

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO SAGRADO CORAÇÃO

INGRID GALLERANI SERVATO

**Avaliação da atividade antioxidante *in vivo* de cafés
de diferentes regiões do Brasil**

Bauru

2020

INGRID GALLERANI SERVATO

**Avaliação da atividade antioxidante *in vivo* de cafés
de diferentes regiões do Brasil**

Bauru

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

S491a	<p>Servato, Ingrid Gallerani</p> <p>Avaliação da atividade antioxidante in vivo de cafés de diferentes regiões do Brasil / Ingrid Gallerani Servato. -- 2021. 27f. : il.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Richtier Gonçalves Cruz</p> <p>Monografia (Iniciação Científica em Biomedicina) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP</p> <p>1. Café da Mogiana Paulista. 2. Café do Cerrado Mineiro. 3. Saccharomyces boulardii. 4. Métodos in vivo. 5. Stress oxidante. I. Cruz, Richtier Gonçalves. II. Título.</p>
-------	---

Elaborado por Lidyane Silva Lima - CRB-8/9602

RESUMO

O café possui uma variedade de compostos bioativos que podem influenciar de forma positiva na atividade biológica do organismo humano sendo frequentemente este efeito benéfico relacionado a atividade antioxidante de seus compostos. A composição química do café pode variar de acordo com diversos fatores como o local de plantio, grau de torrefação e método de preparação. Neste contexto o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de cafés de diferentes regiões do Brasil utilizando células de *Saccharomyces boulardii*. As regiões de plantio de cafés escolhidas para os testes foram Mogiana Paulista e Cerrado Mineiro. A primeira metodologia para determinar a atividade antioxidante dos cafés foi expor as células com extrato ao estresse de luz UV por um período de tempo e com duas repetições cada amostra. Posteriormente foram feitos os testes para determinação da atividade antioxidante dos extratos de cafés quando expostos ao estresse químico, para isso foi utilizado peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Neste experimento o crescimento das cepas não foi significativo, já que, estatisticamente, a viabilidade celular se igualou ao valor do crescimento negativo, determinando que houve pouca ou nenhuma ação protetora do café sobre os radicais livres. O resultado obtido com a luz UV ambos os cafés apresentaram ação antioxidante significativa sendo que o Cerrado Mineiro apesar obteve um resultado inferior comparado com o café da Mogiana Paulista. Conclui-se que o café da região da Mogiana Paulista se mostrou superior quando comparado com o do cerrado Mineiro, demonstrando assim a influência das condições edafoclimáticas sobre a atividade antioxidante do café.

Palavras chave: Café da Mogiana Paulista; Café do Cerrado Mineiro; *Saccharomyces boulardii*; Métodos *in vivo*; Stress oxidante.

ABSTRACT

Coffee has a variety of bioactive compounds that can positively influence the biological activity of the human body and this beneficial effect is often related to the antioxidant activity of its compounds. The chemical composition of coffee can vary according to several factors such as the planting location, degree of roasting and method of preparation. In this context, this work aimed to evaluate the antioxidant activity of different types of coffee from different regions of Brazil using *Saccharomyces boulardii* cells. The coffee planting regions we chose for the tests were Mogiana Paulista and Cerrado Mineiro. The first methodology to determine the antioxidant activity of coffee was to expose the extract of the cells to UV light stress for a period of time and with two repetitions for each sample. Subsequently, tests were carried out to determine the antioxidant activity of coffee extracts when exposed to chemical stress, for which hydrogen peroxide (H₂O₂) was used. In this experiment, the growth of the strains was not significant, as, statistically, cell viability was similar to the negative growth value, determining that there was little or no protective action of coffee on free radicals. The result we got from UV light, both coffee types showed dissipating antioxidant action. The growth of coffee strains from Cerrado Mineiro was slightly below the positive control, while the one from Mogiana Paulista was statistically equivalent, concluding a protective interaction of coffee extracts against free radicals.

Keyword: Coffee from Mogiana Paulista; Coffee from the Cerrado of Minas Gerais; *Saccharomyces boulardii*; *in vivo* methods; Oxidizing stress.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	07
2. OBJETIVOS	09
3. REVISÃO DE LITERATURA	10
4. JUSTIFICATIVA	14
5. MATERIAIS E MÉTODOS	15
5.1 Preparo dos reagentes utilizados.....	15
5.2 Obtenção e preparo das amostras.....	15
5.3 Preparo das culturas e ensaio com <i>S. boulardii</i>	16
5.4 Delineamento experimental e análises estatísticas.....	19
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.	20
7. CONCLUSÃO.....	24
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

O café é considerado a matéria-prima alimentar mais importante no mundo, uma vez que ocupa o segundo lugar depois do petróleo bruto entre todas as *commodities* com relação à importância econômica. Ao todo cerca de 60 países tropicais e subtropicais produzem extensivamente o café sendo para alguns deles o principal produto de exportação agrícola (LASHERMES et al., 2008; VIEIRA, 2008).

O Brasil é o maior produtor e exportador de café do mundo, sendo também o segundo maior consumidor. No país o consumo desse produto se dá principalmente em lares, correspondendo a 64% do consumo total que é 37% de toda a produção (Associação Brasileira da Indústria de Café – ABIC; TEIXEIRA ROCHA, 2009) (SAES e NAKAZONE, 2004). As plantações de café estão presentes pelo território brasileiro ocupando 2 milhões de hectares correspondendo aproximadamente 300 mil produtores, os quais se situam nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Bahia, Rondônia, Paraná, Rio de Janeiro, Goiás, Mato Grosso, Amazonas e Pará, sendo que algumas regiões possuem alto nível de tecnologia na produção e denominação de origem controlada (MAPA, 2018).

Sabe-se que durante o processo de torrefação ocorrem diversas reações químicas pelas quais formam e deterioram inúmeros compostos. Embora a atividade biológica apenas de alguns seja conhecida, o café torrado possui por volta de 2000 compostos químicos. A atividade biológica destes compostos envolve a quantidade e a qualidade de café ingerido (ALVES C. R.; CASA S.; OLIVEIRA B.; 2009). Além da cafeína pode-se encontrar no café após a sua torração os compostos trigonelina e ácidos clorogênicos, embora cada um possua a sua função em especial, podemos destacar que ambos dispõem da atividade antioxidante, ou seja, possuem a capacidade retardar os processos de oxidação celular (LIMA A. R.; PEREIRA R. G.; ABRAHÃO S. A.; DUARTE S. M.S.; PAULA F. B. A.; 2010).

Estudos *in vitro* e clínicos têm evidenciado atividade de compostos bioativos presentes no café, sendo que estes frequentemente relatam entre outros efeitos, atividade antioxidante e antimutagênica da bebida. Apesar de pouco explorado, alguns estudos relatam que o modo como o café é preparado (expresso, coado ou fervido) e sua origem geográfica podem influenciar na presença e no efeito de substâncias bioativas na bebida, sendo que as condições edafoclimáticas (solo,

ambiente, temperatura, umidade etc..) são um dos fatores mais importantes e determinantes na qualidade química e sensorial do café (SOARES, 2002; CAMARGO e TOLEDO 2002; NOGUEIRA e TRUGO, 2003; SILVA et al., 2007; MUBARAK et al., 2013; CRUZ et al., 2018).

As informações obtidas *in vivo* não só complementam, mas também se fazem necessárias para avaliar os efeitos e a segurança de compostos antioxidantes. Entretanto o uso de pessoas ou animais de laboratório é de difícil execução, além de necessitar de muitas repetições para assegurar resultados estatisticamente significativos (SOARES, et al.,2005).

O uso de microrganismos se apresenta como uma vantagem com relação aos demais testes, já que permitem a utilização de um grande número de células com grande similaridade genéticas, garantindo uma maior reprodutibilidade em um período menor de tempo para a obtenção de respostas. O uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para estudos envolvendo o estresse oxidativo é uma das melhores opções envolvendo um sistema eucariótico unicelular, já que suas reações metabólicas são semelhantes ao de outros eucariotos superiores. Além disso, estas possuem mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P450) e de detoxificação. Os ensaios com *S. cerevisiae* permitem a avaliação da atividade antioxidante de diversas amostras e/ou compostos puros de forma rápida, econômica e reprodutível. Ainda os resultados podem ser extrapolados para o homem mais facilmente do que quando somente comparado com os ensaios *in vitro* (HENRIQUES et al., 2001; SILVA et al., 2005; HASSAN, 2011; SOARES et al., 2013).

Neste contexto o objetivo do presente estudo é analisar a atividade antioxidante *in vivo* de cafés de diferentes regiões do Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito antioxidante *in vivo* de cafés de diferentes regiões do Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade antioxidante dos extratos dos cafés *in vivo* com células modelos de *S. boulardii* quando expostos ao estresse oxidativos por luz UV.
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos dos cafés *in vivo* com células modelos de *S. boulardii* quando expostos ao estresse oxidativos químico por peróxido de hidrogênio (H₂O₂).
- Correlacionar a atividade antioxidante do café com o tipo de região em que ele é produzido e condições climáticas e ambientais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

As plantações de café no Brasil estão espalhadas por vários estados e em cada estado sua(s) região(ões). O estado de Minas Gerais (Sul de Minas, Cerrado de Minas, Chapada de Minas e Matas de Minas) é o maior produtor no Brasil, correspondendo a 50% da produção nacional. O estado do Espírito Santo é o segundo maior produtor de café do país, mas sua produção concentra-se no café tipo conilon. No estado de São Paulo a principal plantação é Alta Mogiana, que produz o café mais tradicional (exclusivamente o tipo arábica). Na Bahia por possuir um clima mais quente as plantações são todas de café arábica. O estado do Paraná é o estado mais ao sul que produz café. (Associação Brasileira da Indústria do Café-ABIC).

Diversos estudos com café são realizados para avaliação do efeito da bebida na saúde humana. Sabe-se que a bebida café possui uma composição química bastante diversificada e complexa apresentando alguns dos seus componentes variadas ações biológicas, muitas ainda não totalmente conhecidas. Apesar de diversas pesquisas em nível químico, metabólico e epidemiológico, é difícil encontrar conclusões concretas relativas aos efeitos desta bebida na saúde do consumidor. Tal fato se deve a enorme variabilidade de preferência por diferentes tipos de bebidas de café, com variações desde as espécies, graus de torra, moagem e método de preparo da mesma, o que pode mudar significativamente a composição química da bebida e seus efeitos no organismo. No entanto, algumas pesquisas apontam para um efeito benéfico do café frente a determinadas doenças, como diabetes *mellitus* tipo II, asma, cirrose alcoólica, alguns tipos de cancro, doença de *Parkinson* e *Alzheimer* (ALVES et al., 2009).

Os principais isômeros dos ácidos clorogênicos encontrados no café são ácidos cafeoilquínicos, os dicafeoilquínicos, os ácidos feruloilquínicos, ácidos p-cumaroilquínos e os ácidos cafeoilferuloilquínicos, que de acordo com a sistematização de Clifford são um conjunto de 5 grupos principais. Os ácidos clorogênicos são conhecidos por suas características antioxidativas, devido a sua propriedade redutora de estruturas químicas. Estes se apresentam em maior quantidade no café (MONTEIRO C. M.; TRUGO C. L.; 2005).

Silva et al. (2007), verificaram *in vitro* a presença de compostos fenólicos e a atividade antioxidante da bebida café, em diferentes formas de preparo (solúvel, filtrado, a brasileira e expresso) sobre a peroxidação lipídica, utilizando o sistema ácido linoléico/ β -caroteno. Foi observado que o café solúvel apresentou o maior efeito protetor contra a oxidação e a maior efetividade em bloquear as fases de iniciação e propagação da cadeia oxidativa devido ao efeito da diluição dessas substâncias bioativas. Nogueira e Trugo (2003) evidenciaram a presença de ácidos clorogênicos e trigonelina em diferentes amostras de café solúvel, apresentando uma grande variabilidade entre as amostras.

Soares (2002) relatou que estudos *in vitro* em microssomas, eritrócitos, monócitos e em modelos de LDL oxidada, proporcionou inibição significativa da peroxidação lipídica. O autor atribuiu a atividade antioxidante, majoritariamente, aos ácidos clorogênicos, e em especial, ao ácido cafeico, indicando a bebida uma fonte de antioxidantes naturais.

O principal componente com ação psicoativa do café é a cafeína (Figura 1). Dentre os seus efeitos pode-se destacar um aumento no desempenho cognitivo e psicomotora do consumidor com sintomas envolvendo melhora do estado de alerta, da energia, da capacidade de concentração, do desempenho, da vigilância auditiva, do tempo de retenção visual e diminuição da sonolência e do cansaço além de auxílio na perda de peso devido a suas propriedades termogênicas. O principal mecanismo de ação da cafeína deve-se à sua similaridade estrutural com a molécula de adenosina (potente neuromodulador endógeno). Assim a cafeína pode se ligar a receptores da adenosina, bloqueando-os. Deste modo, a ação inibitória da adenosina fica impedida, fornecendo um efeito estimulante à cafeína (BIAGGIONI et al., 1991; DUNWIDDIE e MASINO, 2001; NEHLIG 2004).

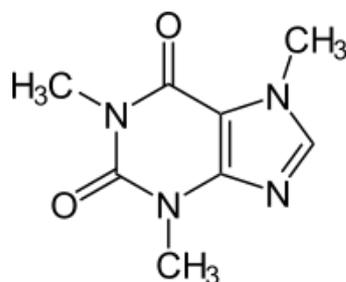


Figura 1. Estrutura química da cafeína (1,3,7-trimetilxantina).

Diversos trabalhos têm relacionado o consumo de café a um aumento dos níveis séricos do colesterol total e LDL (lipoproteínas de baixa densidade), sendo este um importante fator de risco de doença cardiovascular. Este aumento dos níveis de colesterol não se encontra associado ao consumo de todas as bebidas de café, sendo que o método de preparação mostra-se como um fator chave no efeito hipercolesterolêmico. O consumo de café fervido e não filtrado são responsáveis por um aumento dos níveis de colesterol, em quanto que foi demonstrado que o consumo de café de filtro possui pouca ou nenhuma associação com a concentração sérica de colesterol. Foram identificados, na fracção lipídica do café, dois diterpênicos, sendo eles o cafestol e o kahweol (Figura 2) com atividade hipercolesterolêmica. No entanto, são escassos trabalhos na literatura que expliquem o mecanismo de ação desses compostos e a diferença de concentração em bebidas preparadas de diferentes modos (ARO et al., 1987; TVERDAL et al., 1990; URGERT e KATAN, 1997; JEE et al., 2001).

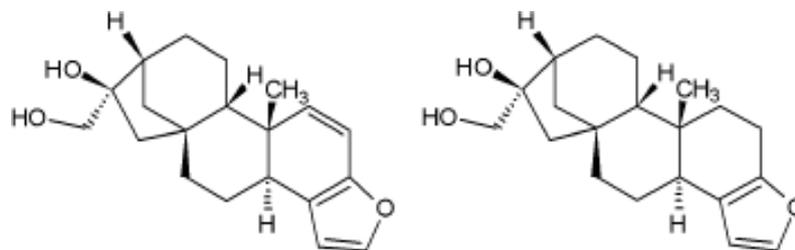


Figura 2. Estruturas químicas dos Kahweol (esquerda) e cafestol (direita).

Camargo e Toledo (2002) avaliaram o café como fonte de hidrocarboneto aromático policíclico (HPA) que são substâncias químicas carcinogênicas ao ser humano. Os autores concluíram que o café pode ser uma importante fonte de HPA, e que o modo de preparo da bebida pode influenciar na concentração desses compostos, sendo que o café quando fervido tende a extrair mais HPA devido ao favorecimento da formação do complexo benzopireno-cafeína o que torna o HPA mais solúvel carreando-o em maiores concentrações para a bebida quando comparado com o café coado.

Em uma pesquisa recente realizada por Mubarak et al. (2013), os autores evidenciaram que o ácido clorogênico, que é um antioxidante natural e proveniente

do café, foi responsável por aumentar a resistência a insulina em camundongos, além de aumentar a deposição de gordura no fígado, podendo estar relacionado com doenças crônicas como diabetes e obesidade. Estas informações são contraditórias a trabalhos da literatura que relatam aspectos positivos do ácido clorogênico à saúde (Alves et al., 2009). Tal fato suporta a ideia de que mais trabalhos são necessários para avaliar o efeito do café no metabolismo, sendo estes resultados importantes para determinar quantidades seguras de consumo e o real efeito da bebida no organismo.

4. JUSTIFICATIVA

O café é uma das bebidas mais importantes em todo o mundo dado o seu valor comercial e cultural. A bebida pode trazer benefícios à saúde graças a sua atividade antioxidante, atribuída a mais de 200 moléculas presentes no café. Sua composição química pode variar de acordo com a localização do plantio, grau de torrefação e outros métodos de preparo entre outros fatores.

As informações da atividade antioxidante *in vivo* são importantes não só para complementar as informações *in vitro*, mas também para determinar possíveis efeitos tóxicos ao organismo e correlacionar esta atividade com o local de plantio pode inferir sobre as condições edafoclimáticas e a atividade antioxidante encontrada no café, sendo esta informação de grande importância em termos científicos, mas também para produtores de cafés, que podem buscar condições ótimas para produzirem uma bebida com melhor atividade antioxidante.

Neste trabalho foram feitos testes de determinação da atividade antioxidante de cafés de duas regiões: Mogiana Paulista e Cerrado Mineiro. Através desses experimentos foi possível identificar qual destes possui o grau de atividade mais elevado. O uso do microrganismo *S. boulardii* nesse projeto tem como finalidade se aproximar das características das células humanas, diminuindo o custo e os riscos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Preparo de reagentes utilizados

5.1.1 Solução Salina 0,85%

Foi preparada solução salina a 0,85% de cloreto de sódio (Êxodo) e água destilada, posteriormente esterilizada em autoclave 121°C por 15 minutos para utilização no experimento.

5.1.2 Caldo YPD

Foi usado para o YPD caldo 1% de extrato de levedura (MERK), 2% de glicose (Synth) e 2% peptona (TM MEDIA), diluído em água destilada e em seguida esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos para usar na incubação do microrganismo e isolamento das colônias.

5.1.3 YPD ágar

Foi misturado o YPD ágar (SIGMA) em água destilada e posteriormente levados a autoclave por 15 minutos a 121°C para meio de cultura nas placas de petri e crescimento das colônias no começo e fim do experimento.

5.2 Obtenção e preparo de amostras

As amostras de café do tipo arábica torrado tradicional foram obtidas de uma mesma marca comercial, mas de diferentes regiões, sendo estas do Cerrado Mineiro e Mogiana Paulista. Ambas possuíam no rótulo as mesmas especificações quanto ao grau de torra, modo de preparo e moagem. Estas regiões são importantes produtoras de cafés no Brasil sendo que a região de cerrado mineiro (estado maior produtor de café nacional) possui denominação de origem controlada.

O método de preparo foi seguindo a metodologia descrita por Cruz et al. (2018) sendo este considerados pelos autores o melhor para produção da bebida e extração de compostos com atividade antioxidante. Para isto 20 g de café foram pesados na balança analítica (SHIMADZU, AY220) e adicionados em 250 mL de água destilada aquecida através do método de decocção.

Neste método a água foi aquecida até obter 95° C para então ser filtrada no filtro de papel. Após o preparo da bebida, esta foi armazenada em recipientes de polietileno a uma temperatura de -18° C até o momento das análises.

5.3 Preparo das culturas e ensaio com *S. boulardii*

Foi utilizado um comprimido de cepas de levedura *S. boulardii* de 200 mg da marca comercial de referência. A cápsula do microrganismo foi diluída em um tubo de ensaio com 10 mL de solução salina 0,85% já estéril, em seguida esse mesmo tubo foi submetido ao vortex 3 vezes seguidas por 20 segundos para melhor diluição com pausas de 1 minuto.

Posteriormente a mistura contendo os microrganismos foi estriada em meio YPD (*Yeast extract – Peptone – Dextrose*) com auxílio de alças estéreis de 1 µL incubada à 35° C por 48 horas para isolamento das colônias (com característica esférica e com aspecto leitoso).

Após o tempo de incubação, 4 colônias isoladas foram adicionadas em condições estéreis em um erlenmeyer contendo 100 mL de caldo YPD, reinoculado e levado para o agitador (TECNAL, TE-420) a temperatura de 35°C a 160 rpm por 24 horas.

Após esse tempo, 1 mL do meio YPD com microrganismo, foi reinoculado em outro erlenmeyer também contendo 100 mL de caldo YPD e novamente incubado e agitado com aquecimento nas mesmas condições anteriores. Este procedimento foi realizado como pré-cultura com o intuito de que os microrganismos no momento do ensaio de atividade antioxidante estivessem em sua forma viável e adaptada ao meio de cultivo.

Para o procedimento de determinação da atividade antioxidante *in vivo* em estresse com a luz UV e com peróxido de hidrogênio, 10 mL do meio YPD contendo a levedura foram adicionados em tubos falcon estéreis de 20 mL, estes tubos falcon foram centrifugados por 10 minutos a 25°C e a 4.1000 rpm (Eppendorf, 5702 R).

O sobrenadante foi então descartado e o volume repostado (10 mL) com solução salina (0,85%) sendo posteriormente vortexado por 2 minutos até completa dissolução das células de levedura.

Neste momento foram feitas as separações dos tratamentos, os tubos que foram adicionados somente solução salina foram considerados como controles, os que foram adicionados o café do sul de Minas Gerais (1000 MG) e o outro realizados com o café de Mogiana Paulista (1000 SP) ambos na concentração de 1000ppm.

Na Figura 1 é apresentado o esquema que representa as etapas de isolamento e preparo do microrganismo para ensaio de atividade antioxidante.

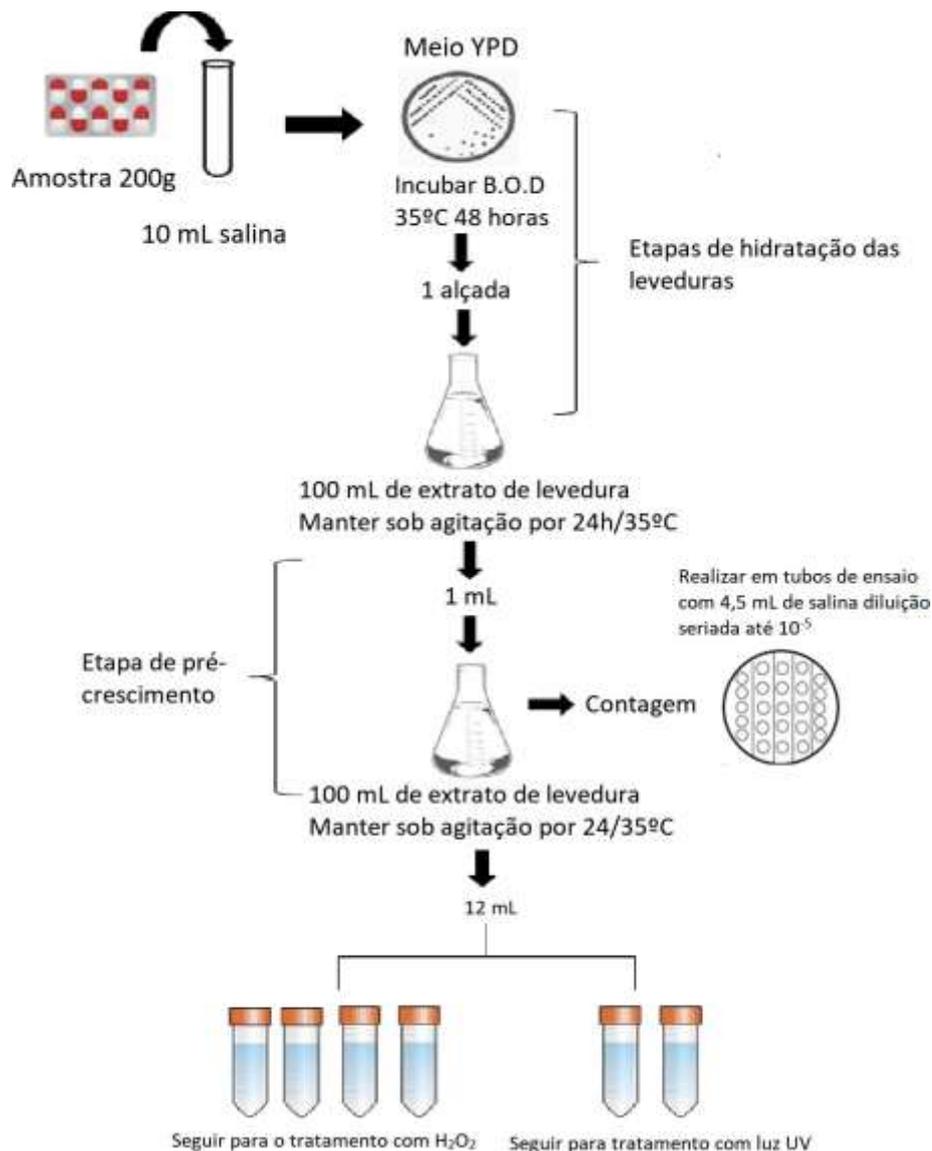


Figura 1- Esquema dos ensaios analíticos para atividade antioxidante *in vivo* do café em células de *S. boulardii*

Para o ensaio da atividade antioxidante pela luz UV os ensaios foram colocados em placas de petri estéreis (15 cm de diâmetro e 2 cm de altura) e cada amostra adicionadas em câmara de luz UV (280 nm) por 20 minutos. A única placa que não foi submetida ao estresse oxidativos pela luz UV foi a placa de controle positivo.

Após o tempo de exposição foi realizada a diluição seriada dos ensaios e estes plaqueados em meio YPD-ágar em superfície por meio da técnica de microplaqueamento (gotas de 10 µL) e em seguida levados para incubação na B.O.D (TECNAL) por 24 horas a temperatura de 35° C.

As colônias viáveis foram então contadas e o resultado expresso em UFC/mL, e nesse caso quanto maior o número de colônias tendo como parâmetro o controle positivo (sem submissão ao estresse) maior seria a resistência dos microrganismos submetidos ao estresse provocado pela luz ultravioleta.

Para o estresse com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) após centrifugação das células além da solução salina também foi adicionado H₂O₂ na concentração de 10mM e os extratos de cafés (1000 ppm), e estes deixados em repouso por 30 minutos, o controle positivo não recebeu o café e nem o peróxido de hidrogênio, já o controle negativo recebeu apenas o H₂O₂.

Após a centrifugação as células foram para o fundo do tubo e o sobre nadante foi descartado em seguida foi adicionado H₂O₂ (concentração de 10mM) e o café na concentração de 1000 ppm e submetido ao vortex para melhor diluição. O tempo de exposição das células ao peróxido de hidrogênio foi de 30 minutos.

Após este período os tubos foram levados novamente para a centrifuga 10 minutos a 25°C e a 4.400rpm, o sobrenadante descartado e o volume inicial (10 mL) completados com solução salina (0,85%) sendo em seguida vortexado por pelo menos 2 minutos, até completa dissolução do microrganismo.

Posteriormente seguiu-se com a diluição seriada sendo realizado o plaqueamento e contagem dos microrganismos nas mesmas condições já descritas para o ensaio com a luz UV.

5.4 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido de forma inteiramente casualizada em quintuplicata e duas repetições. As médias foram submetidas a análise estatística pelo teste de tuckey a 5% de probabilidade para avaliar possíveis diferenças entre elas pelo programa R.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A radiação UV é um componente solar mutagênico, carcinogênico e letal aos organismos vivos, a UVB, referente a 280 nm, representa 5% da radiação solar que atinge a terra. Ao ser atingido por esta luz, o DNA absorve a energia causando lesões em sua estrutura devido a oxidação, chamado também de dímeros de pirimidina. Com isso o próprio organismo reage de forma a reparar a molécula, retirando a região lesada e assim evitando mutações (CHAMMAS, 2007; SANTOS, 2010).

Os resultados obtidos para o estresse provocado pela luz UV nos microrganismos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Viabilidade Celular da *S. Boulardii* submetida ao estresse com a luz UV.

Tratamento	Viabilidade celular (UFC/mL)
Controle positivo	$1,18 \times 10^8$ a*
Controle negativo	$< 1 \times 10^1$ c*
1000-MG	$1,5 \times 10^6$ b*
1000-SP	$7,9 \times 10^7$ a*

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Controle positivo: os microrganismos não foram submetidos ao estresse com a luz UV e nem tiveram contato com o café.

Controle negativo: os microrganismos foram submetidos ao estresse a luz UV e não tiveram contato com o café.

1000-MG microrganismos foram submetidos ao estresse com a luz UV e tiveram contato com o café de Minas Gerais (1000ppm).

1000-SP microrganismos foram submetidos ao estresse com a luz UV e tiveram contato com o café de São Paulo (1000ppm).

Como pode ser observado ambos os cafés contaram com uma significativa atividade antioxidante protegendo as células. Destaca-se o café de Mogiana Paulista que ao analisar a viabilidade celular se mostrou estatisticamente equivalente ao ensaio do controle positivo, já o café do Cerrado Mineiro embora tenha apresentado uma quantidade menor de células quando comparado ao controle positivo e ao tratamento com o café da região da Mogiana Paulista, significativamente maior que o controle negativo o que indica também uma capacidade de proteção celular ao estresse provocado pela luz UV. A partir da diferença de resultados entre as regiões de plantio pode-se inferir que o local de plantio exerceu uma influência significativa na atividade antioxidante dos cafés.

Bliska (et al.) (2013) demonstraram que as condições edafoclimáticas como solo, temperatura e altitude influenciam na composição química do café, sendo que algumas soluções para diminuir o impacto na composição foram estudadas, tais como

Os compostos fenólicos são um grupo de antioxidantes não enzimáticos presentes em alimentos de origem vegetal, sendo o café considerado a bebida que mais os possui. O ácido 5-cafeoilquínico (formado pelo ácido cafeico com o ácido quínico) é encontrado em altas concentrações e tem como função proteger contra agressões patogênicas, por parasitas, com radiação ultravioleta, absorção de luz e remoção de radicais livres formados durante a fotossíntese (CRISÓSTOMO, 2014). Tal associação pode explicar o efeito antioxidante dos cafés estudados às células submetidas ao estresse com a luz UV.

O óleo de café verde obtido pela prensagem dos grãos de *Coffea arábica* o qual é rico em lipídeos e usado para diversos benefícios estéticos, também apresentou uma promissora capacidade de proteção da pele contra danos causados pela exposição a radiação solar (raios ultravioletas), isso devido a sua ação antioxidante e fotoprotetora. Essa proteção ainda que baixa é capaz de aumentar o fator de proteção solar de filtros orgânicos quando interagem de forma intermolecular (LEONE, 2019).

O peróxido de hidrogênio é considerado uma espécie reativa de oxigênio (EROs) que são metabólitos produzidos pelo organismo celular e são conhecidos por sua ação paradoxal devido a efeitos benéficos e prejudiciais. Por tempos foi considerado unicamente como tóxicos para as células, sendo utilizado para esterilização quando em altas concentrações, provocando danos às biomoléculas, inativação de enzimas por oxidação e provocar danos aos ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos, mas já podem ser considerados benéficos dependendo da sua concentração, atuando como moléculas sinalizadoras, mensageiros secundários, na proliferação e sobrevivência celular. Em invasões patogênicas é estimulada a produção de oxidantes antimicrobianos. A principal questão esta no restabelecimento do oxigênio, já que, a falta deste causa isquemia o que causa dano aos tecidos (CRISÓSTOMO, 2014; MOARES, 2015).

Os resultados para estresse causado pelo peróxido de hidrogênio em células de *S. boulardii* são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Viabilidade celular da *S. boulardii* submetida ao estresse com peróxido de hidrogênio.

Tratamentos	Viabilidade celular (UFC/ mL)
Controle positivo	1,18x10 ⁸ a
Controle negativo	<1x10 ¹ b
1000-MG	<1x10 ¹ b
1000-SP	<1x10 ¹ b

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Controle positivo: os microrganismos não foram submetidos ao estresse com peróxido de hidrogênio e não tiveram contato com o café.

Controle negativo: os microrganismos foram submetidos ao estresse com peróxido de hidrogênio, mas não tiveram contato com o café.

1000-MG os microrganismos foram submetidos ao estresse com peróxido de hidrogênio e tiveram contato com o café de Minas Gerais (100ppm).

1000-SP microrganismos foram submetidos ao estresse com peróxido de hidrogênio e tiveram contato com o café de São Paulo (100ppm).

Ambos os cafés não tiveram uma significativa ação antioxidante sobre as células de *S. boulardii* contra o estresse causado pelo peróxido de hidrogênio da concentração usada, já que, estatisticamente, a viabilidade celular referente ao café de Mogiana Paulista e do Cerrado Mineiro foram iguais ao controle negativo. Mediante a isso é possível entender que o café possui uma melhor proteção ao nível de membrana celular, dado que, em comparação com o teste feito com estresse oxidativos com luz UV o café demonstrou uma ação protetora superior.

Crisostomo (2014), demonstrou que na concentração de 4mM de peróxido de hidrogênio, não houve crescimento de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, posteriormente foram feitas outros experimentos com diversas concentrações e foi observado um leve crescimento quando a concentração foi de 0,2mg/ml, mas sem significância estatística.

Paula et al. (2015) relacionaram em sua pesquisa a determinação da atividade antioxidante *in vitro* das bebidas de café e chás verde e preto, em uma comparação entre os três extratos. Com relação aos teores de compostos fenólicos o café apresentou-se ser o maior, em seguida o chá verde e por último o chá preto. Já na questão de atividade antioxidantes o café apresentou alta atividade quelante

em comparação ao chá preto. Quanto ao poder redutor de inibição da peroxidação lipídica não houve nenhuma diferença significativa entre os extratos em estudo.

O grau de torrefação é capaz de modificar o poder redutor do café, estudos demonstram que diferentes graus de torra podem apresentar alterações em suas atividades antioxidantes, sendo que geralmente o grau de torra mais escuro apresentam valores superiores para estas análises (SANTOS et. 2007).

Os resultados retratados neste trabalho evidenciam que o café possui uma melhor proteção ao nível de membrana celular, já que, no testes feitos com luz UV o valor de viabilidade celular foi maior, demonstrando que houve quantidade maior de cepas crescendo, diferente do teste com peróxido de hidrogênio que estatisticamente não demonstrou crescimento de cepas. Além da diferença de ação protetora do café é possível analisar a interferência química na composição dos cafés visto que os valores de viabilidade entre o de Mogiana Paulista e do Cerrado mineiro foram diferentes.

7. Conclusão

Pode-se concluir que o café se mostrou um promissor antioxidante para os ensaios que envolveram o estresse oxidante provocado pela luz UV especialmente para o café da região da Mogiana Paulista de São Paulo quando comparados com o café do Cerrado Mineiro – Minas Gerais. Tais resultados reforçam a tese de que as condições edafoclimáticas podem influenciar na composição química e nos efeitos biológicos do café. Já para o estresse provocado pelo peróxido de hidrogênio, ambos os cafés não foram capazes de evitar os danos celulares. Mais estudos com diferentes concentrações e outras condições de estresse devem ser estudadas para entenderem melhor os mecanismos pelos quais os antioxidantes presentes no café atuam na proteção celular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES R. C.; OLIVEIRA B.; CASA S. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade. São Paulo, 2009.
- ANGELO P. M.; JORGE N.; Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão; **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, vol. 66 n.1, p. 1-9, 2007.
- ARO, A.; TUOMILEHTO, J.; KOSTIAINEN, E.; UUSITALO, U.; PIETINEN, P. Boiled coffee increases serum low density lipoprotein concentration. **Metabolism**, v.36, n.11, p. 1027-1030, 1987.
- BIAGGIONI, I.; PAUL, S.; PUCKETT, A.; ARUZUBIAGI, C. Caffeine and theophylline as adenosine receptor antagonists in humans. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.258, n.2, p.588-593, 1991.
- BLISKA F. M., TURCO P. H. N., TOSTO S. G., FRONZAGLIA T., VEGRO C. L. R., Impactos de Variedades de Café Desenvolvidas no IAC Sob Diferentes Tecnologias e Condições Edafoclimáticas. **VIII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Salvador, 2013.
- CAMARGO, M.C.R.; TOLEDO, M.C.F. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) na dieta da população de Campinas, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.1, p. 49-53, 2002.
- CHAMMAS R., Extresse Oxidativo e Câncer. **GBETH Newsletter, Grupo de Oncologia Molecular**, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, v. 5, n. 6, p.1-3, 2007.
- CRISÓSTOMO L. M. S.; Efeitos de extrato de café na proteção contra oxidantes em *Saccharomyces cerevisiae*. **Departamento de nutrição - Universidade de Brasília**, 2014.
- CRUZ R. G.; VIEIRA T. M. F. S.; LIRA S. P. Potencial antioxidante of brazilian coffee from the region of Cerrado. **Food Science and Technology**. Campinas, 2018.
- DUNWIDDIE, T.V.; MASINO, S. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, v.24, n.1, p. 31-55, 2001.

HASSAN, H.M.M. Antioxidant and Immunostimulating Activities of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Autolysates. **World Applied Sciences Journal**, v.15, n.8, p. 1110-1119, 2011.

HENRIQUES, J.A.P.; DAFRÉ, A.L.; PICADA, J.N.; MARIS, A.F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: SERAFINI, L.A.; Barros, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria. Guaíba: Agropecuária**. v.1, n.1, p. 227-252, 2001.

JEE, S.H.; HE, J.; APPEL, L.J.; WHELTON, P.K.; SUH, I.; KLAG, M.J. Coffee consumption and serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. **American Journal of Epidemiology**, v.153, n.4, p. 53-62, 2001.

LASHERMES, P.; ANDRADE, A. C.; ETIENNE, H.; Genomics of coffee, one of the world's largest traded commodities. In P. H. Moore, & R. Ming (Eds.), **Genomics of tropical crop plants**. p. 203-225, 2008.

LEONE B. A., Determinação da seletividade no sinergismo entre filtros solares sintéticos e óleo de café verde. **Universidade Estadual Paulista**, Araraquara, 2018.

LIMA A. R.; PEREIRA R. G. F. A.; ABRAHÃO S. A.; DUARTE S. M. S.; PAULA F. B. A., Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro o café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Quim. Nova** , v. 33, n.1 p 20-24, 2010.

MONTEIRO M. C.; TRUGO L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Quim. Nova**, v.28, n. 4, p. 637-641, 2005.

MORAES R. M.; Aspectos fisiológicos, metabólicos e alterações no ciclo celular de *Lactuca sativa* L. (asteracear) em resposta ao cobre, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. Alfenas, 2015.

MUBARAK, A.; HODGSON, J.M.; CONSIDINE, M.J.; CROFT, K.D.; MATTHEWS, V.B. Supplementation of a High-Fat Diet with Chlorogenic Acid Is Associated with Insulin Resistance and Hepatic Lipid Accumulation in Mice. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.18, p. 4371-4378, 2013.

NEHLIG, A. Coffee, Tea, Chocolate, and the Brain; **Nehlig, A., ed.; CRC Press LLC: Boca Raton**, 2004.

NOGUEIRA M.; TRUGO L. C. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.23, n.2, p. 296-299, 2003.

PAULA R. A. O.; SANTOS E. S.; PINTO L. F.; PAULA F. B. A.; RODRIGUES M. R.; SALLES B. C. C.; DUARTE S. M. S.; Determinação da atividade antioxidante in vitro das bebidas de café e chás verde e preto. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**; v.36, n.2, p.167-171, 2015.

SAES, M. S. M.; NAKAZONE, D. O agronegócio café do Brasil no mercado internacional. **Revista Fae Business**, v. 9, n.9, p. 40-42, 2004.

SANTOS B. H. C., Papel Biológico dos Dímeros de Pirimidina em Células Humanas Irradiadas com Radiação UVA, São Paulo, 2010.

SANTOS M. H.; BATISTA B. L.; DUARTE S. M. S.; ABREU C. M. P.; GOUVÊA C. M. C. P.; **Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (Coffea arábica)**, 2007.

SILVA, C.G.; HERDEIRO, R.S.; MATHIAS, C.J.; DANEK, A.D.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P.; RENNÓ, M.N.; FALCÃO, D.Q.; CERQUEIRA, D.M.; MINTO, A.B.M.; NOGUEIRA, F.L.P.; QUARESMA, C.H.; SILVA, F.F.M.; MENEZES, J.F.M.; ELEUTHERI, E.C.A. **Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. Pharmacological Research**, v.52, n.1, p. 229-233, 2005.

SILVA, D. C. F.; NASCIMENTO, M. A.; MOREIRA, A. V. B. Verificação da presença de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes em amostras de café. **Nutrire**, v.32, n.1, p.41-58. 2007.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n1, p. 95-100, 2005.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.71-81. 2002.

THOMAZINI A.; AZEVEDO H. C. A.; PINHEIRO P. L.; MENDONÇA E. S.; Atributos Físicos do Solo em Diferentes Sistemas de Manejo de Café, na Região Sul do Espírito Santo. **Coffee Science**, v.8, n.4, p. 450-459, 2013.

TVERDAL, A.; STENSVOLD, I.; SOLOVOLL, K.; FOSS, O.P.; LUND-LARSEN P.; BJARTVEIT, K. Coffee consumption and death from coronary heart disease in middle aged. **British Medical Journal**, v.300, n.3, p. 566-569, 1990.

URGERT, R.; KATAN, M. B. The cholesterol-raising factor from coffee beans. **Annual Review of Nutrition**, v.17, n.2, p.305-24, 1997 .

VIEIRA, H. D. (2008). Coffee: The plant and its cultivation. In **M. Souza (Ed.)**, **Plantparasitic nematodes of coffee** p. 3-18.