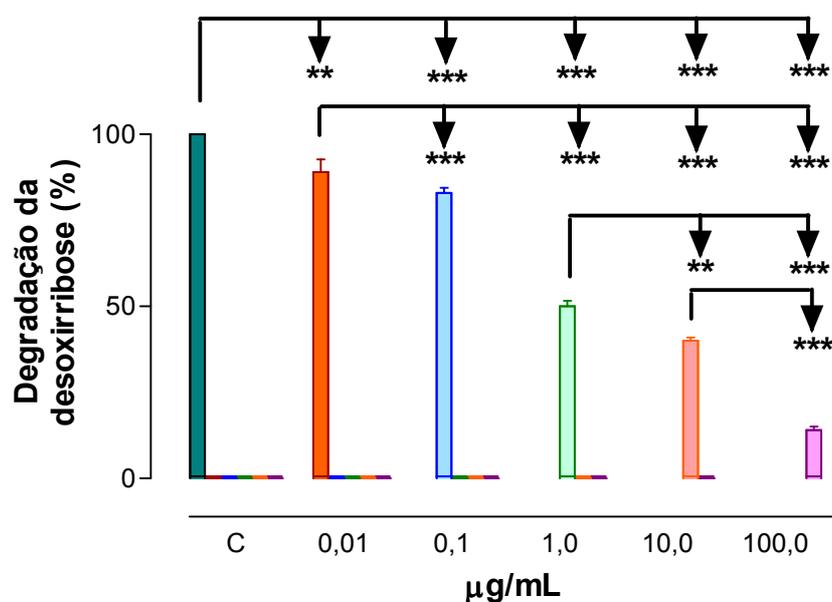


Figura 30. Efeito do extrato aquoso de cacau natural (Indeca) na capacidade sequestradora de radicais $\text{OH}\cdot$ *in vitro* em diferentes concentrações dadas em percentagem de degradação de desoxirribose. As colunas no histograma representa o valor médio \pm EPM de três determinações. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA- *Teste de Tukey*).

De forma similar, a figura 31 apresenta os valores de inibição da degradação da desoxirribose do extrato de cacau alcalino lecitinado Bretzke.

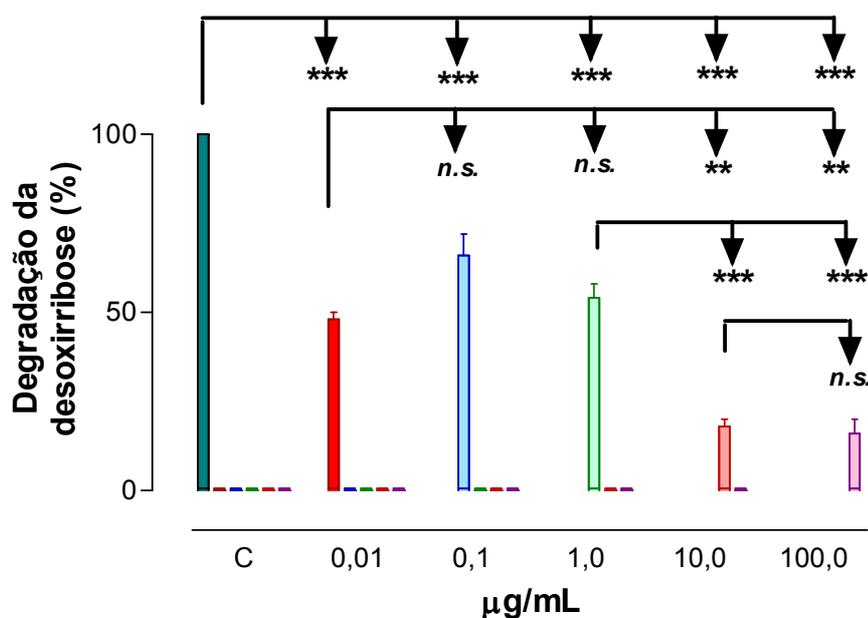


Figura 31. Efeito do extrato aquoso de cacau alcalino lecitinado Bretzek na capacidade sequestradora de radicais OH^\cdot *in vitro* em diferentes concentrações dadas em percentagem de degradação de desoxirribose. As colunas no histograma representa o valor médio \pm EPM de três determinações, em triplicata. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. ($p > 0,05$). (ANOVA- *Teste de Tukey*).

O extrato aquoso da amostra de cacau alcalino T-800, por sua vez, apresentou inibição significativa da degradação da desoxirribose nas maiores concentrações (10,0 e 100,0 $\mu\text{g/ml}$) em estudo (Fig. 32). Todavia, o efeito protetor da ação oxidante do radical hidroxil sobre a desoxirribose não foi detectado nos tratamentos de concentrações de 0,001 e 0,1 $\mu\text{g/ml}$, sugerindo a ausência de ação antioxidante efetiva nestas doses.

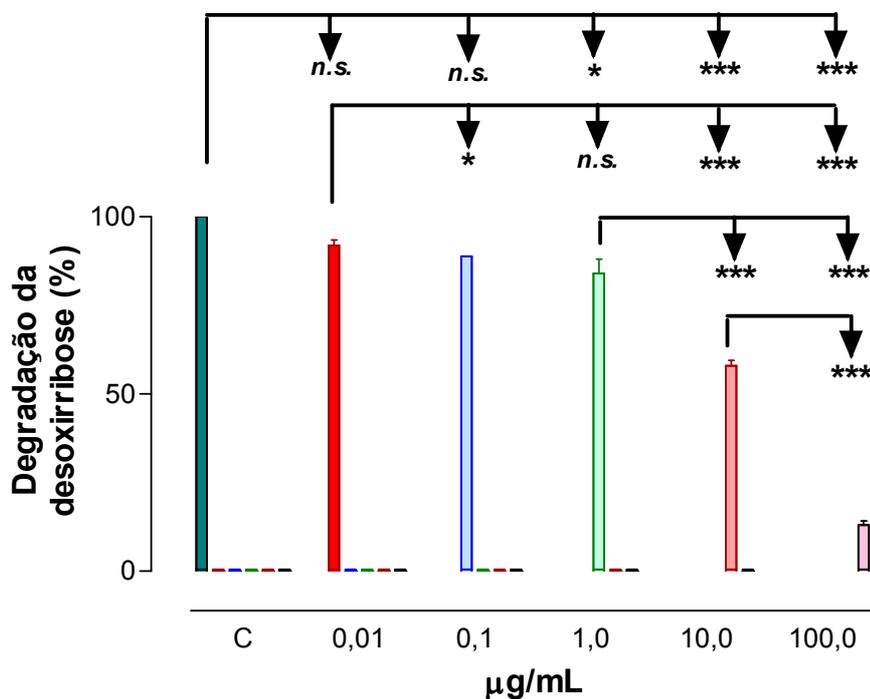


Figura 32. Efeito do extrato aquoso de cacau alcalino T-800 (Indeca) na capacidade seqüestradora de radicais OH^\cdot in vitro em diferentes concentrações dadas em percentagem de degradação de desoxirribose. As colunas no histograma representa o valor médio \pm EPM de três determinações. em triplicata. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; n.s. $P > 0,05$. (ANOVA- *Teste de Tukey*).

13.2.2 Determinação da Capacidade Sequestradora do Radical Ânion Superóxido (O_2^\cdot) de extratos aquosos de café e cacau

13.2.2.1. Extratos aquosos de café

A capacidade seqüestradora do radical ânion superóxido pelos extratos aquosos de cafés está representada como percentual de redução do NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) na figura 33. A análise estatística revelou a ocorrência de diferença estatística somente para os tratamentos de maior concentração, i.e., 100 µg/ml e 1000 µg/ml independente da amostra analisada, ou seja, todas apresentaram o mesmo perfil de resposta com relação a este efeito antioxidante.

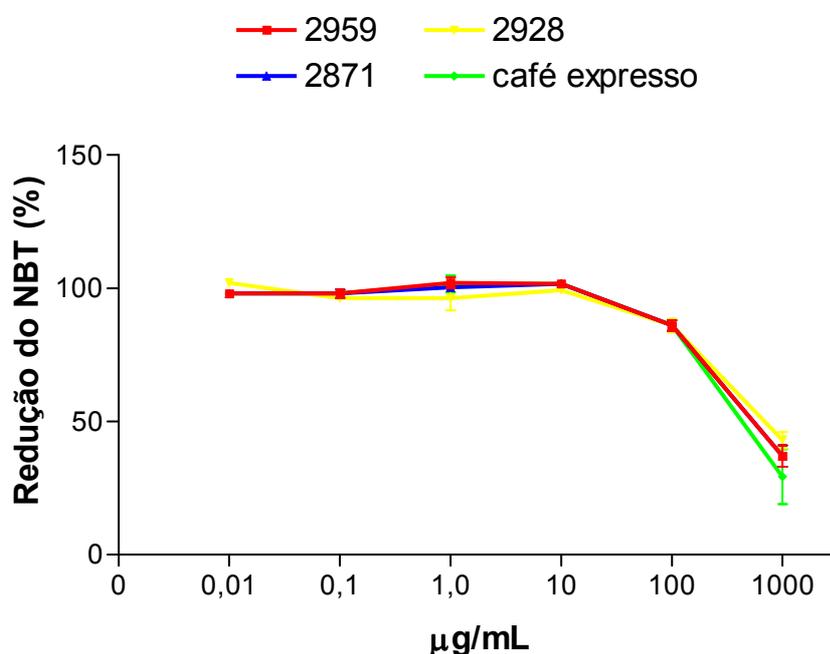


Figura 33. Capacidade seqüestradora do ânion superóxido dos extratos aquosos de cafés 40002959, 40002871, 40002928 e café expresso, expressa em valores percentuais de redução do NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*). (ANOVA- Teste de Tukey -5%).

13.2.2.2. Extratos aquosos de cacau

De forma semelhante, a capacidade seqüestradora do radical ânion superóxido pelos extratos aquosos de cacau está representada na figura 34, que mostra em termos percentuais a redução de NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*). Nas três amostras testadas de cacau, nas duas maiores concentrações (100 e 1000 µg/ml), foram observadas diferenças significativas. Também se observa que o cacau alcalino lecitinado apresentou a menor capacidade seqüestradora do radical ânion superóxido.

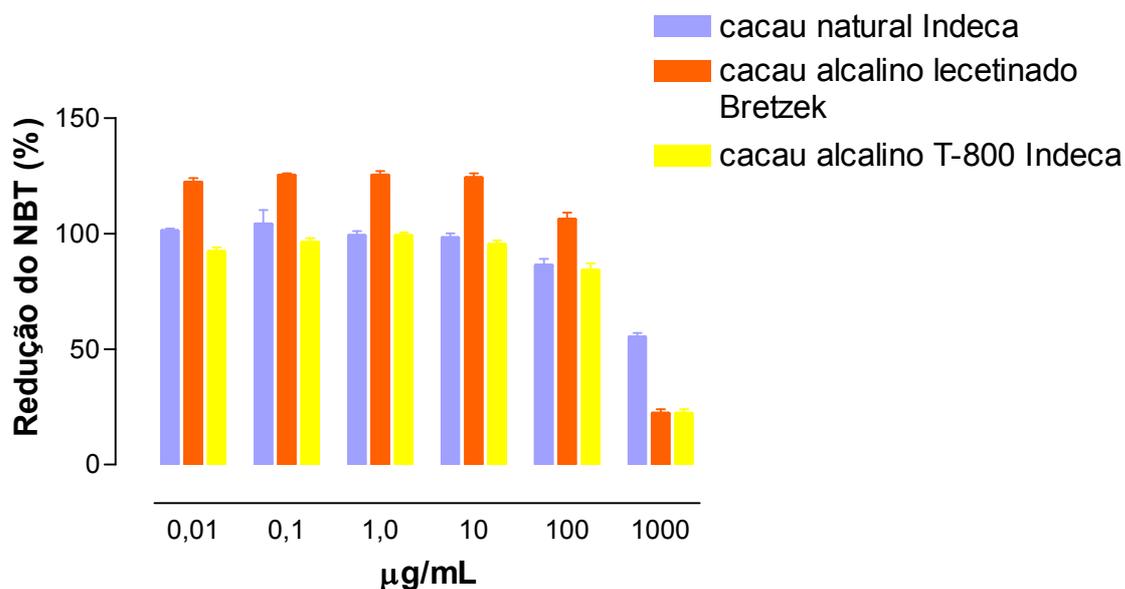


Figura 34. Capacidade seqüestradora do ânion superóxido pelos extratos aquosos de cacau, expressa em porcentagem de redução de NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*).

Nas duas metodologias utilizadas para estudar a capacidade antioxidante, bem como nos experimentos para verificação da atividade vasculogênica, observou-se que as concentrações de 0,1-100 µg/ml foram as que apresentaram os melhores resultados.

14. DISCUSSÃO

O café e o cacau são alimentos muito consumidos mundialmente. Devido à popularidade destes alimentos, existem muitas implicações nutricionais e interações com a saúde associadas com seu consumo, as quais, por não estarem bem esclarecidas geram divergências na comunidade científica. Com isso, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos acerca dos efeitos dos constituintes químicos destas biomassas, notadamente aqueles oriundos do metabolismo secundário.

O extrato de cacau em pó analisado apresentou um efeito inibitório da vasculogênese, com uma redução superior a 50% nas concentrações de 0,021, 0,07, 0,7 e 2,1 $\mu\text{g}/\text{disco}$ em relação controle negativo. Contudo, dentre as cinco concentrações analisadas, verificou-se uma maior inibição da formação de vasos sanguíneos (15 ± 1 vasos), na menor concentração, sendo esse efeito inibitório superior ao controle positivo (heparina-hidrocortisona; 37 ± 3 vasos). Em um estudo desenvolvido por Cao e Cao (1999), foi relatada a ação antiangiogênica em membrana córioalantóica de embriões de galinha (CAM) da epigalocatequina galato (EGCG), em concentrações de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{disco}$, presente na biomassa de cacau. Com isso, o efeito inibitório da vasculogênese decorrente da administração do extrato aquoso de cacau em pó no presente estudo pode ser explicada, em alguma extensão, à provável presença desse composto. Porém, os resultados não sugerem a existência de um perfil dose-dependente, fato que não corrobora com estudo citado.

Ainda que a vasculogênese possa ser considerada usualmente um processo de relativa relevância no organismo de um indivíduo adulto normal (FOLKMAN; SHING, 1992) e que o conceito de neovascularização de tumores esteja vinculado em geral à angiogênese, o processo de vasculogênese, até então restrito à embriogênese inicial, vem sendo relacionado a condições fisiopatológicas em adultos, como úlceras (em razão da redução do número de vasos), tumores (câncer), artrite, lupus, psoríases, retinopatias proliferativas e aterosclerose, entre outras (BLONTRADE et al, 1998; LIAU; SU; DIXON, 2001;

WEISBURGER, 2001; JANAVEL et al., 2001; KRIS-ETHERTON et al., 2001; FELMEDEN; BALNN; RIBATTI et al, 2001; LaRuc et al., 2003; LIP, 2003; FELMEDEN; BLANN; LIP, 2004). Como exemplo, em alguns tipos de tumores, células precursoras de endotélio podem ser mobilizadas a partir da medula óssea e transportadas através da corrente sanguínea, incorporando-se à parede de vasos em desenvolvimento (ORLIC et al., 2001; RAFII; LYDEN, 2003; SIMONS; WARE, 2003; ZAMMARETTI; ZISCH, 2004; SCHUSTER et al., 2004). Esse mecanismo é bastante similar ao processo de vasculogênese normal, responsável pela formação dos vasos sanguíneos vitelínicos primordiais, recebendo a denominação de mimetismo vasculogênico (*vasculogenic mimicry*).

Cao e Cao (1999) demonstraram a ação inibitória da administração da EGCG (epigallocatequina galato) *in vitro* sobre a formação de vasos sanguíneos secundários (angiogênese) estimulados pelo fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor* - VEGF). Este resultado é de interesse, uma vez que em alguns processos carcinogênicos, o desenvolvimento e a proliferação dos tumores mostram-se como eventos geralmente dependentes da angiogênese, de modo que muitos trabalhos têm buscado identificar substâncias inibidoras na formação de vasos sanguíneos, e deste modo, inibir o crescimento tumoral. Por outro lado, estudos revelam a ação antitumoral da EGCG *in vivo* (MUKHAR; AHMAD, 2000). Lu e colaboradores (2002) demonstraram que a aplicação tópica deste composto apresenta um efeito inibitório na proliferação de tumores malignos, devido à sua ação estimulante do processo de apoptose. Um estudo desenvolvido por Yang (1998) corrobora com esta afirmação, porém é ponderado que, em geral, as concentrações efetivas para a indução da apoptose são maiores que as requeridas na inibição da formação de vasos. Segundo Juzwiak e Paschoal (2005), a EGCG apresenta ação anticarcinogênica, inibindo a iniciação e a promoção de marcadores bioquímicos de tumores, a apoptose e a taxa de replicação das células.

É possível considerar que a bioatividade dos compostos presentes no extrato aquoso do cacau na formação de vasos sanguíneos possa ocorrer através

de diversos mecanismos, em razão da diversidade de metabólitos presentes (matriz orgânica complexa), tais como a teobromina, a cafeína, a teofilina e o ácido gálico, entre outros.

De fato, e como suporte para esta hipótese, segundo Chorostowska-Wynimko e colaboradores (2004), a teobromina diminui a angiogênese nos tecidos de embriões, inibindo seu crescimento. A cafeína, segundo Michelis e colaboradores (2002), apresenta efeito inibitório da mitose, provavelmente resultante de sua interferência negativa sobre a síntese de DNA (ácido desoxirribonucléico) e outras etapas de divisão celular. A cafeína induz ainda diferenciação celular, diminuindo a susceptibilidade à carcinogênese. Além disso, Lu e colaboradores (2002) demonstraram a ação inibitória da cafeína sobre o desenvolvimento de tumores de pele não malignos, via processo de apoptose. Procianidinas presentes no cacau também têm sido consideradas com ação anticarcinogênica (BLOCK, 1992; BLOCK; LANGSETH, 1994).

No presente trabalho, os resultados indicaram um efeito pró-vasculogênico quando da administração de cafeína pura, com um valor médio de número de vasos correspondente a 120 ± 7 . Este composto promoveu o crescimento de um número maior de vasos na vesícula vitelínica e, conseqüentemente, um maior crescimento celular endotelial em relação ao controle (101 ± 5 vasos). Entretanto, outros estudos demonstram que a cafeína – o maior constituinte da biomassa de café – apresenta uma ação inibitória do processo carcinogênico, a qual está relacionada com a formação e proliferação celular (ROSS et al., 2000; MICHELS et al., 2002; LU et al., 2002; BALLONE, 2004). Devido a esses resultados controversos sobre a atividade da cafeína nas vasculogênese, é recomendável a realização de estudos subsequentes como estratégia para elucidar em definitivo esta questão. De fato, é sabido que outros compostos presentes na biomassa de café, como por exemplo, os ácidos *p*-cumárico e clorogênico, apresentam atividade carcinogênica (GOLDBERG et al., 1998; YUMAWA et al, 2004).

O efeito estimulante da administração do extrato aquoso da biomassa de café *in natura* (cru) sobre a formação de vasos sanguíneos foi mais significativo na

concentração intermediária de 0,21 $\mu\text{g}/\text{disco}$ (157 ± 4 vasos), tendo produzido um número de vasos superior ao tratamento com cafeína pura (120 ± 7). Vale ressaltar que essa concentração (0,21 $\mu\text{g}/\text{disco}$) é comparável ao consumo de 300 mg de cafeína/dia/indivíduo adulto, ou seja, correspondente a um consumo diário de 3 xícaras da bebida café (CAVALCANTE et al., 2000; ALTIMARI et al., 2001). Entretanto, faz-se necessário considerar que as ações dos compostos presentes na biomassa de café no organismo humano apresentam muitas variações devido às diferenças de metabolização, i.e., absorção, distribuição tecidual, meia-vida, excreção, por exemplo, entre indivíduos e populações.

Os tratamentos com os extratos aquosos de café cru apresentaram um efeito positivo sobre a formação dos vasos sanguíneos de embriões de *G. domesticus*. Contudo, não foi possível detectar uma relação dose-dependente para os tratamentos em estudo.

Inúmeros estudos têm relacionado o processo carcinogênico com a atividade antioxidante dos compostos fenólicos (LEE et al., 2003). Por exemplo, a redução do estresse oxidativo pela ação de compostos fenólicos bloqueia a formação de espécies oxidativas de oxigênio (ROS) e as alterações no equilíbrio redox, resultando na ativação de alguns fatores de transcrição que regulam os níveis de expressão de um dos fatores angiogênicos chave, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (CAO; CAO; BRAKENHIELM, 2002). A associação *in vitro* do VEGF e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) produz um forte estímulo à formação de vasos sanguíneos, porém, somente o aumento da concentração de FGF é suficiente para ativar toda a cascata de eventos necessários ao processo. Estudos têm demonstrado que este último fator regula a permeabilidade vascular, favorecendo o extravasamento de proteína, permitindo assim a formação de um gel de fibrina apto para a migração e organização das células endoteliais (MUROHARA; HOROWITZ; SILVER, 1998; JANAVEL et al., 2001; FELMEDEN; BLANN; LIP, 2003). Entretanto, dados relativos a estudos concernentes a aspectos epidemiológicos da ação antioxidante decorrentes da ingestão das biomassas vegetais de interesse, i.e., café e cacau, na prevenção do

câncer são limitados (CAO; CAO; BRAKENHIELM, 2002).

Segundo Lee e colaboradores (2003), os radicais livres causam doenças degenerativas no homem como o câncer. Recentemente, antioxidantes derivados dos alimentos têm despertado a atenção da comunidade científica, devido ao conhecido efeito quimiopreventivo em resposta a mudanças oxidativas.

Segundo Oliveira (2004), as substâncias antioxidantes, em baixa concentração, têm a capacidade de inibir ou retardar um determinado processo oxidativo, evitando assim prováveis reações de oxidação de moléculas vitais ao nosso organismo e, conseqüentemente, evitando distúrbios orgânicos. No presente trabalho, foram utilizados dois métodos *in vitro* para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos de café *in natura* (cru) e cacau em pó, a saber: o teste do NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) e teste para determinação da degradação da desoxirribose.

O teste do NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) avalia a capacidade antioxidante através da habilidade de uma substância em seqüestrar o radical superóxido (O_2^-), o qual, uma vez formado, é capaz de oxidar moléculas orgânicas necessárias para nosso organismo, i.e. proteínas e lipídios, podendo causar diferentes enfermidades. Neste teste, a atividade antioxidante é medida em termos da inibição da geração do radical superóxido. Esse radical é formado através de uma reação não enzimática (fenazina-metasulfato), na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e oxigênio molecular, reduzindo o NBT e produzindo o formazan, um composto de coloração rósea (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1989; SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Vale ressaltar que quanto menor a redução desse composto maior é a capacidade antioxidante do extrato.

Os extratos aquosos de café *in natura* (cru) apresentaram capacidade antioxidante somente nas maiores concentrações (100 e 1000 $\mu\text{g/ml}$). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os (poli) fenóis do café, como os ácidos clorogênico, caféico, ferúlico, *p*-cumárico e fenílico apresentam ação antioxidante (MAYDATA, 2002; PANZELLA; NAPOLITANO; D'ISCHIA, 2003; HUANG; PAULIS; MAY, 2004). Com isso, sugere-se que a ação antioxidante deste extrato se deve à presença dos compostos acima.

Tem sido relacionado a atividade antioxidante dos polifenóis à doenças vasculares (RICE-EVANS et al., 1995). É sabido que em quadros clínicos de aterosclerose, o colesterol e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) podem ser oxidadas (LANGLEY; SIMON, 2000; ENGLER; ENGLER, 2004). Segundo Maydata (2002), a proteção da oxidação das LDL não ocorre, via de regra, em função de um único composto (poli) fenólico, mas como resultado da atividade antioxidante total de todos eles, pois essas moléculas podem exercer um efeito tanto sinérgico como antagônico quando estão presentes em misturas complexas. Estudos realizados por Nishida e Satoh (2004) comprovam a afirmação citada anteriormente. Maydata (2002), avaliando a capacidade antioxidante de três bebidas comuns, i.e., cafés (torrado e verde), chás preto e verde e achocolatado, observou maior efeito em relação ao café, seguido do chocolate, chá verde e chá preto. Porém, segundo esse autor, quando comparados entre si, os cafés torrado e cru mostraram efeito antioxidante distinto, com maior intensidade para este último. Tal fato está associada à perda de parte dos compostos fenólicos durante a torrefação dos grãos de café, devido à termoinstabilidade daqueles metabólitos, ainda que seja observada a formação de outros antioxidantes menos ativos. Devido à diferença no teor destes compostos em relação à forma de processamento dos cafés, neste estudo também foi verificada a atividade antioxidante do café torrado tipo expresso. Assim, os dados do presente trabalho relativos à comparação da capacidade de seqüestro do radical superóxido dos extratos aquosos cafés *in natura* e torrado, não diferiram estatisticamente, resultados estes que não corroboram aos achados descritos por Maydata (2002).

Os tratamentos utilizando os extratos aquosos de amostras de cacau em pó (cacau natural Indeca, cacau alcalino T-800 Indeca e cacau alcalino lecitinado Bretzke) apresentaram maior capacidade de seqüestro do radical superóxido (teste do NBT) somente na maior concentração (1000 µg/ml), comparativamente aos tratamentos com extratos aquosos de café (0,1 a 1000 µg/ml).

No cacau e seus derivados, os flavonóides, com destaque às catequinas (C), epicatequinas (EC), epicatequinas galato (ECG) e epigalocatequinas galato (EGCG) e procianidinas, apresentam propriedades antioxidantes comprovadas em

sistemas *in vitro* e *in vivo*, (PORTER; CHAN, 1991; WAN et al., 2001; WAN et al., 2001; WEISBURGER, 2001; SUGIHARA et al., 2001; CAO; CAO; BRAKENHIELM, 2002; CARNÉSECCHI et al., 2002; LU et al., 2002; OSAKABE et al., 2002; KRIS-ETHERTON et al., 2002; LEE et al., 2003; MAYDATA, 2002; KEEN, 2002). Dentre esses flavonóides, a EGCG apresenta maior capacidade antioxidante, considerada 100 vezes mais eficaz que a vitamina C e 25 vezes mais eficaz que a vitamina E (VINSON et al., 1995; RAUHA, 2001). É instigante sugerir uma possível conexão entre a atividade antioxidante da EGCG e sua propriedade antitumorogênica (MUKHOR; AHMAD, 2000).

Segundo Wan e colaboradores (2001), o consumo de cacau em pó pode apresentar um efeito protetor das doenças cardiovasculares em razão da presença dos compostos fenólicos, os quais reduzem a susceptibilidade à oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), como ocorre com os polifenóis do café. Miura e colaboradores (2001), demonstraram a ação dos flavonóides do grupo das catequinas na prevenção da aterosclerose. A ação antioxidante das catequinas sobre as LDL também foi demonstrada por Kondo e colaboradores (1999), Yokozawa; Nakagawa; Kitani (2002), Cren-Olivé e colaboradores (2003) e Kuang-Yuh e colaboradores (2004), entre outros.

A atividade antioxidante também pode ser avaliada pela capacidade de seqüestro do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), através do teste de degradação da desoxirribose. O radical hidroxil é considerado o radical livre mais reativo nos sistemas biológicos, pois não há enzimas que catalisem a sua remoção. Ainda que o oxigênio molecular não possa ser reduzido diretamente por 3 elétrons, O_2 e H_2O_2 , este pode reagir na presença de certos metais de transição, metais quelantes e hemoproteínas que conduzem à formação desse radical livre (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1989; OLSZEWER, 1995).

Nos experimento para avaliação da capacidade seqüestrante de ânion hidroxil, foram utilizadas quatro concentrações de extratos aquosos: 0,1; 1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (uma a menos que o utilizado no teste NBT, que avalia a capacidade seqüestrante do ânion superóxido), devido ao fato de que estudos prévios demonstraram a ação antioxidante acentuada desses extratos já nas

concentrações mais baixas. Nesse teste, a atividade antioxidante dos extratos de café e cacau foi avaliada em termos de porcentagem de degradação da desoxirribose, um açúcar constituinte da molécula de DNA (ácido desoxirribonucléico), cuja degradação pode causar mutações, aberrações cromossômicas e neoplasias (RAUHA, 2001).

A análise da degradação da desoxirribose baseia-se na reação entre o cloreto férrico (FeCl_3) e ácido nitrilotriacético (NTA), seguido da adição de H_2O_2 , evento denominado reação de Fenton. O radical gerado não pode ser seqüestrados por outros componentes da reação e ataca a desoxirribose presente no meio, degradando-a em uma série de fragmentos, os quais reagem com o ácido tiobarbitúrico, em pH 7,4 formando um composto de coloração rósea (formazan), cuja concentração pode ser mesurada lendo-se a absorbância a 532 nm (NISHIDA; YOSHIKAWA; AKAMATSU, 1991; SÁNCHEZ-MORENO, 2002). A capacidade de seqüestrar o íon $\cdot\text{OH}$ da substância adicionada nesta reação é determinada com base na inibição da degradação desta molécula de desoxirribose (OLSZEWER, 1995).

Neste trabalho, observou-se que o extrato aquoso de café cru apresentou atividade antioxidante pelo teste da desoxirribose, nas concentrações de 1; 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$. Comparativamente, a capacidade antioxidante desses, foi mais eficiente para esse teste, uma vez que no teste do NBT, o efeito só foi observado nas maiores concentrações do extrato aquoso (100 e 1000 $\mu\text{g/ml}$).

Segundo Lee e colaboradores (2003), a capacidade antioxidante de substâncias (poli) fenólicas, sobretudo os flavonóides, depende do número total de grupamentos hidroxila livres presentes em cada composto, que pode aumentar significativamente a produção de radicais hidroxil pelo sistema de Fenton. Outros estudos sugerem que altas doses destes metabólitos secundários induzem alterações na estrutura do DNA (DHIRAKI et al., 1994, JOHNSON; LOO, 2000).

É possível separar as amostras de cacau em pó analisadas em dois grupos. A amostra de cacau em pó natural Indeca apresentou efeito antioxidante nas concentrações de 1,10 e 100 $\mu\text{g/ml}$, enquanto o cacau alcalino lecitinado Bretzke

e o cacau alcalino T-800 Indeca só apresentaram tal efeito nas duas maiores concentrações, isto é, 10 e 100 µg/ml.

Comparando-se os dois métodos de avaliação da capacidade antioxidante, os extratos aquosos das biomassas em estudo apresentaram eficiência similar no seqüestro de radical hidroxil (método da desoxirribose). Contudo, devido ao fato destes métodos de análise da capacidade antioxidante serem *in vitro*, sugere-se que a avaliação dos extratos das biomassas por métodos utilizando sistemas *in vivo*, tal como a determinação da peroxidação lipídica em homogenato de fígado de rato.

Os resultados de atividade pró-vasculogênica do extrato aquoso de café cru sugerem uma alternativa de interesse na prevenção de doenças relacionadas à angiogênese excessiva, como processos tumorais, psoríase (lesões são caracterizadas pelo aumento do calibre e do comprimento de vasos presentes na derme), os processos inflamatórios (em muitos órgãos, angiogênese prolongada e excessiva é marca registrada de desordens inflamatórias), endometriose (o crescimento, para dentro da cavidade peritoneal, do tecido que reveste o útero, depende da formação de novos vasos), artrite reumatóide (nessa condição inflamatória, os capilares sangüíneos invadem e destroem a cartilagem das articulações), retinopatias em quadros de diabetes (a diabetes provoca proliferação de novos vasos na retina, o que pode levar à cegueira), entre outras (DIAS; RIBEIRO-DO-VALLE; MARASCHIN, 2003). Além disso, os extratos aquosos de cacau, em face da sua ação inibidora da vasculogênese, poderiam ser considerados como de potencial uso na prevenção de doenças relacionadas à insuficiência de formação de vasos sanguíneos, como úlceras, aterosclerose e acidente vascular cerebral (AVC), entre outras patologias.

Segundo Olszewer (1995), a evidência do envolvimento de radicais livres (RL) em alguns tipos de processos carcinogênicos induzidos por substâncias químicas tem crescido de forma intensa. Nos pacientes com câncer, o metabolismo dos RL adquire situações próprias e o conhecimento da sua patologia nos permite indicar opções terapêuticas, principalmente por antioxidantes exógenos. Esses radicais são produzidos intensamente nos

pacientes com câncer, ao mesmo tempo em que os níveis de antioxidantes enzimáticos são substancialmente baixos, principalmente no que se refere à catalase e à superóxido dismutase, o que, por sua vez, ocasiona um excesso de peróxidos de hidrogênio (H_2O_2), determinado lesões celulares de todos os sistemas biológicos.

A atividade dos radicais livre ocorre em células com alta reatividade. Estas células estão continuamente sob estresse oxidativo e, apesar do DNA estar protegido pelo sistema antioxidante endógeno, pode sofrer alterações pela ação dos RL que levam ao processo carcinogênico (OLSZEWER, 1995). Como exemplo, o radical hidroxil é capaz de reagir com o DNA, gerando uma série de modificações nas bases purínicas e pirimidínicas desta macromolécula, levando ao desenvolvimento de tumores (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998). Olszewer (1995) define que o câncer provavelmente é uma consequência de uma célula geneticamente lesada e hipermutável, em consequência de seu sistema antioxidante lesado.

Existe também uma forte evidência de que o crescimento dos tumores esteja ligado aos radicais livres, uma vez que esses se ligam a receptores da membrana celular, determinando a liberação excessiva de radicais superóxidos, também ocasionando lesões celulares. Calcula-se que dentre os diversos tipos de cânceres na espécie humana, 80% a 90% têm sua origem por exposição do indivíduo a agentes químicos, um processo iniciado e mantido pela presença de radicais livres. O conhecimento desses compostos, assim como dos antioxidantes, tem aberto um leque enorme de possibilidades para o estudo da etiologia tumoral, assim como de novos tratamentos capazes de limitar o crescimento de tumores, podendo atuar diretamente nos tecidos neoplásicos sem alterar a estrutura dos tecidos normais, um fato não observado com o uso das quimio-radioterapias atuais. Entretanto, pondera-se que o conhecimento científico muito terá que avançar, principalmente para se conseguir definir os limites criados pelos novos antioxidantes, quando é visado o controle da multiplicação das células neoplásicas (OLSZEWER, 1995). De qualquer forma, parece consenso que a dieta rica em polifenóis (i.e. flavonóides) também pode ser uma alternativa para a prevenção de

doenças relacionadas ao combate de radicais livres. Os resultados da avaliação da atividade antioxidante dos extratos aquosos das biomassas de café cru e cacau obtidos neste trabalho são preliminares, mas apontam para a importância da continuidade da investigação, na medida em que revelam respostas de interesse à prevenção do estresse oxidativo celular.

15. CONCLUSÕES

- O extrato aquoso de café *in natura* (cru) apresenta ação pró-vasculogênica, estimulando a formação de vasos sanguíneos;
- O extrato aquoso de cacau em pó lecitinado apresenta ação anti-vasculogênica, na medida em que inibe a formação de vasos sanguíneos;
- Os extratos aquosos de café cru e cacau em pó mostraram-se mais eficientes na capacidade de seqüestro do íon hidroxil, comparativamente ao radical superóxido.

16. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para aprimoramento dos resultados obtidos, sugere-se a continuidade dos estudos referentes a vasculogênese, através, por exemplo, da comparação das respostas dos tratamentos utilizados com a administração dos compostos isolados presentes nos extratos, bem como em relação a padrões de ação sobre a vasculogênese e angiogênese como o FGF (fator de crescimento fibroblástico) e a vitamina E. Nesse contexto, deverão ser administrados compostos da biomassa de café e/ou cacau isoladamente, para estabelecer uma análise comparativa com o extrato bruto.

Por meio da caracterização e comprovação da segurança de uso das biomassas de café e cacau, com relação aos seus efeitos biológicos, pode-se agregar valor ao produto, visto que estas biomassas podem ser potencialmente destinadas para outros fins, como o desenvolvimento de novos produtos pelas indústrias de fitoterápicos e cosméticos, por exemplo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E.S.; MEDEIROS, G.M. de; SPINELLI, M.G.N. **Fitoquímicos: substâncias protetoras em alimentos.** Disponível em <http://www.nutricaoempauta.com.br/novo/38/nutriclinica.html>. Acesso em 7 de setembro de 2004.

AGARDH, E.E.; CARLSSON, S.; AHLBOM, A.; EFENDIC, S.; GRILL, V.; HAMMAR, N.; HILDING, A.; OSTENSON, C.G. Coffee consumption, type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in Swedish men and women. **J Intern Med.** 255: 645-52, 2004.

ALMEIDA, A .A . P.; OLIVEIRA, L.S de.; SANTOS, T.M.; GLÓRIA, M.B.A. Café e saúde: três décadas de estudos. **Rev. Brasileira de Armazenamento.** Especial café. Minas Gerais, 7: 56-63, 2003.

ALTIMARI, R.L.; CYRINO, E. S.; ZUCAS,S.M.; OKANO, A .H.; BURINI, R.C. Cafeína: ergogênico nutricional no esporte. **Rev. Bras. Ciên. e Mov.** 9: 57-64, 2001.

AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION. Disponível em <<http://www.eatright.org> >. Acesso em 15 de março de 2004.

AMORIM, H.D.; SILVA, O .M. Relationship between the polyfenoloxidase activity of coffee beans and quality of the beverage. **Nature.** 219: 381-382, 1968.

AMORIM, H.V.; TEIXEIRA, A .A. ; MORAES, R.E.; REIS, A .J.; PIMENTEL GOES, F.; MALAVOLTA, E. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro XXVII: efeito da adubação N, P, K no teor de macro e micro nutrientes do fruto e na qualidade da bebida do café. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,** 30: 323-333, 1973.

AMORIM, H.V. **Aspectos bioquímicos e histológicos do grão de café verde relacionado com a deterioração da qualidade.** Piracicaba: ESALQ, 1978. (Tese de livre docência em Bioquímica).

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 398. Disponível em < <http://e-legis.bvs.br>>. Acesso em 14 de junho de 2005.

ASAHARA, T.; MUROHARA, T.; SULLIVAN, A.; SILVER, M.; VAN DER ZEE, R.; LI, T.; WITZENBICHLER, B.; SCHATTEMAN, G.; ISNER, J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science.** 275: 965–967, 1997.

ASAHARA T, TAKAHASHI T, MASUDA H, KALKA C, CHEN D, IWAGURO H. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **EMBO J**, 18: 3964–72, 1999.

ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. **Trends in Plant Science**. 6: 407-412, 2001.

ASCHERIO, A.; ZHANG, S.M.; HERNAN, M.A.; KAWACHI, I.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E.; WILLETT, W.C. Prospective study of caffeine consumption and risk of Parkinson's disease in men and women. **Ann Neurol**. 50: 56-63, 2001.

BALLONE, G.J. Caffeine. **The International Journal of Psychiatry**. Disponível em <<http://www.psiqweb.med.br>>. Acesso em: 05 de agosto de 2004.

BÁRTHOLO, G.F.; GUIMARÃES, P.T.G. Cuidados na Colheita e Preparo do café. **Informe Agropecuário**. 18: 33-42, 1997.

BOLONTRADE, M.F.; STERN, M.; BINDER, R.L.; ZENKLUSEN, C.; GIMENEZ-CONTI, I.; CONTI, C.J. Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors. **Carcinogenesis**, 19: 2107-2113, 1998.

BARONE, J.J; ROBERTS, H. Humam consumption of caffeine, In PB Dews (Ed), Caffeine: Perspectives from recent research. **Springer-Verlag**. 59-73, 1984.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F. R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J. A. Uses and Properties of Citrus Flavonoids. **J. of Agric. and Food Chem**. 45: 4505-4515, 1997.

BOURGAUD, F et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, 161: 839-851, 2001.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr Rev**. 56: 317-333, 1998.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica Y de Farmacognosia**. Espanha: Acribia S.A . , 1991.

CAMARGO, M.C.R. **Avaliação da ingestão potencial de cafeína pela população de Campinas**: UNICAMP, 1996.131p. Dissertação (Mestre em Ciências dos Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)).

CAO, Y.; CAO,R.; BRAKENHIELM, E. Antigiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. **J. of Nutr Bioch**. 13: 30-390, 2002.

CARNÉSECCHI, S. et al. Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cell. **Cancer Letters**. 175: 147-155, 2002.

CARVALHO, V.D.; CHAGAS, S.J. de R.; CHALFOUND, S.N.; BOTREI, N.; JUSTE JUNIOR, E.S.G. Relação entre a composição e qualidade de bebida de grãos beneficiado e qualidade de bebida de café. **Pesq. Agrop. Bras.** 29: 449-454, 1994.

CARVALHO, V.D. de; CHAGAS, S. J. de; SOUZA, S.M.R. Fatores que afetam a qualidade do café. **Informe Agropecuário.** 18: 5-20, 1997.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N.; STEFANI, E. de; VICTORA, C.G.; CASTELLETTO, R.; ROLÓN, P.A. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. **Int J Cancer.** 88:658- 664, 2000.

CATAPANO, A. L. Antioxidant effect of flavonoids. **Angiology.** 48: 39-44, 1997.

CEPLAC- Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira. **Cacau: Informações de Mercado.** Disponível em < http://www.ceplac.gov.br/merc_cacau.htm >. Acesso em: 15 de Outubro de 2002.

COFFERESEARCH. **Coffee.** Disponível em < <http://www.coffeeresearch.org/> >. Acesso em 01 de setembro de 2004.

CONAB- **Companhia Nacional de Abastecimento.** Disponível em < www.conab.gov.br > . Acesso em 05 de janeiro de 2005.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids, chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **J. of Nutr. Bioch.** 7: 66-76, 1996.

COOXUPE- Cooperativa Regional de Cafeicultores em Guaxupé LTDA. Café. Disponível em <http://www.cooxupe.com.br> . Acesso em 20 de fevereiro de 2005.

CORTEZ, J.G. Aptidão Climática para a Qualidade da Bebida nas principais Regiões Cafeeiras de Minas Gerais. **Informe Agropecuário.** 18: 27-31, 1997.

COSIC- Coffee Science Information Cente: Coffee and Caffeine Health Information. **Caffeine.** Disponível em <www.cosic.org>. Acesso em: 21 julho de 2003.

COSTA, A. F. **Farmacognosia.** II vol. 4 ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulberkian, 1994.

COSTA, L.; CHAGAS, S.J.de R. Gourmets: Uma Alternativa para o mercado de Café. **Informe Agropecuário.** 18: 5-20, 1997.

CHAGAS, S.J de R. **Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões produtoras de Minas Gerais.** Lavras: ESAL, 1994, 83 p. (Tese de Mestrado).

CHAGAS, S.J de R.; MALTA, M.R. **Avaliação química e qualitativa de cafés de alguns municípios produtores da região do Vale do Jequitinhonha de Minas.** In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil e Workshop Internacional de Café & Saúde (Porto Seguro). Anais. Embrapa café, 2003. 447p.

CHARNOCK-JONES, D.S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, T.M. Aspects of Human Fetoplacental Vasculogenesis and Angiogenesis. I. Molecular Regulation. *Placenta*. **25**: 103–113, 2004.

CHEN, J. F. et al. Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 21: 1-6, 2001.

CLIFFORD, M.N. Chorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence and dietary burden. *J. of the Food and Agric*. 79: 363-372, 1999.

CHUNG, K.T.; LU, Z.; CHOU, M. W. Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food and Chem. Toxicol*. 36: 1053-1060, 1998.

CREN-OLIVÉ, C.; TEISSIER, E.; DUREZ, P.; ROLANDO, C. Effect of Catechin o-methylated Metabolites and Analogues on Human LDL Oxidation. *Free Rad. Biol. & Med*. 34: 850-855, 2003.

CRUZ, G.L. Dicionário de Plantas Úteis no Brasil. 5 ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1995.

CRUZ, M.A.da. **Patente de nova tecnologia para processamento de cacau.** Disponível em http://www.unicamp.br/unicamp/divulgacao/BDNUH/NUH_2568/NUH_2568.html>. Acesso em 01 de setembro de 2004.

DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; GREGOTTI, C. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem*. 48: 1449-54, 2000.

DALY, J.W.; BERTIL B. FREDHOL, B.B. Caffeine - an atypical drug of dependence. *Drug and Alcohol Dependence*. 51: 199- 206, 1998.

DIABETIC-LIFESTYLE. **Caffeine, Friend or Foe?** Disponível em , <http://www.diabetic-lifestyle.com> >. Acesso em 21 de Setembro de 2003.

DIAS, P.F.; MÜLLER, Y.M.R. Ação da insulina na morfogênese de embriões de *Gallus gallus domesticus*. *Rev. Bras. de Biol*. **59**: 343-350, 1999.

DIAS, P. F.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; DIAS, M.; MACHADO, E.; GONÇALVES, C.; RESGALLAJR, C.; CUNHA, S. R.; ARAUJO, P. S.; OLTRAMARI, A. C.; SILVA, J. M. O. D.; BARROSO, P. A.; PESSATI, M.; MARASCHIN, M. **Atividade de**

polissacarídeos de parede celular de *Laurência microcladia* (*Rhodomelaceae*, *Ceramiales*) na morfogênese e vasculogênese de embriões de *Gallus domesticus*. IIª Jornada Catarinense de Plantas Medicinais, Criciúma-SC, 1999.

DIAS, P.F.; MARASCHIN, M.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; GAGLIARDI, A.R. **Efeito inibitório de polissacarídeos obtidos de parede celular da alga marinha *Sargassum stenophyllum* (Sarg) (*Phaeophyceae*) na vasculogênese *in vivo*.** Resumos do XXXIV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Águas de Lindóia, p 208, 2002.

DIAS, P.; RIBEIRO- DO- VALLE, R.M. ; MARASCHIN, R.P. Na formação dos vasos sanguíneos: fronteiras entre saúde e doença. **Rev. Ciência Hoje.** 32: 22-27, 2003.

DILLINGER, T.L.; BARRIGA, P.; ESCÁRCEGA, S.; JIMENEZ, M.; LOWE, D.S.; GRIVETTI, L.E. Food of the Gods: Cure for Humanity? A Cultural History of the Medicinal and Ritual Use of Chocolate. **J. Nutr.** 130: 2057S- 2072S, 2000.

ENGLER, M.B.; ENGLER, M.M. The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cação and chocolate. **Nutrition Research.** 34: 695-706, 2004.

EVANS, W.C. **Farmacognosia.** 13 ed. Interamericana McGraw-Hill. Mexico: 1991.

EROWID. **Caffeine Effects.** Disponível em < <http://www.erowid.org> >. Acesso em 21 de setembro de 2003.

FAO - **Food and Agriculture Organization of the United Nations.** Disponível em < <http://www.fao.org> >. Acesso em 10 de setembro de 2004.

FELMEDEN, D.C., BLANN, A .D.; LIP, G.Y.H. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. **Eur. Heart J.** 24: 586-603, 2003.

FAPEMIG - Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais. **Café: Mais sabor, qualidade e tecnologia em Minas Gerais.** Disponível em < <http://revista.fapemig.br/8/cafe.html> >. Acesso em 13 de março de 2003.

FERNANDES et al. Teores de Polifenóis, Ácido Clorogênico, Cafeína e Proteína em Café Torrado. **Rev. Bras. da Agroci.**7: 197-199, 2001.

FERNANDES, S.M.; PINTO, N. A .V.D.; PEREIRA, R.G.F.A .; CARVALHO, V.D.de. Efeito da Comparação entre duas Cooperativas do sul de Minas Gerais quanto à composição química de cafés com torração comercial. **Ciência Agrotécnica.** 26: 830-835, 2002.

FERNANDES, C.; BARROS, S. Efeito farmacológico de compostos fenólicos antioxidantes em alimentos. Disponível em <

<http://www.sbfte.org.br/cong2002/Programa%202002.pdf> >. Acesso em: 03 de abril de 2004.

FERRARI, C. K.B.; ELIZABETH, A .F. da S. TORRES. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Rev. Bras. de Cancerol.**48: 375 - 382, 2002.

FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; BeMILLER, J.N. **New products from Theobroma cacao: Seed pulp and pod gum.** Disponível em <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1993/v2-475.html>. Acesso em 20 de agosto de 2004.

FITZPATRICK, D. F.; BING, B.; ROHDEWALD, P. Endothelium- dependent vascular effects of pycnogenol. **J. of Cardio. Pharmacol.**32: 509-515, 1998.

FLATEN, M.A. Caffeine-induced arousal modulates somatomotor and autonomic differential classical conditioning in humans. **Psychopharmacology.** 135: 82-92, 1998.

FOCCHI, G. R. de A . **Cafeína: generalidades, farmacologia, mecanismos neurobiológicos de ação e potencial de abuso.** Psychiatry On-line Brazil. Disponível em < <http://www.polbr.med.br> > . Acesso em 13 de janeiro de 2004.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. *Advenc. Exper. on Med. Biol.* **313**: 355 – 364, 1992.

FOTSIS, T.; PEPPER, M. S.; AKTAS, E.; BREIT, S.; RASKU, S.; ADLERCREUTZ, H.; WAEHAELAE, K.; MONTESANO, R.; SCHWEIGERER, L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. **Cancer Research.** 57: 2916-2921, 1997.

FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A . **Principles of Medicinal Chemistry.** 4 ed. EUA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILLIAMS, 1995, p. 270-304.

FREDHOLM, BB. Adenosine, adenosine receptors and actions of caffeine . **Pharmacol. & Toxicolol.** 76: 93-101, 1999.

GEE, J.M.; JOHNSON, I.T. Polyphenolic compounds: Interactions with the gut and implications for human health. **Curr Med Chem.** 8: 1245-1255, 2001.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** 2nd ed Oxford, UK: Claredon Press, 1989.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLINGER, J., ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. **Food and Chem. Toxicol.** 33: 601-617, 1995.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3rd Ed. Oxford Science Publications. Oxford. 936 pp, 1998.

HAN, W. Hand Book of Pharmaceutical Excipients. 2 ed. The Pharmaceutical Press: ed Ainley Wade/ Paul J. Weller, 1994.

HAN, C. Screening of anti-carcinogenic ingredients in tea polyphenols. **Cancer Letters.** 114: 153-158, 1997.

HANASAKI, Y., OGAWA, S., FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoi. **Free Rad. Biol. and Med.** 16: 845-850, 1994.

HANSEN, C. E; DEL OLMO, M.; BURN, C. Enzyme activities in cacao beans during fernetnation. **J. of the Scienc of Food and Agric.** 77: 273-281, 1998.

HARBONE, J.B.; BAXTER, H. **Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants.** Taylor & Francis, London, 1995.

HELDT, H-W. **Plant Biochemistry & Molecular Biology**, 2nd ed., Oxford University Press, 1997.

HINDMARCH, I.; RIGNEY,N.; STANLEY,N.; QUINLAN,P.; RYCROFT,J.; LANE, J. A naturalistic investigation of the effects os day-long consumption of tea, coffee and water on alertness, sleep onset and sleep quality. **Psychopharmacology.** 149: 203-216, 2000.

HUANG, J; PAULIS, T do; MAY, J.M. Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human E.A . hy926 endothelial cells. **J. of Nutr. Biochem.** 15: 722-729, 2004.

HURST, W.J.et al. Archaeology: Cacao usage by the earliest Maya civilization. **Nature.** 418: 289-290, 2002.

IAPAR- Instituto Agronômico do Paraná. **O Café no Mundo: Produção e Consumo.** Disponível em: < <http://www.pr.gov.br/iapar/cafe/m&prodcons.html> >. Acesso em: 15 de Outubro de 2002.

ICC - Instituto del Cacao y el Chocolate. **Estudio nutricional del cacao y productos derivados.** Universidad de Barcelona. Disponível em <http://www.chococao.com/>. Acesso em 29 de julho de 2004.

ICCO. International Cocoa Organization. **What is theobromine and what is its effect on human beings?** Disponível em < <http://www.icco.org>> . Acesso em 10 de fevereiro de 2004.

ICO – International Coffee Organization. Coffee. Disponível em < www.ico.org >. Acesso em 10 de setembro de 2004.

IFIC- Internacional Food Information Council Foundation. Caffeine. Disponível em <<http://ificinfo.health.org>>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2004.

ILLY, A; VIANI, R. Espresso Coffee: the chemistry of quality. Academic Press. 2 ed. London, 1996.

INDECA- Indústria e Comércio de Cacau LTDA. Disponível em <http://www.indeca.com.br> >. Acesso em 22 de dezembro de 2004.

IOKU, K. et al. Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. **Bioch. et Biophysica Acta**. 1234: 99-104, 1995.

JAMES, J.E. **Understanding Caffeine: A Biobehavioral Analysis**. v. 2. USA: Sage Publications, 227pp, 1997.

JANAVEL, G.L.V.; DEL VALLE, H.F.; LASCANO, E.C.; NEGRONI, J.A .; CASA, J.C.L.; CROTTOGINI, A .J. Angiogénese terapéutica en la cardiopatía isquémica. **Rev Fed Arg. Cardiol**. 30: 245-261, 2001.

JOGHATAIEA, M.T.; ROGHANIB, M.; NEGAHDARA, F.; HASHEMIA,L Protective effect of caffeine against neurodegeneration in a model of Parkinson's disease in rat: behavioral and histochemical evidence. **Parkinsonism Relat Disord**. 10: 465-8, 2004.

JONES, N.; ILJIN, K.; DUMONT, D. J.; ALITALO, K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. **Nature Reviews**, Molec. Cell Biol. **2**: 257 – 267, 2001.

JUZWIAK, C.R.; PASCHOAL, V. **Chá Verde: Prevenção e Tratamento de Doenças**. Disponível em <http://www.vponline.com.br> > . Acesso em 13 de janeiro de 2005.

KASSAI, R. **Colheita de café avança e atinge 61% das lavouras do País**. Disponível em: < <http://www.quimica.matrix.com.br/arquivo.html> >. Acesso em: 27 de Agosto de 2003.

KOYAMA, Y. et al. Metabolism of purine bases, nucleosides and alkaloids in theobromine-forming *Theobroma cacao* leaves. **Plant Physiol. and Bioch.** 41: 977– 984, 2003.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asina vegetables. *Intern. J. of Fod Sci. and Technol.* **37**: 153-161, 2002.

KRIS-ETHERTON, P.M. et al. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. **The Amer. J. of Med.** 13: 71-88, 2002.

KRIS-ETHERTON, P.M.; KEEN, C.L. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cacao are beneficial for cardiovascular health. **Current Opion in Lipodology.** 13: 41-49, 2002.

KRIVAN, V.; BARTH, P.; MORALES, A .F. Multielement Analysis of Green Coffee and Its possible use for the Determination of Origen. **Microchimica Acta.** 110: 217-236, 1993.

KONDO, K.; KURIHARA, M.; MIYATA, N.; SUZUKI, T.; TOYODA, M. Mechanistic Studies of Catechins as Antioxidants against radical Oxidation. **Arch. of bioch. and Biophysics.** 362: 79-86, 1999.

KUANG-YUH, C.; BABBIDGE, S.M.; XIAONING, Z.; DANDILLAYA, R.; RIETVEL, A . G.; YANO, J.; DIMAYUGA, P.; CERCEK, B.; SHAN, P. Differential Effects of Green Tea-Derived Catechin on Developing Versus established Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Null Mice. **Circulation.** 109: 2448-2453, 2004.

KUO, S. M. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. **Cancer Letters.** 110: 41-48, 1996.

LAKENBRING, C.; LAPEZYNSKI, S.; MAINWALD, B. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. **J. Agric. Food. Chem.** 48: 2448-52, 2000.

LaRuc, A. C.; LANSFORD, R.; DRAKE, C.J. Circulation blood island-derived cells contribute to vasculogenesis in the embryo proper. **Development Biology.** 262: 162-172, 2003.

LEE, K.W. ; KIM, Y. J.; LEE , H.J.; LEE, C.Y. Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. **J. Agric. Food Chem.** 51: 7292-7295, 2003.

LEIGHTON, J.; NASSAUER, J.; TCHAO, R. The chick embryo in toxocology: An alternative to the rabbit eye. **Food Chem. Toxicol.** 23: 293-298, 1985.

LEITE, I.P. **Influência do local de cultivo e do tipo de colheita nas características físicas, composição química do grão e qualidade do café (Coffea arabica L.)**. Lavras: ESAL, 1991. 131 p. (Tese de Mestrado).

LEVITON, A. ; COWAN, L. A review of the literature relating caffeine consumption by women to their risk of reproductive hazards. (review). **Food and Chem. Toxicol.** 40: 1271-1310, 2002.

LIAU, G.; SU, E.I.; DIXON, K.D. Clinical efforts to modulate angiogenesis in the adult: gene therapy versus conventional approaches. **DDT.** 6: 13, 2001.

LIMA, D.R. **Café e Saúde**. Disponível em <http://www.cafeesaude.com.br>. Acessado em 01 de setembro de 2004.

LOPES, L.M.V. **Avaliação da Qualidade de grãos crus e torrados de cultivares de cafeeiro (Coffea arabica L.)**. Lavras: UFLA, 2000. 95 p. (Dissertação em Ciências de Alimentos)

LU, Yao-Ping; LOU You-Rong; PENG, Ging-Yun; LIAO, J.; Yang, C.S.; Huang, Mou-Tuan; Conney, A.H. Topical applications of caffeine or epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 99: 12455-60, 2002.

MAIA, L.; MENDONÇA, A. de. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? **Eur J Neurol.** 9: 377-82, 2002.

MADDEN, E. **New Conclusions on Coffee's Cancer Protection Potential Signal Turnaround**. Disponível em < coffeescience.org/media/anticancer >. Acesso em 07 de janeiro de 2004.

MARASCHIN, M.; VERPORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.** 10: 24-28, 2001.

MARASCHIN, R. P.; IANSEN, C.; ARSEGO, J. L.; CAPEL, L. S.; CIMADON, A. M. A.; ZANUS, C.; CARO, M. S. B.; MARASCHIN, M., 2002. **Solid-phase extraction and H-NMR analysis of Brazilian Cabernet Sauvignon wines- A chemical composition correlation study**. In: 6TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON APPLICATION OF MAGNETIC RESONANCE IN FOOD SCIENCE, 2002, Paris. Proceedings 6TH International Conference on Application of Magnetic Resonance in Food Science. Cambridge: Royal Society of Chemistry, p. 79.

MARTINEZ, H.E.P.; MENEZES, J.F.S.; SOUZA, R.B.de; VENEGAS, V.H.A.; GUIMARÃES, P.T.G. Faixas críticas de concentrações de nutrientes e avaliação do estado nutricional de cafeeiros em quatro regiões de Minas Gerais. **Pesq. agropec. bras.** 38: 703-713, jun. 2003.

- MATIELLI, A.; RUGGIERO, S. Café: Preços agudos. **AGROANALYSIS**, 23: 2003.
- MATISSEK, R. Evaluation of xanthine derivatives in chocolate- nutritional and chemical aspects. **Z. Lebensm Unters Forsch A**. **205**: 175-184, 1997.
- MATIUCCI, C. A . R. **Atividade antioxidante in vitro em plantas com propriedades medicinais**. Tese de mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- MAYDATA, A .G. Chocolate, Polifenoles y Protección a la Salute. **Acta Farm. Banaerense**. 21: 149-52, 2002.
- McNATT, L.G.; LANE, D.; CLARK, A .F. Angiostatic activity and metabolism of cortisol in the chorioallantoic mebrane (CAM) of the chick embryo. **J. Sterois Biochem. Molec. Biol**. 42: 687-693, 1992.
- MENEZES, H.C. **Variação dos monoisômeros e diisômeros do ácido cafeoilquínico com maturação de café**. Campinas: UNICAMP, 1994. 171p. Dissertação (Doutor em Tecnologia de Alimentos), Universidade de Campinas (UNICAMP).
- MICHELS, K.B.; HOLMBERG, L.; BERGKVIST, L.; WOLK, A .A . Coffee, Tea, and Caffeine Consumption and Breast cancer incidence in a Cohort of Swedish Women. **Ann Epidemiol**. **12**: 21-26, 2002.
- MIMIĆ-OKA, J.; SIMIĆ, D.V.; SIMIĆ, T.P. Free radicals in cardiovascular diseases. **The sci. j. FACTA UNIVERSITATIS- Med. and Biol**. 6: 11 – 22, 1999.
- MINATTI, E. **Cafeína: a droga predileta**. Revista eletrônica do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Ano 1, n. 22. Disponível em < <http://quark.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/cafeina.html> > . Acesso em 12 de outubro de 2004.
- MINERS, J.O; ATTWOOD, J.; BIRKETT, D.J. Theobromine metabolism in man. **Amer. Soc. for Pharmacol. and Experimental Therap**. 10: 672-675, 1982.
- MAGNONI D, CUKIER C. **Perguntas e Respostas em Nutrição Clínica**. São Paulo: Roca, 2001.
- MORGANO; M.A ., PAULUCI, L.F., MONTOVANI, D.M.B., MORY, E.E.M. Determinação de Minerais em Café Cru. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, 22: 19-23, 2002.
- MUKHERJEE, J., SARKAR, D., SHARMA, A. Effects of dietary consumption of black tea infusion alone and in combination with known clastogens on mouse bone narrow chromosomes in vivo. **Food Chem. Toxicol**. 35: 657-661, 1997.

Multicultural Health Communication. **A Cafeína e a Saúde (Caffeine and your health)**. Disponível em < <http://www.mhcs.health.nsw.gov.au> > . Acesso em 20 de dezembro de 2004.

MUROHARA, T.; HOROWITZ, J.R.; SILVER, M. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. **Circulation**. 97: 99-107, 1998.

NARDINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. **Effects of coffee on the total plasma antioxidant capacity in humans and bioavailability of coffee polyphenols**. Disponível em <<http://www.ico.org/event/cofhealth/scaccini.pdf>>. Acesso em 10 de janeiro de 2005.

National Jewish Medical and Research Center. **Theophylline**. Disponível em <www.nationaljewish.org>. Acesso em: 18 de julho de 2003.

News Cafeicultura. Café. Disponível em < <http://www.newscafeicultura.com.br> >. Acesso em 12 de junho de 2005.

NIKIFORIDIS, G.; PAPAZAFIROPOULOS, D. ; SIABILIS, D.; KAMABATIDIS, D.; HATJIKONDI, O. ; DIMOPOULOS, J. Quantitative assessment of angiogenesis in the chick embryo and chorioallantoic membrane by computerised analysis of angiographic images. **Eur. J. Radiol**. 29: 168-179, 1999.

NGUYEN, M.; SHING, Y.; FOLKMAN, J. Quantification of Angiogenesis and Antiangiogenesis in the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane. **Microvasc. Research**. 47: 31-40, 1994.

NISHIDA, Y.; YOSHIZAWA, K.; AKAMATSU, T. Preparation of Iron (III) complex with nitrioloacetic acid and origin of its unique reactivity. *Chemistry Letters*, 1521-1524. 1991.

NORTHMORE, J.M. Some factors affecting the quality of coffee. Turrialba, San José. 15: 184-193, 1965.

OKSMAN-CALDENTY, K.M.; HILTUNEN, R. Transgenic crops for improved pharmaceutical products. **Field Crops Research**. 45: 57-69, 1996.

OLSZEWER, E. **Radicais Livres em Medicina**. 2 ed. São Paulo: Fundo editorial BYK, 1995, 204 p.

OLIVEIRA, J.E.D., MARCHINI, J.S. **Microminerais. Ciências Nutricionais**. São Paulo: Savier Editora de Livros Médicos Ltda, 1998.

OLIVEIRA, C.P.M.S. **Estresse Oxidativo**. Revista de Nutrição e Saúde, nº 4, julho/agosto de 1999. Disponível em < http://www.fugesp.org.br/Revistas/nutri%E7%E3o/nutric_04/nutric_saude4_2.htm >. Acesso em 20 de outubro de 2004.

OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in human. **J. Nutr.** 132: 66-71, 2001.

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. **Ann N Y Acad Sci.** 938: 221-9, 2001.

OSAKABE, N.; YASUDA, A .; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; TERAOKA, J.; KONDON, K. Catechins and their oligomers linked by C4 - C8 bonds are major cacao polyphenols and protect low-density lipoprotein from oxidation in vitro. **Exp Biol Med.** 227: 51-56, 2002.

OWEN, D. **Frequently Asked Questions about Caffeine.** < http://www.erowid.org/chemicals/caffeine/caffeine_faq.shtml >. Acesso em 15 de março de 2004.

PANZELLA, L.; NAPOLITANO, A .; d'ISCHIA, M. Oxidative Conjugation of Chlorogenic Acid with Glutathione: Structural Characterization of Addition Products and a New Nitrite-Promoted Pathway. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** 11: 4797-4805, 2003.

PEARSON, D. A.; FRANKEL, E. N.; AESCHBACH, R.; GERMAN, J. B. Inhibition of endothelial cell mediated low-density lipoprotein oxidation by green tea extracts. **J. of Agric. and Food Chem.** 46: 1445-1449, 1998.

PIMENTA, C.J. **Qualidade do café (Coffea arabica L.) originado de frutos colhidos em quatro estádios de maturação.** Lavras: UFLA, 1995. 94p. (Tese de Mestrado).

PIMENTA, C.J.; COSTA, L.; CHAGAS, S.J.de R. Peso, acidez, sólidos solúveis, açúcares e compostos fenólicos em café (Coffea arabica L), colhidos em diferentes estádios de maturação. **Rev. Bras. de Armazenamento.** 1: 23-30, 2000.

PIMENTA, C.J; VILELA, E.R. **Compostos fenólicos e qualidade de bebida.** Disponível em < <http://www.coffeebreak.com.br> > Acesso em 10 de janeiro de 2005.

PORTER, L.J.; MA, Z.; CHAN, B.G. Cacao procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry.** 30: 1657-1663, 1991.

PUNCHARD, N.A .; KELLY, F.J.A . **Free Radicals: A Practical Approach**. New York: Oxford University Press Inc., 1996.

PURDUE UNIVERSITY. **Theobroma cacao**. Disponível em http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Theobroma_cacao.html. Acesso em 7 de setembro de 2004.

RANG, H.P.; DALE, M.N.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A . , 2001.

RAUHA, J-P. **The search for biological activity in Finnish plant extracts containing phenolic compounds**. Academic Dissertation of the Faculty of Science of the University of Helsinki. Division of Pharmacognosy. Department of Pharmacy, august 10th, 2001.

RAVEN, P. H. et al . **Biologia Vegetal**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

REES, K.; ALLEN, D.; LADER, M. The influences of age and caffeine on psychomotor and cognitive function. **Psychopharmacology**. 145: 181-188, 1999.

REIS et al. **A cadeia produtiva do cacau e a sua contribuição para geração de empregos na Amazônia**. Disponível em < <http://qipaf.cnptia.embrapa.br> >. Acesso em: 15 de Junho de 2003.

RIBATTI, D., VACCA, A ., NICO, B., RPNCALI, L., DAMMACCO, F. Postnatal vasculogenesis. **Mechanisms of Development**. 100: 157-163, 2001.

RIBATTI, D.; CONCONI, M.T.; NICO, B.; BAIGUERA, S.; CORSI, P.; PARMIGOTTO, P.P.; NUSSDORFER, G.G. Angiogenic response induced by acellular brain scaffolds grafted onto the chick embryo chorioallantoic membrane. **Brain Research**. 989: 9-15, 2003.

RICE-EVANS, C. Structure-Antioxidant activity relationships of Flavonoids and Phenolic Acids , **Free Radic. Biol. Med**. 20: 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C.A. et al. The relative anti-oxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**. 22: 375-388, 1995.

RICHELLE, M.; TAVAZZI, I.; ENSLEN, M.; OFFORD, E.A .Plasm Kinetics in man of epicatechin from black chocolate. **Eur J Clin Nutr**. 53: 22-6, 1999.

RICHELLE, M.; TAVAZZI, I.; ENSLEN, M.; OFFORD, E.A. Comparison of the antioxidant activity of comunly consumed polyphenolci beverages prepared per cup serving. **J. Agric. Chem**. 49: 3438-42, 2001.

ROBBERS et al. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. USA: Williams & Wilkins, 1996.

ROGERS, J.P.; MARTIN, J.; SMITH, C.; HEATHERLEY, S.V.; SMIT, H.J. Absence of reinforcing, mood and psychomotor performance effects of caffeine in habitual non-consumers of caffeine. **Psychopharmacology**. 167: 54-62, 2003.

ROSS, G.W.; ABBOTT, R.D.; PETROVITCH, H.; MORENS, D.M.; GRANDINETTI, A.; TUNG, K.H.; TANNER, C.M.; MASAKI, K.H.; BLANCHETTE, P.L.; CURB, J.D.; POPPER, J.S.; WHITE, L.R. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. **JAMA**. 283: 2674-2679, 2000.

RUIJTER, J.; DE RUITER, M.B.; SNEL, J. ; LORIST, M. M. The influence of caffeine on spatial-selective attention: an event-related potential study. **Clin Neurophysiol**. 111: 2223-33, 2000.

SALAZAR-MARTINEZ, E.; WILLETT, W.C.; ASCHERIO, A.; MANSON, J.E.; LEITZMANN, M.F.; STAMPFER, M.J.; HU, F.B. Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus. **Ann Intern Med**. 140: 117, 2004.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Sci Tech Int** . 8: 121-137, 2002.

SANTOS, R. do C. **Pesquisa busca aprimorar qualidade do café nacional**. Disponível em < http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/jornalPDF/202pag08.pdf > . Acesso em 15 de novembro de 2004.

SCHWARZSCHILD MA, CHEN J, ASCHERIO, A Caffeinated clues and the promise of adenosine A(2A) antagonists in PD. **Neurology**. 58: 1154-1160, 2002.

Secretaria de Política Agrícola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). Disponível em < <http://www.agronegocios-e.com.br/agronegocios/art/artigos.jsp> > . Acesso em 22 de dezembro de 2004.

SEIDLITZ, E.; KORBIE, D.; MARIEN, L.; RICAHRDSON, M.; SINGH, G. Quantification of anti-angiogenesis using the capillaries of the chick chorioallantoic membrane demonstrates that the effect of human angiostatin is age-dependent. **Microvascular Research**. 67: 105-116 , 2004.

SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P de; MENTZ, L. A .; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRS/Editora da UFSC, 2003.

SIMONS, M.; WARE, A . Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. **Nature Reviews Drug Discovery**. 2: 63-872, 2003.

SIQUEIRA, F.M.; OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B Nutrientes antioxidantes. **Rev. SBCTA** (Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos), 31: 192-199, 1997.

SOUSA, M. P. *et al.* **Constituintes Químicos ativos de Plantas Medicinais Brasileiras: Laboratório de Produtos Naturais**. Fortaleza: EUFC, 1991.

SOUZA, S.M.C. **O café (Coffea arabica L.) na região Sul de Minas Gerais: relação qualidade com fatores ambientais, estruturais e tecnológicos**. Lavras: UFLA, 1996. 171 p. (Tese de Doutorado).

SOUZA, S.M.C de; CARVALHO, V.L de. Efeito de Microrganismos na qualidade da bebida do café. **Informe agropecuário**. 18: 21-26, 1997.

SNYDER, S. H. **Adenosine as a mediator of the behavioral effects of xanthines**, in P B Dews (Ed) Caffeine: perspectives, 1984

SHILS, M.E. ; OLSON, J.A .; SHIKE, M. **Modern Nutrition in Health and Disease**. 8 ed. vol 1. EUA: LEA & FEBIGER, 1997, p. 501-12.

SUGIHARA, N.; OHNISHI, M.; IMAMURA, M.; FURUNO, K. Differences in antioxidative efficiency of catechins in various metal-induced lipid peroxidations in cultured hepatocytes. **J. of Health Sci**. 47: 99-106, 2001.

STRAIN, E.C. & GRIFFITHS, R.R. **Caffeine related disorders**. In: SADOCK, B.J.; SADOCK, V.A. Kaplan & Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry. Baltimore, Lippincott, 7th, 2000. p. 982-90.

TARTA, C.; TEIXEIRA, C.R.; SILVA, V.D. da; CHILENE NETO, C.; PROLLA, J.C.; GUS, P. Angiogênese no carcinoma colorretal- Revisão e perspectivas. **Rev. Bras. Coloproct**. 20: 227-230, 2000.

TAVANI, A .; BERTUZZI, M. ; TALAMINI, R.; GALLUS, S.; PARPINEL, M.; FRANCESCHI, S.; LEVI, F.; LA VECCHIA, C. Coffe and tea intake and risk of oral, pharyngeal and esophageal câncer. **Oral Oncology**. 39: 675-700, 2003.

The American College of Allergy, Asthma & Immunology. **Theophylline**. Disponível em <<http://allergy.mcg.edu>>. Acesso em: 18 de julho de 2003.

TOKUSOGLU, Ö. ; ÜNAL, M. K.. Optimized method for simultaneous determination of catechin, gallic acid, and methylxanthine compounds in chocolate using RP-HPLC. **Eur. Food Res. Technol.** 215: 340-346, 2002.

TORRES, E. S. **Alimentos Funcionais**. Disponível em www.ceagepe.com.br
Acesso em 25 agosto de 2004.

TRUEBA, G.P. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. **Rev. Cubana Invest Biomed.** 22: 48-57, 2003.

TSERERITNOV, O.B.; PADARYAN, E.M.; ANDREEVA, E.V.; BENEEVA, P.I. Determination of Mineral Composition of Green Coffee by Atomic Absorption. **Spectroscopy.** 31: 85-90, 1972.

TYER, V.E.; BRADY, L.R.; ROBBERS, J.E. **Pharmacognosy**. 9 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1988.

UKERS, W.H. **All About Coffee**. 2 ed. New York: InterAmerican Copyring Union, 1976.

VALE, M.R do. **Cacaueiro**. Disponível em <
<http://www.nucleoestudo.ufla.br/nefrut/CACAU2.htm> <. Acesso em 01 de dezembro de 2004.

VINSON, J.A.; JANG, J.; DABBAGH, Y.A .; SERRRY, M.M.; CAI, S.Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bouns antioxidant activity using an in vitro oxidation model for hearth disease. **J. Agric.Food Chem.**, 43: 2798-9, 1995.

VILELA, E.R. Secagem e Qualidade do café. **Informe agropecuário.** 18: 55-63, 1997.

VISON, J. A .; DABBAGH, Y. A . Tea Phenols: Antioxidant Effectiveness of Teas, Tea Components, Tea Fractions and their Binding with Lipoproteins. **Nutr. Res.** 18: 1067-1075, 1998.

VERPORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. **Current Opinion in Biotechnology.** 13: 181-187, 2002.

WAN, Y.; VINSON, J.A .; ETHERTHON, T.D.; PROCH, J.; LAZARUS, S.A. ; KRIS-ETHERTON, M. Effects of cacao powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. **Am. J. Clin. Nutr.** 74: 596-602, 2001.

WARE, J.A.; SIMONS, M. Angiogenesis in ischemic heart disease. **Nat. Med.** 3: 158–164, 1997.

WEISBURGER, J.H. Chemopreventive Effects of Cocoa Polyphenols on Chronic Diseases. **Experimental Biol. and Med.** 226:891-897, 2001.

WINK, M. **Biochemistry of Plant Secondary Metabolism**. Canadá: Sheffield Academic Press, 1999.

WOLLGAST, J.; ANKLAM, E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research Intern.** 33: 423-447, 2000.

ZAMMARETTI, P; ZISCH, A .H. Adult 'endothelial progenitor cells' Renewing vasculature. Review. **The Intern. J. of Bioch. & Cell Biol.** 2004.

ZHANG, W.; CURTIN, C.; FRANCO, C. Towards manipulation of post-biosynthetic events in secondary metabolism of plant cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology.** 30: 688-696, 2002.

YAMANE, T.; NAKATANI, H.; KIKUOKA, N.; MATSUMOTO, H.; IWATA, Y.; KITAO, Y.; OYA, K.; TAKAHSHI, T. Inhibitory effects and toxicity of green tea polyphenols for gastrointestinal carcinogenesis. **American Cancer Society**, 77: 1662-1667, 1996.

YANG, G.-Y.; LIAO, J.; KIM, K.; YURKOW, E. J.; YANG, C. S. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. **Carcinogenesis.** 19: 611-616, 1998.

YUNES, R.A .; CALIXTO, J.B. **Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001, 500p.

YOKOWA, T. ; NAKAGAWA, T.; KITANI, K. Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. **J. Agric. Food Chem.** 50: 3549- 3552, 2002.