



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**



Programa de Pós-graduação em Química

**DAYENE DO CARMO CARVALHO**

***Coffea arabica* L. ORGÂNICO E CONVENCIONAL:  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ESTUDOS BIOQUÍMICOS  
E TOXICOLÓGICOS *in vivo***

Alfenas/MG

2011

**DAYENE DO CARMO CARVALHO**

***Coffea arabica* L. ORGÂNICO E CONVENCIONAL:  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ESTUDOS BIOQUÍMICOS  
E TOXICOLÓGICOS *in vivo***

Dissertação apresentada a Universidade Federal de  
Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Química; Área de concentração:  
Química Analítica.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Luciana Azevedo

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Cristiana S. Magalhães.

Alfenas/MG

2011

**DAYENE DO CARMO CARVALHO**

***Coffea arabica* L. ORGÂNICO E CONVENCIONAL:  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ESTUDOS BIOQUÍMICOS  
E TOXICOLÓGICOS *in vivo***

A banca examinadora abaixo assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas; Área de concentração: Química Analítica.

**Aprovada em: 23/02/2011**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Azevedo

Instituição: Universidade Federal de Alfenas/ MG

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Borges Araújo de Paula

Instituição: Universidade Federal de Alfenas/ MG

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof<sup>o</sup>. Dr. Paulo César Stringheta

Instituição: Universidade Federal de Viçosa/ MG

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Essa Dissertação é dedicada ao meu pai Adimar, à minha mãe Everalda, meus tesouros, que com muito amor e exemplos, souberam me ensinar o verdadeiro valor da luta, da conquista e da honestidade.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por me manter firme, apesar das dificuldades e por ter me dado a graça de mais uma conquista;

Aos meus pais, Adimar e Everalda, a minha irmã, Luciene, ao meu sobrinho, Gustavo, ao meu namorado, Geraldo José, e aos meus familiares pelo carinho, amizade, companheirismo e pelos deliciosos momentos de felicidade;

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade concedida;

Ao Curso de Pós-Graduação em Química da UNIFAL, por permitir o desenvolvimento deste trabalho. À FAPEMIG pela concessão da bolsa de Mestrado;

A minha orientadora, professora Dra. Luciana Azevedo, meu agradecimento mais que especial, pelo apoio e compreensão. Sua confiança e orientação foram fonte de meu bem estar na UNIFAL e de êxito neste trabalho. Muito obrigada.

Aos professores da Pós-graduação em Química, por todo o ensino e dedicação, em especial o professor Dr. Pedro Orival Luccas pelas conversas e orientações durante os estágios e análises, a professora Dra. Cristiana S. Magalhães pela co-orientação e idealização do café para este trabalho, e a todos os outros discentes que contribuíram de alguma forma durante a realização das análises químicas, bioquímicas e toxicológicas;

Aos alunos de Iniciação Científica, Danielle, Vinícius, Caio, Dayse, Lellis, Lucas, Raquel, João Paulo e aos demais alunos que me auxiliaram durante este período, em especial ao aluno Flávio Pereira Picheli pela dedicação, companheirismo e amizade. Agradeço também a todos os funcionários e técnicos da UNIFAL;

Ao Dr. Valdir Peres e ao Dr. Antônio Taranto Goulart, que me ensinaram a dar os primeiros passos para explorar, respeitar e valorizar a Química em seu todo;

A todos os amigos: Lara, Felipe, Kelly, Lidia, Carolina, Jaqueline, Gabriel, Eunice, Patrícia, em especial Cláudia Quintino e Roberta Ribeiro por me receberem de coração em suas vidas e me mostrarem um novo conceito de amizade. Muito sucesso para vocês.

Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram para a concretização deste trabalho.

*“É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar.  
Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,  
mas lutamos para que o melhor fosse feito.  
Não somos o que devíamos ser,  
não somos o que iremos ser...  
mas graças a Deus, não somos o que éramos.”*  
*(Martin Luter King)*

## RESUMO

A diferenciação entre o café orgânico e convencional tem aumentado devido á crescente demanda e alto consumo de alimentos saudáveis que contêm compostos com potencial antioxidante, que têm sido associadas com a redução de doenças crônicas, como o câncer. Devido a essa grande importância, este trabalho teve como objetivo avaliar a composição química das amostras de café orgânico e convencional, além dos seus efeitos anticarcinogênico/carcinogênico, antioxidantes e das suas repercussões sobre a composição mineral hepática, *in vivo*. Para as avaliações *in vivo*, foi conduzido experimento com duração de doze semanas, incorporando o café nas rações dos animais na forma de infuso (5; 10; 20% m/v) e de pó de café (4% m/m). Para as avaliações toxicológicas os animais foram submetidos ou não, a lesões no cólon, induzidas por DMH. No final do experimento coletou-se cólon, sangue e fígado de todos os animais para análises de lesões pré-neoplásicas, parâmetros bioquímicos, estresse oxidativo e composição mineral hepática. Para avaliação da composição química dos manejos orgânico e convencional, foi realizada determinação dos teores de Cu, Fe e Zn por FAAS e análise quantitativa de ácidos clorogênicos, ácido cafeico, cafeína e trigonelina por HPLC. Quanto às análises de minerais no pó de café, encontrou-se maiores teores no manejo convencional. Os infusos tiveram diferenças apenas nos teores de Zn, sendo que o infuso orgânico 20% apresentou maior teor. Os teores de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina tiveram teores mais altos no manejo orgânico. Apesar das diferenças químicas entre os manejos, os cafés na forma de infuso, em todas as concentrações utilizadas, tiveram efeito antioxidante verificado através da redução de MDA. Entretanto, não foram capazes de provocar proteção/lesão nos cólons. Além disso, não produziram alterações significativas no teor de minerais dos fígados, nem nos níveis de uréia, creatinina, colesterol, triglicérides, glicose, AST e ALT. Assim, os resultados encontrados indicam que apesar das diferenças na composição química, os cafés, orgânico e convencional, tiveram efeitos antioxidantes quando ingeridos na forma de infuso e não apresentaram riscos para a saúde.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica* L. Análise química. Lesões Pré-Neoplásicas. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

The distinction between conventional and organic coffee has great due to increasing demand and high consumption of healthy foods that contain compounds with antioxidant potential, which have been associated with the reduction of chronic diseases, such as cancer. Because of this importance, this study aimed to evaluate the chemical composition of samples of organic and conventional, in addition to its anticarcinogenic/carcinogenic effects, antioxidant and its impact on the mineral composition of liver, *in vivo*. For the evaluations *in vivo* experiment was conducted for twelve weeks, incorporating the coffee in the diets of animals in the form of infusion (5, 10, 20% w/v) and powder coffee (4% m / m). For toxicological tests animals were submitted or not, the lesions in the colon induced by DMH. At the end of the experiment were collected colon, blood and liver of all animals for analysis of preneoplastic lesion, biochemical parameters, oxidative stress and liver mineral composition. To evaluate the chemical composition of organic and conventional managements, determination was made of Cu, Fe and Zn by FAAS and quantitative analysis of chlorogenic acid, caffeic acid, caffeine and trigonelline by HPLC. Analyses of minerals in the powder coffee, we found higher levels in the conventional management. The infusions were only differences in the levels of Zn, and 20% organic, the organic had the highest amount. The content of chlorogenic acids, caffeine and trigonelline levels were higher in organic management. Despite the chemical differences between the managements, the coffees in the form of infusion in all concentrations, antioxidant effects were observed through the reduction of MDA. However, they were unable to induce protection/lesion in the colon. Also, do not produce significant changes in mineral content of the liver, nor in the levels of urea, creatinine, cholesterol, triglycerides, glucose, AST and ALT. Thus, our results indicate that despite differences in chemical composition, coffes, organic and conventional, have antioxidant effects when ingested in the form of infusion and did not present a risk to health.

**Keywords:** *Coffea arabica* L. Chemical Analysis. Pre-Neoplastic lesions. Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura da cafeína .....	18
Figura 2 -	Estrutura dos ácidos clorogênicos presentes no café .....	18
Figura 3 -	Estrutura da trigonelina.....	19
Figura 4 -	Estágios de iniciação, promoção e progressão da carcinogênese.....	20
Figura 5 -	(A) Fotografia de um campo com um foco com duas criptas aberrantes. (B) Corte transversal das criptas intestinais normais. (C) Fotografia de um o foco com uma cripta aberrante. (D) Fotografia de criptas normais.....	25
Figura 6 -	Micrografia de um Foco Depletado de Mucina com três criptas.....	26
Figura 7 -	Mecanismos mediadores da morte celular e estresse oxidativo; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutathione peroxidase; GSSG: glutathione oxidada; GSH: glutathione reduzida; GR: glutathione reductase.....	28
Figura 8 -	Reação de Fenton, com redução dos cátions férricos por radical superóxido e reação de Haber-Weiss catalisada por íons ferrosos.....	28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Delineamento experimental 1.....	39
Tabela 2 -	Delineamento experimental 2.....	40
Tabela 3 -	Quantidade de amostras e reagentes adicionados para o processo de digestão.....	42
Tabela 4 -	Programa de digestão do micro-ondas para pó de café torrado e moído, infusos, rações modificadas e fígados.....	42
Tabela 5 -	Resultados da composição centesimal do pó de café e das infusões, obtido dos manejos orgânico e convencional (g.100g <sup>-1</sup> ).....	48
Tabela 6 -	Resultado obtido da avaliação da evolução nutricional dos animais do delineamento experimental 1.....	51
Tabela 7 -	Resultados obtidos do delineamento 2 relacionados ao peso corpóreo, evolução do peso dos animais, consumo de ração e café dos diferentes manejos.....	53
Tabela 8 -	Parâmetros analíticos para determinação de Cu, Fe e Zn em HNO <sub>3</sub> 0,5 mol. L <sup>-1</sup> por FAAS.....	55
Tabela 9 -	Resultados dos teores médios de Cu, Fe e Zn encontrados nas amostras de café torrado e moído (mg.Kg <sup>-1</sup> pó de café) e de infusões (mg.L <sup>-1</sup> ), ração (mg.Kg <sup>-1</sup> ração seca) e fígado (mg.g <sup>-1</sup> de fígado).....	57
Tabela 10 -	Concentrações de ácido clorogênicos, cafeína e trigonelina nos infusos e extratos metanólicos de café orgânico e convencional (g.kg <sup>-1</sup> de café).....	59
Tabela 11 -	Resultados da análise do número de focos de criptas aberrantes e número de criptas por foco obtido da análise dos cólons do delineamento experimental 2.....	63
Tabela 12 -	Resultados da análise do número de focos depletados de mucina e número de criptas por foco obtido da análise dos cólons do delineamento 2.....	64
Tabela 13 -	Resultados da análise do número de focos reduzidos de mucina e número de criptas por foco obtido da análise dos cólons do delineamento 2.....	64
Tabela 14 -	Parâmetros analíticos para determinação de proteína e MDA.....	65
Tabela 15 -	Efeito do café orgânico e convencional nos níveis de MDA e PCO.....	65
Tabela 16 -	Avaliação dos parâmetros bioquímicos das amostras de sangue coletadas de todos os animais do delineamento experimental 2.....	69

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Trabalhos envolvendo estudos toxicológicos <i>in vivo</i> com preparações a base de café ou outros princípios bioativos derivados de suas preparações.....	24
------------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ALT/TGP -</b>	Amino Alanino Transferase
<b>ANOVA -</b>	Analysis of Variance
<b>ANVISA -</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AOAC -</b>	Association of Official Analytical Chemists
<b>AST/TGO -</b>	Aspartato Amino Transferase
<b>CCR -</b>	Câncer de Colorretal
<b>CEMIB -</b>	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
<b>CEUA -</b>	Comissão de Ética no Uso de Animal
<b>COBEA -</b>	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>COOPFAM -</b>	Cooperativa dos Pequenos Produtores de Poço fundo
<b>DMH -</b>	1,2-dimetilhidrazina
<b>DNPB -</b>	1,2-dinitrofenilhidrazina
<b>EDTA -</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético
<b>FAAS -</b>	Flame Absorption Atomic Spectrophotometer
<b>FCA -</b>	Focos de Criptas Aberrantes
<b>HID-AB -</b>	Hight iron diamine-alcian Blue
<b>HPLC -</b>	Hight Performace Liquid Cromatografic
<b>IFOAM -</b>	International Federation of Organic Agricultural Moviment
<b>IUPAC -</b>	International Union Pure and Applied Chemistry
<b>LD -</b>	Limite de Detecção
<b>LQ -</b>	Limite de Quantificação
<b>MDA -</b>	Malonaldeído
<b>FDM -</b>	Focos Depletados de Mucina
<b>p.c. -</b>	Peso copóreo
<b>PCO -</b>	Carbonilas proteicas
<b>S.P.F. -</b>	Specific Pathogen Free
<b>USDA -</b>	United States Department of Agricultural
<b>UV-Vis -</b>	Ultravioleta-Visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Manejo orgânico e convencional.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Composição química do café.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Câncer e DMH.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>Estudos toxicológicos in vivo.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5</b>	<b>Modelos para avaliação de danos no DNA.....</b>	<b>25</b>
<i>2.5.1</i>	<i>Teste de criptas aberrantes (FCA).....</i>	<i>25</i>
<i>2.5.2</i>	<i>Focos depletados/reduzidos de mucina (FDR/FRM).....</i>	<i>26</i>
<b>2.6</b>	<b>Estresse oxidativo e minerais.....</b>	<b>27</b>
<b>2.7</b>	<b>Parâmetros bioquímicos.....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Equipamentos e reagentes.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Obtenção das amostras de café.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparo das rações modificadas.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Composição centesimal.....</b>	<b>38</b>
<b>4.5</b>	<b>Delineamentos experimentais.....</b>	<b>38</b>
<i>4.5.1</i>	<i>Delineamento experimental 1.....</i>	<i>39</i>
<i>4.5.2</i>	<i>Delineamento experimental 2.....</i>	<i>40</i>
<b>4.6</b>	<b>Determinação de Cu, Fe e Zn.....</b>	<b>41</b>
<b>4.7</b>	<b>Determinação de compostos orgânicos.....</b>	<b>42</b>
<b>4.8</b>	<b>Focos de criptas aberrantes (FCA) e Focos depletados/reduzidos de mucina (FDM/FRM).....</b>	<b>43</b>
<b>4.9</b>	<b>Estresse oxidativo.....</b>	<b>44</b>
<i>4.9.1</i>	<i>Estimativa de proteínas.....</i>	<i>44</i>
<i>4.9.2</i>	<i>Oxidação protéica.....</i>	<i>44</i>
<i>4.9.3</i>	<i>Peroxidação lipídica.....</i>	<i>45</i>
<b>4.10</b>	<b>Parâmetros bioquímicos.....</b>	<b>45</b>
<b>4.11</b>	<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>47</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1</b>	<b>Composição centesimal.....</b>	<b>48</b>

<b>5.2</b>	<b>Delineamentos experimentais.....</b>	<b>50</b>
5.2.1	<i>Delineamento experimental 1.....</i>	<b>50</b>
5.2.2	<i>Delineamento experimental 2.....</i>	<b>52</b>
<b>5.3</b>	<b>Determinação de Cu, Fe e Zn.....</b>	<b>54</b>
<b>5.4</b>	<b>Determinação de compostos orgânicos.....</b>	<b>59</b>
<b>5.5</b>	<b>Teste de criptas aberrantes (FCA) e focos depletados/reduzidos de mucina (FDM/FRM).....</b>	<b>60</b>
<b>5.6</b>	<b>Estresse oxidativo.....</b>	<b>65</b>
<b>5.7</b>	<b>Parâmetros bioquímicos.....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O café ocupa posição de destaque na economia mundial sendo um dos principais produtos de exportação no Brasil. A forma e a quantidade de café consumido estão relacionadas a vários fatores, como a cultura local, hábitos e afinidades, pois possui aroma e sabor bem característico (NASCIMENTO, 2006). No Brasil, as regiões que mais se destacam na produção de café são a do Cerrado e Sul de Minas, devido à produção de alta qualidade, sendo a região do Sul de Minas Gerais a produtora de café mais antiga do Estado (MORAIS et al., 2008).

Diversos fatores podem influenciar na qualidade do café e conseqüentemente da bebida, como: o cultivar utilizado, fatores ambientais e manejo empregado (MALTA et al., 2008). O cultivar orgânico possui uma fertilização baseada em matéria orgânica e biofertilizantes, ao contrário de como é feito no manejo convencional, pois este utiliza compostos químicos tóxicos e fertilização sintética. Segundo a Federação Internacional do Movimento da Agricultura Orgânica (IFOAM) foi estimada uma produção de 20 a 30% de café orgânico em todo o mundo no último ano (SANTOS et al., 2009).

Atualmente existe uma preocupação crescente nos possíveis efeitos do café com a saúde, uma vez que a quantidade média de consumo *per capita* dessa bebida pode corresponder a, pelo menos, dois a três copos por dia, ou cerca de 5,0 Kg de café torrado por ano (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2010). Os efeitos preventivos/protetores são associados aos componentes químicos da bebida que podem interferir nos processos metabólicos atuando como antioxidantes, na ativação de enzimas hepáticas e, conseqüentemente, na detoxificação celular, fatores associados com o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas que levam a progressão do câncer (STOPPER; ABRAHAM, 2004; MONTEIRO; TRUGO, 2005).

Alguns compostos como o ácido cafeico e elágico, kahweol, cafestol, cafeína, niacina, ácidos clorogênicos e quinídeos, estão envolvidos nesses efeitos. Além dos compostos funcionais, há presença significativa de minerais no café torrado e moído apresentando teores de 3,50 a 4,50%, destacando-se Ca, K, Mg, Na, P, Co, Cr, Cu, Fe, Mn e Zn, nutrientes de grande importância para o organismo (MORGANO et al., 2002). O longo tempo de utilização de fertilizantes inorgânicos aumenta a quantidade desses minerais no solo ocorrendo acumulação de metais, podendo ser absorvidos pela planta e o consumo em excesso pode apresentar riscos à saúde (SANTOS et al., 2009).

Assim, o café é uma mistura complexa de compostos os quais têm sido relacionados com a melhoria das respostas psicoativas (estado de alerta, alterações do humor), dos distúrbios neurológicos (hiperatividade infantil, doença de Parkinson), das doenças metabólicas (diabetes, cálculos biliares), da função hepática (DOREA; DA COSTA, 2005), das doenças cardiovasculares como hipertensão arterial (HIGDON; FREI, 2006), além da diminuição das concentrações séricas de ácido úrico (NARDINI et al., 2002). Entretanto, a ingestão de café nem sempre tem resultados exclusivamente benéficos, pode ter conseqüências como a produção aumentada de urina, a redução da biodisponibilidade de nutrientes na dieta (DOREA; DA COSTA, 2005; HIGDON, FREI, 2006) e refluxo, sintomas causados por componentes ácidos do café, como os ácidos clorogênicos (CAMPA et al., 2005).

Dentre as doenças citadas anteriormente, o câncer tem merecido destaque, uma vez que é a segunda maior causa de morte no mundo, perde apenas para as doenças cardiovasculares. Há incidência de altas taxas de mortalidade provocada por diversos tipos de câncer e considera-se que a prevenção, com ênfase nos fatores associados ao estilo de vida e no combate a agentes ambientais e ocupacionais cancerígenos pode trazer bons resultados na redução da incidência desta doença (BRASIL, 2007). Dentre os tipos de câncer, o de cólon é a terceira causa mais comum no mundo, em ambos os sexos, e a segunda causa nos países desenvolvidos. O número de casos novos de câncer de cólon estimados para o Brasil, no ano de 2008, foi de 12.490 casos em homens e de 14.500 em mulheres. Na região Sudeste do Brasil, o câncer de cólon ocupa a quarta posição para os homens e a segunda para as mulheres (SILVA et al. 2009).

Dessa maneira, reconhecida a importância econômica e a necessidade contínua de novos estudos para cada vez mais compreender os efeitos do café para a saúde humana, este trabalho teve como objetivo avaliar a composição química das amostras de café orgânico e convencional, além dos seus efeitos anticarcinogênico/carcinogênico, antioxidantes e das suas repercussões sobre a composição mineral hepática, *in vivo*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Manejo orgânico e convencional

Com a evolução da agricultura ficou mais fácil ampliar a produção e fazê-la progredir, porém também criou problemas ambientais e o uso em longo prazo começou a causar efeitos adversos sobre animais e em especial ao homem, principalmente quando os alimentos provem do uso de pesticidas e fertilização artificial. A agricultura orgânica moderna foi fundada como uma reação contra práticas agrícolas que tinham o potencial de prejudicar a natureza e a saúde humana. Um desses princípios é o de evitar alterações do solo não gerados na própria fazenda, o outro é o controle de daninhas com cobertura morta em vez de gradeamento, uma vez que a lavragem do solo destrói sua matéria orgânica (JORDAN, 2004).

Atualmente, alimentos obtidos do manejo orgânico têm ganhado popularidade devido à busca por produtos saudáveis. Os estudos de mercado indicam que uma das principais razões para a compra de alimentos orgânicos é a percepção que ela contém vantagens nutricionais em relação aos produtos convencionais. No entanto, revisões de literatura têm demonstrado que há algumas diferenças e inconsistências na composição nutricional dos alimentos produzidos organicamente em relação aos alimentos produzidos por métodos convencionais (BOURN; PRESCOTT, 2002; MAGKOS et al., 2003)

As normas orgânicas se relacionam com práticas de gestão da exploração agrícola envolvendo a rejeição de fertilizantes químicos sintéticos, pesticidas e produtos farmacêuticos, a utilização dos recursos naturais para melhorar a fertilidade do solo e resistência à doenças, à proteção dos ecossistemas, restringindo a prática do desmatamento e incentivando a conservação do solo e da água. Assim, o café orgânico tem um maior valor agregado e é tratado com adubos orgânicos, biofertilizantes ou matéria orgânica, ao contrário da produção de café convencional, que utiliza produtos químicos, pesticidas e fertilizante químico (SANTOS et al., 2009).

Assim, o manejo orgânico tem sido uma maneira de explorar harmoniosamente a terra e a natureza para a produção de alimentos, combustíveis, fibras e outros recursos essenciais para a vida das pessoas sem a utilização de produtos sintéticos que possam trazer algum prejuízo para o meio ambiente e para a saúde do ser humano, entretanto, este tratamento pode influenciar as composições químicas e nutricionais dos alimentos (WOJTKOWSKI, 2006; SANTOS et al., 2010).

## 2.2 Composição química do café

As plantas são capazes de assimilar minerais e compostos orgânicos a partir do meio em que se desenvolvem, podendo eventualmente disponibilizá-los para o humano. Essa captação depende de fatores como pH do meio, teor de matéria orgânica, concentração dos minerais nos solos, além de fatores fisiológicos como o tipo de planta ou seu estágio de desenvolvimento e quadro patológico (GARCIA, 2006).

O conhecimento da composição dos alimentos consumidos é fundamental para se alcançar segurança alimentar e nutricional já que é uma tendência das últimas décadas a busca por dietas balanceadas, ricas em proteínas, carboidratos e principalmente dos elementos macros e micros essenciais. Elas são fundamentais para o bom desempenho das funções biológicas e fisiológicas do organismo (UNICAMP, 2006).

O café é um alimento fonte de minerais e compostos orgânicos. Dentre os teores de minerais presentes no café destaca-se Ca, K, Mg, Na, P, Co, Cr, Cu, Fe, Mn e Zn (MORAIS et al., 2008). Dentre esses, destaca-se os metais essenciais de transição, em geral: Cu, Fe, Se e Zn que são usados pelas células como cofatores enzimáticos, sendo esses catalisadores de reações citotóxicas (SZPUNAR, 2004).

Além desses metais, o café também possui cafeína, aminoácidos como: alanina, arginina, asparagina, cisteína, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina; lipídeos: triglicerídeos e ácidos graxos; açúcares: sucrose, glicose, frutose, arabinose, galactose, maltose, polissacarídeos, uma vitamina do complexo B, a niacina; e em teores mais elevados, de 7 a 10 %, os ácidos clorogênicos (TRUGO, 1984).

A cafeína (Figura 1) foi à primeira substância presente no café a ser estudada. Corresponde a 1 a 2,5 % da composição do café, além de possuir estabilidade térmica durante o processo de torra, contribuindo de forma importante para o sabor e aroma do café (MONTEIRO; TRUGO, 2005). Seu consumo em baixas a moderadas doses pode resultar em efeito estimulante do sistema nervoso central, com possível diminuição do sono e aumento na capacidade de concentração (DEVASAGAYAM et al., 1996).

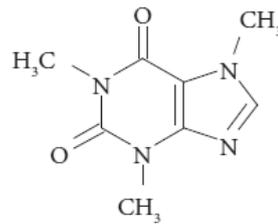


Figura 1 - Estrutura da cafeína.  
Fonte: MORAIS et al, 2008.

Os fenóis são compostos aromáticos encontrados geralmente em baixas concentrações no café torrado. A variedade e a concentração dos compostos fenólicos voláteis no café torrado variam de acordo com o grau de torra. Os compostos fenólicos são conhecidos por suas características antioxidantes, entre eles figuram os ácidos clorogênicos (MONTEIRO; TRUGO, 2005).

Os ácidos clorogênicos (Figura 2), que são considerados os mais importantes e os que apresentam em maior quantidade no café, são facilmente degradados durante o processo de torra. Estes ácidos incluem pelo menos cinco grupos de isômeros nos quais os ácidos cafeoilquínicos, dicafeoilquínicos e feruloilquínicos (CLIFFORD, 1999). Os ácidos clorogênicos e os quinídeos formados na torra adequada do café podem ser mais importantes que a cafeína na bebida, pois tem grande auxílio na prevenção e controle da depressão, cirrose e outras (LIMA, 2010).

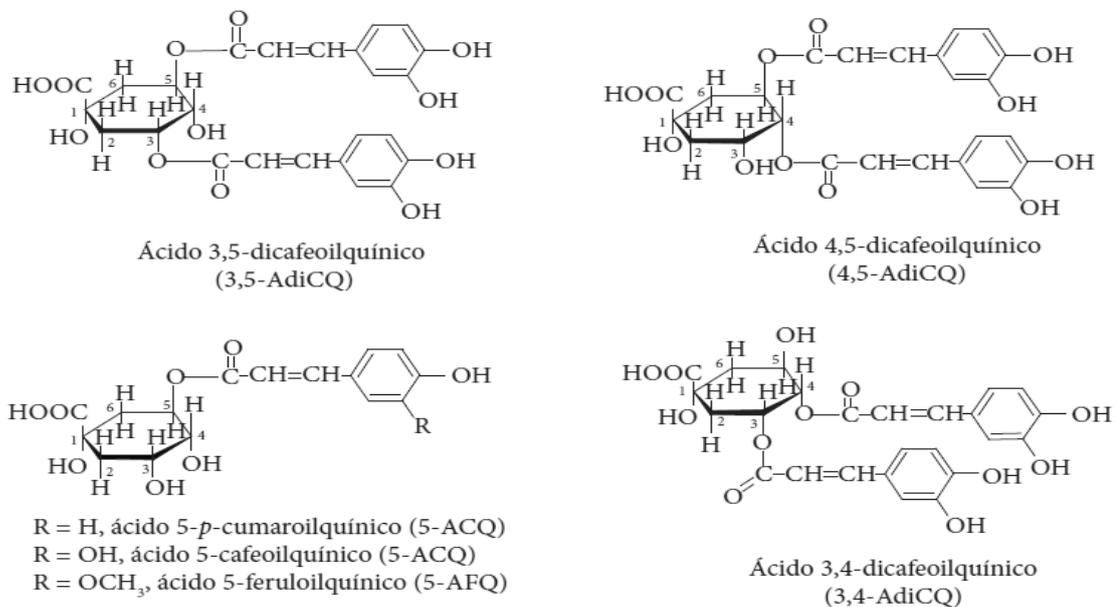


Figura 2 - Estruturas dos ácidos clorogênicos presentes no café.  
Fonte: MORAIS et al, 2008.

A trigonelina (Figura 3) é um composto nitrogenado encontrado em maiores quantidades no café verde importante na determinação do aroma e sabor do café. Durante o processo de torra dos grãos reduz seu teor em 70%, o composto é transformado em diversos produtos voláteis principalmente piridinas e pirróis. Mediante a esse processo drástico de torra é formada a niacina, mais conhecida como vitamina B3, importante para o metabolismo humano (MONTEIRO; TRUGO, 2005), eficaz na redução colesterol, competindo em eficácia com muitos medicamentos alopáticos prescritos, e com a vantagem de ser natural e não possuir efeitos colaterais (OLIVEIRA, 2007).

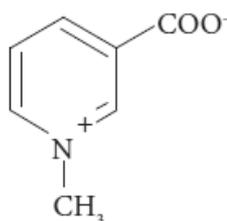


Figura 3 - Estrutura da trigonelina.  
Fonte: MORAIS et al, 2008.

As proantocianidinas apresentam atividades farmacológicas e biológicas como: antioxidantes, bactericida, fungicida, antiviral e antitumoral (ALVES et al., 2007). Esses compostos são responsáveis pelas características gustativas dos vinhos, cafés, chás bem como pela cor e sabor destes devido sua associação com as antocianinas, por outro lado reagem com as proteínas da saliva, sendo esta reação responsável pela adstringência evidenciada nas bebidas de cafés (JORDÃO et al., 1998).

### 2.3 Câncer e DMH

Freqüentemente, o DNA sofre agressões por substâncias exógenas e endógenas. No entanto, as células possuem sistemas enzimáticos capazes de reparar a grande maioria desses danos. Embora esses sistemas sejam eficientes, algumas lesões, ou mesmo erros espontâneos durante a replicação do DNA, não são reparados, podendo resultar em evento mutagênico. Esse evento pode corresponder à etapa de iniciação de um processo carcinogênico (RAMEL, 1984; TUCKER; PRESTON, 1996).

Três tipos principais de alterações genéticas podem ocorrer: (1) alterações no DNA conhecidas como mutação de ponto, (2) alterações da estrutura de cromossomos, tais como quebras e rearranjos e (3) separação desigual dos cromossomos durante a divisão celular. A iniciação é seguida das etapas de promoção, progressão e manifestação, conforme apresentado na Figura 4.

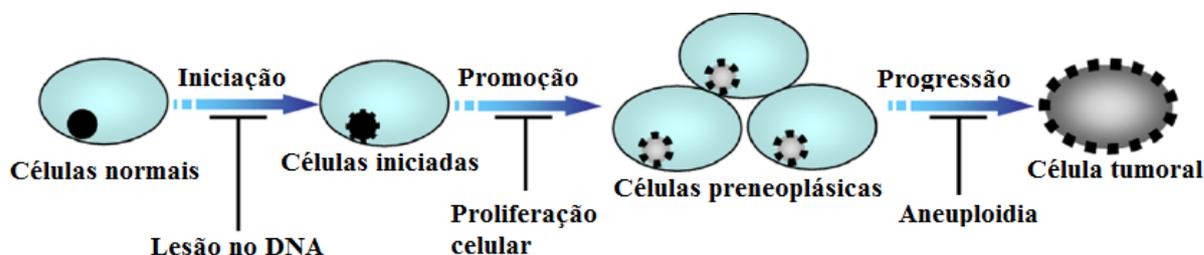


Figura 4 - Estágios de iniciação, promoção e progressão da carcinogênese.

Fonte: TAO et al. 2008; PITOT, 1993.

A iniciação corresponde à interação do agente químico com o DNA da célula-alvo, levando à mutação; a promoção caracteriza-se pela proliferação celular, favorecendo o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, como os focos de células alteradas (BANNASCH, 1986; PITOT et al., 1987); a progressão, por sua vez, é caracterizada, morfológicamente, por anaplasia e, biologicamente, por crescimento autônomo (PITOT, 1989). Quando as células adquirem a capacidade de invadir e metastatizar e todas essas alterações forem evidenciadas clinicamente, ter-se-á a última etapa, a manifestação. De acordo com Zakrzewski (1997) a correlação observada entre a mutagenicidade e a carcinogenicidade é consistente com a teoria de que o câncer é causado por mutações somáticas.

Um grande número de substâncias do meio ambiente pode interagir com o sistema genético do homem e de outros animais, levando às mutações, outras substâncias já exercem efeitos contrários, sendo estas conhecidas como quimiopreventivos. Estudos revelam que existe associação inversa entre o consumo de café e o risco de câncer. Em animais existe um provável suporte para os efeitos quimiopreventivos do café, sendo que nos estudos crônicos conduzidos com roedores, a administração de café em altos níveis na dieta resulta na diminuição de tumores espontâneos situados em diferentes órgãos (CAVIN et al., 2002).

Mecanismos subjacentes dos efeitos antitumorígenicos do café não são claros, pois o café contém componentes complexos, portanto, há apenas supostas evidências de que os

efeitos podem ocorrer devido à atuação de alguns compostos, como: cafestol, kaweol, cafeína, ácidos clorogênicos provocando inibição da carcinogênese (TAO et al., 2008).

Carcinogênese é um termo genérico que compreende os vários mecanismos que participam do desenvolvimento de neoplasias malignas. Ela pode ocorrer de forma espontânea ou ser induzida por agentes físicos, químicos, biológicos ou genéticos. Algumas lesões, ou mesmo erros espontâneos durante a replicação do DNA, não são reparados, podendo resultar em evento mutagênico. Esse evento pode corresponder à etapa de iniciação de um processo carcinogênico (RAMEL, 1984; TUCKER; PRESTON, 1996).

Dentre os vários tipos de câncer, o câncer de cólon é uma importante causa de morte no ocidente, essas causas ainda não estão bem compreendidas, e geralmente são sugeridas na literatura como problemas genéticos combinados com a baixa ingestão de fibras, proteínas, frutas e vegetais (DIAS et al., 2010). O prognóstico dos portadores de carcinoma de cólon é dependente da extensão anatômica do tumor por ocasião do diagnóstico e da possibilidade de se realizar a extirpação completa da neoplasia. Satisfeitas estas exigências, passam a influenciar o prognóstico outras variáveis, entre as quais se destaca o estudo histopatológico (BRASIL, 2007).

Modelos experimentais, utilizando cancerígenos químicos são adotados para estudar aspectos da carcinogênese do cólon que não podem ser analisados em seres humanos. Além disso, os estudos experimentais permitem a observação detalhada das alterações que precedem o aparecimento da neoplasia maligna a nível macroscópico e histológico. A administração destes cancerígenos aos roedores leva o aparecimento de carcinomas no cólon, similares do ponto de vista macroscópico e histológico aos observados na espécie humana.

A droga 1,2-dimetilhidrazina (DMH), uma das drogas mais utilizadas nos estudos da carcinogênese de cólon. Trata-se, portanto, de um pró-carcinógeno, uma vez que necessita ser metabolicamente convertida no fígado. Essa droga tem a capacidade de promover hipermetilação do DNA das células epiteliais colônicas (HOFFMAN-GOETZ, 2003). A metilação anormal de DNA parece facilitar a instabilidade cromossômica, e se mostra um evento precoce na seqüência adenoma-carcinoma. A DMH interfere, provavelmente, no processo de metilação do DNA via citocromo P450 (MONTROYA; WARGOVICH, 1997).

A DMH é a droga mais utilizada em experimentos que visam avaliar a formação de lesões pré-neoplásicas. Ela induz a proliferação de tumores no cólon em grande número, principalmente no sigmoide e reto, podendo, ocasionalmente, ocorrer ao redor da junção duodeno-jejunal (LARANGEIRA et al., 2006). Neoplasias no intestino delgado de ratos são raras, quando ocorrem, normalmente se situam próximo de locais de sutura ou porção

proximal do intestino delgado. Isto se deve provavelmente pelo fato do DMH alcançar o intestino pelo ducto biliar localizado 1 a 3 cm do piloro do rato (GLICK et al., 1984). A preferência pelo cólon é explicada pela proliferação celular mais intensa, induzida pela DMH, nesse local, principalmente no segmento distal do que no restante do intestino. Associa-se também deficiência nos mecanismos de reparo do DNA nesse segmento (MCGARRITY et al., 1988).

## **2.4 Estudos toxicológicos *in vivo***

A realização de experimentos usando animais tem contribuído para o desenvolvimento da ciência, dessa forma o interesse de centros de pesquisa e indústrias é grande e tem gerado movimento na economia. Em geral, a experimentação *in vivo* busca comprovar atividades específicas das substâncias de forma eficaz além de oferecer segurança ao consumidor por meio do controle de qualidade dos produtos.

Desde a antiguidade, o homem levado pela curiosidade tenta observar os mistérios do ambiente que o cerca. O estudo com animais é antigo e um dos primeiros registros de pesquisas com animais foi em 384 a.C. realizados por Aristóteles. O marco da utilização de animais em experimentos científicos foi no século XVIII quando Lavoisier, Claude Bernard e Louis Pasteur criaram o 1º Centro de Experimentação em Biologia e Medicina. A partir daí as práticas disseminaram por todo mundo, buscando aperfeiçoamento até os dias de hoje (RIVERA et al., 2002).

Vários órgãos são responsáveis pela legislação e fiscalização das substâncias ou alimentos que devem passar por testes *in vivo* antes de serem oferecidos aos consumidores em todo o mundo. No Brasil, a ANVISA é quem regulamenta esses testes e dentre todos os testes que são exigidos, vale destacar os toxicológicos, que são abordados neste trabalho.

A realização de testes toxicológicos *in vivo* serve para compreender melhor a anatomia, fisiologia e mecanismos do animal quando submetido a uma determinada substância teste de forma versátil. Para realizar com eficiência os testes é necessário que as condições experimentais sejam otimizadas. Esse processo é possível com a realização de experimentos pilotos buscando as melhores vias de aplicação das drogas/substância-teste, período experimental e tipo de animal a ser testado. A administração da droga/substância a ser testada mostra-se de grande importância, uma vez que o comportamento nutricional do animal

ao longo do experimento deve ser homogêneo. Outra preocupação é a do período de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação da droga/substância no animal, pois este determinará a eficiência do experimento (BRITO, 1994). Assim, a otimização dos parâmetros a serem aplicados no teste mostra-se importante uma vez que o sucesso no fim do experimento é diretamente dependente da homogeneidade no comportamento nutricional dos animais.

Os testes toxicológicos têm a finalidade de fornecer dados que possam ser utilizados para avaliação dos riscos do uso de substâncias químicas para o homem e, além disso, estabelecer limites de segurança quanto à exposição aos agentes químicos (BRITO, 1994). De acordo com a AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2010, a) esses testes podem ser:

- Agudo (dose única ou repetida) – mínimo 14 dias;
- Sub-crônica – 30 a 90 dias;
- Crônica – 4 meses a 1 ano;
- Teratogenicidade;
- Estudos comportamentais;
- Mutagenicidade/carcinogenicidade.

Dentre estes testes, os estudos de mutagenicidade/carcinogenicidade buscam compreender os mecanismos que participam do desenvolvimento de neoplasias malignas. Estas lesões podem ocorrer de forma espontânea ou ser induzidas por agentes físicos, químicos, biológicos ou genéticos. Quando lesões ou erros no DNA não são reparados podem causar eventos mutagênicos, e estes podem levar a um futuro câncer (RIBEIRO et al., 2003).

Vários estudos toxicológicos têm sido realizados com o café. Cada vez mais se busca conhecer melhor os efeitos mediante alterações no DNA. Dentre os vários tipos de estudos mutagênicos/carcinogênicos, alguns se encontram no Quadro 1.

Em animais existe um provável suporte para os efeitos quimiopreventivos do café, sendo que nos estudos crônicos conduzidos com roedores, a administração de café em altos níveis na dieta resulta na diminuição de tumores espontâneos situados em diferentes órgãos (CAVIN et al., 2002). Mecanismos subjacentes dos efeitos antitumorigênicos do café não são claros, pois o café contém componentes complexos, portanto, há apenas supostas evidências de que os efeitos podem ocorrer devido à atuação de alguns compostos, como: cafestol, kawool, cafeína, ácidos clorogênicos provocando inibição da carcinogênese (TAO et al., 2008).

Quadro 1 - Trabalhos envolvendo estudos toxicológicos *in vivo* com preparações a base de café ou outros princípios bioativos derivados de suas preparações.

Referência	Amostra em estudo	Doseamento	Preparo	Sistema teste
Abraham (1996)	Café torrado	5,0 mL liofilizado a 2,0% via gavagem	Infusão 1,0% (liofilizado)	Micronúcleo <i>in vivo</i>
Abraham et al. (1998)	Café instantâneo	10,0 mL liofilizado a 3,5% via gavagem	350,0 mg em água	Micronúcleo <i>in vivo</i>
Chinthalapally et al. (1998)	Café torrado e ração	1,0% de café incorporado a ração	100,0 g de ração + 1,0 g de café	Criptas <i>in vivo</i>
Duarte et al. (1999)	Café instantâneo e descafeinado	0 – 320,0 µL de café a 12,5%	6,25 g em água para 50,0 mL	Ames <i>in vivo</i>
Abraham; Sing (1999)	Café torrado, descafeinado, cafeína	10,0 mL de infuso a 2,0% e cafeína a 0,07%	0,2 g em água para 10,0 mL	Micronúcleo <i>in vivo</i>
Stopper; Abraham (2004)	Café torrado	15, 30, 60 e 125 µL da mistura	9,0 g de café em água para 150,0 mL	Micronúcleo e cometa <i>in vivo</i>
Oliveira (2007)	Café torrado	1,5% café incorporado na ração	Bebida 6,0% liofilizada	Câncer hepático
Wang et al (2008)	Cafeína e chá branco	Chá a 2,0% e cafeína a 0,065%	0,065 g de cafeína para 100,0 mL de água	Criptas <i>in vivo</i>
Cavin et al. (2002)	Cafestol e kahweol	0 a 6200 ppm	.*	Câncer hepático
Higgins et al. (2008)	Cafestol e kahweol	Mistura 1:1 e café 3,0 e 6,0%	Cafestol/ kahweol + ésteres ou 3/6,0 g de café para 100,0 mL de água	Eletroforese do fígado; Teste de luciferase <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>
Michels et al. (2005)	Café cafeinado/ descafeinado	0,5; 1; 2 – 3; 4 – 5; >5 copos por dia	.*	Estudo em humanos, consumo de café e câncer
Okamura et al. (2005)	Café torrado	~6% de café	8,0g de café para 140,0 mL de água	Células humanas com câncer <i>in vitro</i>

\*Tipo de preparo não citado nos textos originais; % = m/v.

Dessa forma, nota-se a importância da realização de testes toxicológicos em animais, para compreender melhor os possíveis efeitos benéficos das substâncias na saúde humana.

## 2.5 Modelos para avaliação de danos no DNA

### 2.5.1 Teste de Criptas Aberrantes (FCA)

As criptas são responsáveis pela absorção de nutrientes no intestino, portanto possuem contato direto com as substâncias que podem provocar alterações na estrutura do DNA da célula. As criptas aberrantes no cólon de roedores são lesões pré-neoplásicas, ou seja, alterações em fase inicial ocorridas nas criptas normais (Figura 5) e são consideradas como biomarcadores em testes de média duração para avaliação do potencial cancerígeno de agentes químicos, bem como para a identificação de quimioprotetores para o câncer (BIRD, 1995; HAMBLY et al., 1997; SCHMELZ et al., 2000).

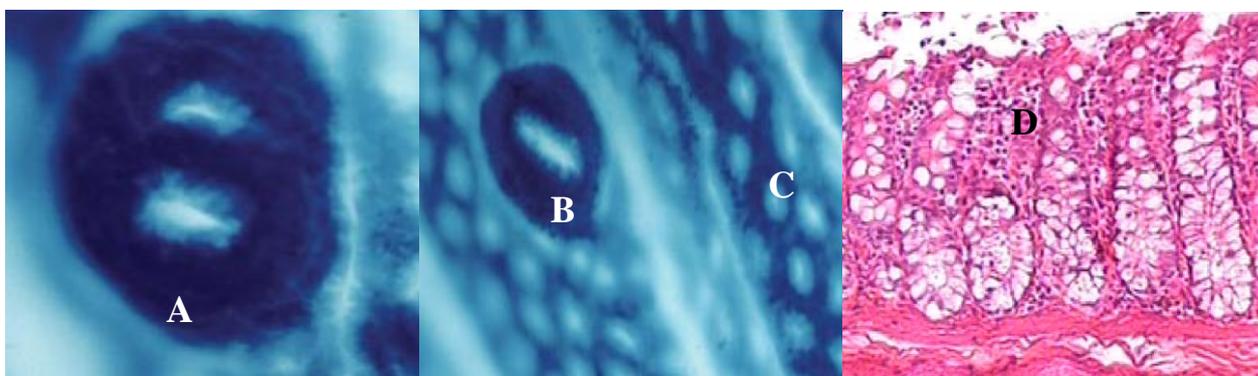


Figura 5 - (A) Fotografia de um campo com um foco com duas criptas aberrantes. (B) Fotografia de um o foco com uma cripta aberrante (C) Fotografia de criptas normais. (D) Corte transversal das criptas intestinais normais. FONTE: LIMA et al.,2005; BIRD, 1995.

O número de focos de criptas aberrantes (FCA) reflete, fenotipicamente, o número de lesões iniciais do processo cancerígeno da mucosa colônica, uma vez que existe uma relação entre a exposição ao cancerígeno e o número de FCA (MCLELLAN et al., 1991a, b). Por outro lado, é sugerido que os focos com maior número de criptas aberrantes possuam maior risco de se transformarem em neoplasia de cólon, pois refletem o processo de proliferação das lesões iniciais (SHIRTILIFF; BIRD, 1996). Desta maneira, o número de criptas por foco é um parâmetro que pode indicar, com certa precisão, o risco para o desenvolvimento tumoral (CORPET et al., 1990; PRETLOW et al., 1992).

Para o estudo de criptas aberrantes no cólon, geralmente, é empregado agentes indutores de lesões pré-neoplásicas, a DMH é a droga mais utilizada em experimentos que

visam avaliar esta formação, ocasionalmente, ocorrer ao redor da junção duodeno-jejunal (LARANGEIRA et al., 2006).

Modelos experimentais, utilizando cancerígenos químicos são adotados para estudar aspectos da oncogênese do cólon que não podem ser analisados em seres humanos. Além disso, os estudos experimentais permitem a observação detalhada das alterações que precedem o aparecimento da neoplasia maligna ao nível macroscópico e histológico. A administração destes cancerígenos aos roedores leva ao aparecimento de carcinomas no cólon, similares do ponto de vista macroscópico e histológico aos observados na espécie humana.

### 2.5.2 Focos Depletados de Mucina (FDM)

Através das análises de focos depletados de mucina (FDM) é possível verificar as lesões que realmente provocaram mudanças significativas na estrutura da célula, ou seja, ela detecta criptas que já tiveram sua mucina, glicoproteína que reveste e protege a cripta, depletada e dessa forma é possível verificar o efeito do produto com mais seletividade (Figura 6).

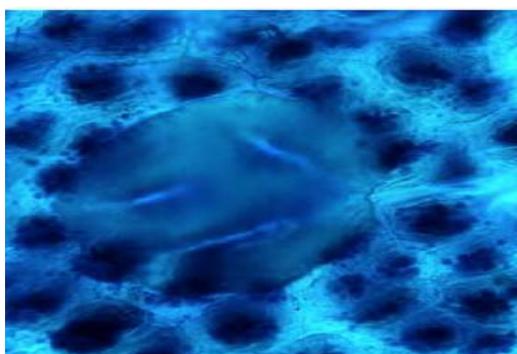


Figura 6 - Micrografia de um Foco Depletado de Mucina com três criptas.  
Fonte: DIAS et al., 2010.

No estudo realizado por Cardeni et al. (2003), usando a coloração de *high iron diamine-alcian blue* (HID-AB), a identificação de focos de criptas caracterizados pela depleção de mucinas foi possível, e essas lesões foram referidas como “focos depletados de mucina” (FDM). O experimento mostrou a existência de uma relação entre FDM e a carcinogênese do cólon e sugeriu que os FDM poderiam ser utilizados como biomarcadores da oncogênese do cólon. No ano seguinte, um estudo experimental mostrou que os FDM assim como os tumores induzidos no cólon eram modulados de acordo com uso de

promotores específicos ou quimioprotetores, e assim, essa lesão foi proposta como biomarcador em estudos de curta duração envolvendo a carcinogênese do cólon (FEMIA et al., 2004).

Pesquisas mostraram também que esse biomarcador é induzido de forma dose dependente pela DMH (droga indutora de lesões), aumentando de tamanho com o tempo. Ocorrem mutações no gene da  $\beta$ -catenina, assim como, alterações na localização celular da proteína, fenômenos considerados específicos no processo de múltiplas etapas da tumorigênese coloretal (FEMIA et al., 2004).

## 2.6 Estresse oxidativo e minerais

Muitos estudos estão sendo realizados com o intuito de melhor compreender os efeitos das substâncias antioxidantes na saúde humana, dessa forma o estudo de estresse oxidativo produzido por radicais livres, tem sido tema de diversos trabalhos. O termo radical livre refere-se a todo átomo ou molécula que contenham um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica e dentre eles destacam-se o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxil ( $\cdot OH$ ), peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ), alcoxil ( $RO^{\cdot}$ ) e o óxido nítrico ( $\cdot NO$ ) (FANG et al., 2002).

Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. Eles podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com seu sítio ativo de formação (GONSEBATT et al., 2009).

Suas concentrações são reguladas pela enzima superóxido dismutase que catalisa a dismutação do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ , esse mecanismo está detalhado na Figura 7. A atividade normal da cadeia de transporte de elétrons leva à formação de baixas quantidades de ânion superóxido ( $-O_2$ ) que, sob a ação da superóxido dismutase [SOD], dá origem ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esta última é convertida em água pela atuação da glutathiona peroxidase [GPx], através do consumo de duas moléculas de glutathiona reduzida [GSH], que são simultaneamente ligadas através de pontes dissulfeto, obtendo-se a forma oxidada da glutathiona [GSSG]. Para a continuidade do processo, a GSSG deve ser novamente convertida à GSH, através da atuação da glutathiona redutase [GR]. Assim, a eliminação de radicais livres

requer a ação consecutiva de diversas enzimas: SOD - dependente de cobre [Cu] e zinco [Zn], GPx - dependente de selênio [Se], e GR - dependente de flavina-adenina dinucleotídeo [FAD] (FANG et al., 2002).

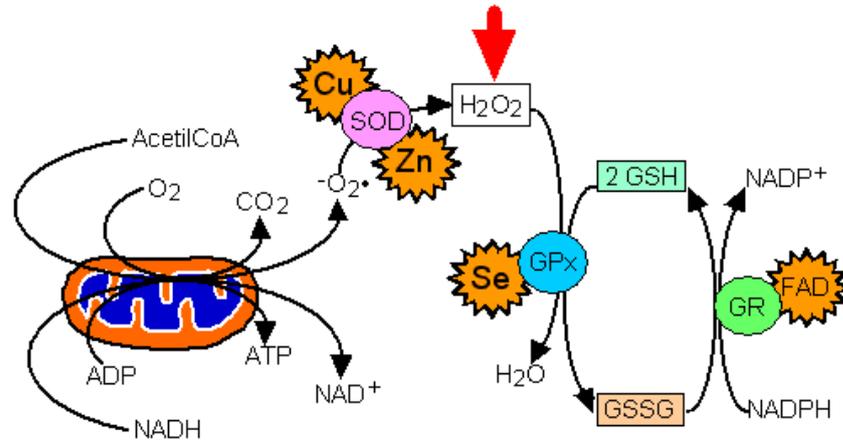


Figura 7 - Mecanismos mediadores da morte celular e estresse oxidativo; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutatona peroxidase; GSSG: glutatona oxidada; GSH: glutatona reduzida; GR: glutatona redutase. Fonte: UNIFESP, 2011.

Através da combinação de uma elevada produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e de uma ineficiente atividade do ciclo  $2\text{GSH} \rightleftharpoons \text{GSSG}$ , prevê-se um acúmulo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o que propiciará a ocorrência da reação de Fenton, também favorecida pelo aumento da disponibilidade de ferro solúvel ( $\text{Fe}^{+2}$ ) pela redução da capacidade de armazenamento do ferro ( $\text{Fe}^{+3}$ ) na ferritina

A formação do radical  $\text{OH}^{\bullet}$  a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  depende essencialmente da catálise de íons ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou cuprosos ( $\text{Cu}^+$ ) na reação de Fenton (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1992). As formas férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ou cúprica ( $\text{Cu}^{2+}$ ) não promovem diretamente a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{OH}^{\bullet}$ , mas podem ser diretamente reduzidas às formas iônicas catalíticas ao reagirem com radicais  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ( $k \sim 1,5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Estas duas reações podem ser acopladas à reação de Fenton, compondo a denominada reação de Haber-Weiss, processo mostrado abaixo na Figura 8.

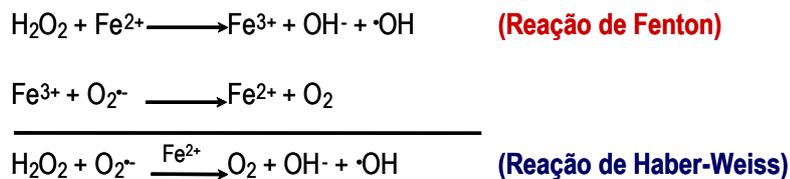


Figura 8 - Reação de Fenton, com redução dos cátions férricos por radical superóxido e reação de Haber-Weiss catalisada por íons ferrosos. Fonte: HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1992.

Segundo Halliwell e Gutteridge (1992), o combate aos radicais livres se dá por meio dos antioxidantes que podem ser produzidos pelo corpo ou absorvidos do alimento ingerido. Os antioxidantes são substâncias, que quando presente em baixa concentração comparada com o substrato oxidável regenera esse substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo.

O início da formação do tumor geralmente consiste numa alteração do DNA por metabólitos eletrofílicos ou oxidantes e, portanto, com alta capacidade de lesionar as moléculas de ácidos nucleicos, que podem ser combatidos por anticarcinogênicos/antioxidantes. Estes são agentes de bloqueio, inibindo a ação dos metabólitos e protegendo o DNA contra possíveis alterações (TAO et al., 2008).

Alguns estudos com ratos indicam que substâncias presentes no café como diterpenos, cafestol, kahweol, cafeína e ácidos clorogênicos possuem propriedades de agentes de bloqueio, induzindo a enzima glutathione S-transferase localizada no fígado e responsável pela detoxificação, inibir a ação de possíveis metabólitos evitando assim a ativação da carcinogênese (CAVIN et al., 2002).

Há uma grande relação na literatura do estresse oxidativo e das fases de iniciação e promoção do processo de carcinogênese. Além da ação das substâncias bioativas, os metais também participam dos processos antioxidantes, atuando juntamente com as enzimas antioxidantes, pois estas são dependentes de Cu, Fe, Se e Zn, antagonizando o processo da carcinogênese estando presentes em baixos níveis nas células tumorais (GRIGOLO et al., 1998), possuem também atividades de sinalização, expressão gênica e catálise durante as reações. Alguns minerais possuem atividades mais específicas como os metais de transição (Cu, Fe, Se e Zn) que podem ser cofatores enzimáticos ou catalisadores em reações citotóxicas, controladas por atividades intracelulares de famílias de proteínas. Esses metais intracelulares contribuem para a atividade protéica quando presente no centro das moléculas longas (metaloenzimas) com atividades enzimáticas (SPUNAR, 2004).

O Cu e Fe, por exemplo, são transportados, utilizados e estocados ligados a proteínas específicas como ceruloplasmina, ferritina e transferrina, as quais previnem ou minimizam as reações catalisadas por estes minerais. O Se e Zn também estão envolvidos em mecanismos celulares de defesa e tem sido demonstrado que as enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase, dependentes desses minerais antagonizam processos de carcinogênese (GRIGOLO et al., 1998; ALFIERI et al., 1998; WELCH et al., 2002). Entretanto, segundo Birt (1986), estudos mostraram que a suplementação desses minerais “antioxidantes” pode aumentar os

processos de carcinogênese, sendo assim recomenda-se cautela na administração para os seres humanos.

De modo geral, a participação de metais, ao contrário dos compostos bioativos, pode ter efeitos negativos nas reações celulares, pois os metais possuem fatores bioacumulativos, que provocam alterações significativas no fígado de animais. Por recomendações nutricionais é necessária ingestão moderada de alguns metais como Co, Fe, Zn e Mo para o bom desenvolvimento e manutenção do organismo, sendo que uma longa ingestão de alimentos que contem esses metais pode causar distúrbios no metabolismo (REGLERO et al., 2009).

## **2.7 Parâmetros bioquímicos**

As análises de parâmetros bioquímicos são utilizadas para direcionar um caso clínico, podendo: confirmar uma suspeita clínica, excluir um diagnóstico, auxiliar na seleção, otimização e monitoramento de um determinado tratamento, fornecer um prognóstico ou fazer uma triagem para doença na ausência de sinais ou sintomas clínicos. Além disso, pode ser usado para estabelecer e monitorar a gravidade de um distúrbio fisiológico. Dentre os parâmetros comumente analisados a avaliação dos níveis de uréia, creatinina, colesterol, triglicérides, glicose, AST e ALT presentes no plasma são utilizados para avaliar alterações que podem ser provocadas por fatores endógenos ou exógenos, permitindo monitorar a função renal, hepática e efeitos cardiovasculares.

O colesterol é encontrado quase exclusivamente em animais e é um componente essencial da membrana de todas as células, é principalmente composto de C-H e, portanto quase não é solúvel em água. Entretanto, ele contém um grupo hidroxil (OH) polar em seu anel sendo assim considerando uma molécula tanto polar como não polar conhecida como anfipática (BURTIS et al., 2008). A concentração de colesterol plasmático é influenciada por caracteres hereditários, função endócrina, nutrição e integridade dos órgãos vitais como fígado e rins. Numerosas investigações confirmam a relação entre o colesterol total plasmático e a evolução da doença coronária aterosclerótica (CHRISTENSEN et al., 2001; RAMOS, 2007).

Os triglicerídeos também fazem parte da fração lipídica sanguínea, sendo um composto orgânico que consiste em até três moléculas de ácidos graxos esterificados ao glicerol. Processos de triagem para a dosagem de triglicerídeos e colesterol têm grande

importância na classificação e fenotipagem das dislipidemias. São verificados valores alterados de triglicérides em várias patologias como no diabetes, doenças cardiovasculares, pancreatite, hipotireoidismo, alcoolismo crônico (RIFAI et al., 2008; S´CIBIOR et al., 2006).

A creatinina e a uréia são metabólitos nitrogenados não protéicos depurados do corpo através do rim após a filtração glomerular. As dosagens do teor destes metabólitos são usadas como indicadores principalmente da função renal. A uréia ( $\text{CO}[\text{NH}_2]_2$ ), principal produto do catabolismo das proteínas e aminoácidos, contribuindo para mais de 75% do nitrogênio não protéico eventualmente excretado, fazendo parte do ciclo metabólico da uréia. Este composto tem sua concentração sérica afetada pela dieta e pelo estado de hidratação do indivíduo, e altos teores de uréia são encontrados quando há ocorrência de disfunções renais reduzindo a filtração glomerular (LAMB et al., 2008; SILVA et al., 2006).

A creatinina é um anidrido cíclico da creatina que é gerado como produto final da decomposição da fosfocreatina. A determinação dos níveis de creatinina plasmática e de depuração renal são usadas como indicadores diagnósticos da função renal, estando diretamente ligados redução da filtração glomerular (FILHO et al., 2002; LAMB et al., 2008).

Outro composto muito importante no metabolismo animal é a glicose. Ela é um carboidrato simples de seis carbonos que é o principal combustível para a maioria dos organismos e um importante precursor de outros constituintes corporais. Seu controle é realizado pela ação de diversos hormônios, especialmente da insulina, que mantém os teores em equilíbrio. Alterações hormonais e outros fatores levam a variações desencadeando hiper ou hipoglicemia. Essas variações na maioria das vezes são de origem alimentar ou em consequência de alguma patologia como o diabetes mellitus (HYON; GARY, 2007; SAKS; PATH, 2008).

As atividades das enzimas Aspartato Amino Transferase (AST) e Aspartato Amino Transferase (ALT) também são usados na química clínica. As aminotranferases constituem num grupo de enzimas que cataliza a interconversão de aminoácidos a 2-oxiácidos pela transferência de grupos amino. Na maioria dos tipos de doenças hepáticas, a atividade da ALT é maior do que a de AST. Na hepatite viral e em outras formas de doenças hepáticas associadas com necrose aguda, as concentrações séricas de AST e ALT estão elevadas mesmo antes que os sinais clínicos e os sintomas da doença (RAMOS, 2007; PANTEGHINI; BAIS, 2008).

Muitos estudos são realizados relacionando o café e possíveis alterações nestes parâmetros. As presenças de altas concentrações de compostos tóxicos no café proveniente do processamento ou manejo realizado podem provocar alterações no metabolismo do animal e

uma longa ingestão pode causar disfunções nos órgãos fazendo com que ocorra alteração significativa nos parâmetros bioquímicos.

Estudos observaram, por exemplo, que a ingestão de café reduz os níveis de colesterol plasmático. As causas dessas alterações são atribuídas a vários fatores como a presença de compostos bioativos, variação no metabolismo do animal e teores administrados durante o período de experimentação (URGERT; KATAN, 1997; CHISTTENSEN et al., 2001). Segundo Duarte et al. (2009) o café na forma de infuso reduziu os níveis das frações lipídicas analisadas, sendo um alimento bioativo e contribuir para a prevenção de doenças cardiovasculares como a arteriosclerose.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

A proposta deste trabalho consistiu em avaliar a composição química das amostras de café orgânico e convencional, além dos seus efeitos anticarcinogênico/carcinogênico, antioxidantes e das suas repercussões sobre a composição mineral hepática, *in vivo*.

#### 3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste projeto compõem-se das seguintes etapas:

- Analisar os teores de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em extratos metanólicos e infusos de café orgânico e convencional;
- Analisar os teores de Cu, Fe e Zn das amostras de pó de café e infusos de ambos os manejos;
- Verificar o possível efeito protetor/indutor de café orgânico e convencional sobre lesões pré-neoplásicas em cólon de ratos;
- Verificar o efeito antioxidante do café orgânico e convencional no fígado;
- Analisar os teores de Cu, Fe e Zn no fígado de ratos alimentados com pó de café e infusos de ambos os manejos;

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

Para atingir os objetivos do trabalho realizaram-se análises morfológicas, químicas e bioquímicas. Para essa finalidade foram conduzidos dois delineamentos. No delineamento um, verificou-se a melhor forma de aplicação do café (na bebida ou incorporado a ração) e as concentrações possíveis de serem empregadas no experimento animal de doze semanas. Nesse primeiro delineamento foram utilizadas as infusões a 1, 2, 3, 6 e 12% (m/v) e rações incorporadas com infusos a 3,2; 10 e 40 % (m/v).

Para o segundo delineamento foram incorporados à ração os infusos de café a 5, 10 e 20% (m/v) e pó de café a 4% (m/m). Todas as rações foram previamente peletizadas e sua composição centesimal e de minerais analisadas. Esse delineamento foi realizado para o estudo dos efeitos protetores e lesivos dos cafés orgânico e convencional em ratos durante doze semanas. Para essa finalidade foram realizadas as análises no cólon, de lesões pré-neoplásicas (FCA e FDM), e no fígado de estresse oxidativo (MDA e PCO) e composição mineral (Cu, Fe e Zn). Também foram realizadas análises dos parâmetros bioquímicos (uréia, creatinina, colesterol, triglicérides, glicose, ALT e AST) no plasma, as quais respaldaram a saúde dos animais.

As análises químicas do café orgânico e convencional foram realizadas para avaliar as diferenças entre os manejos. Dentre elas têm-se: composição de ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina, Cu, Fe e Zn. O teor desses compostos foram analisados nos infusos (5, 10 e 20 % m/v) e nos pós utilizados no delineamento experimental dois, para melhor compreensão do que foi oferecido aos animais.

### 4.1 Equipamentos e reagentes

Todos os reagentes usados são de grau analítico, sendo as soluções preparadas com água deionizada. Os seguintes equipamentos e reagentes foram utilizados para o desenvolvimento desta parte do trabalho:

- Espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU® AA-6800 com atomização em chama;
- Balança analítica SHIMADZU® AY220;

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), SHIMADZU®;
- Micro-ondas MILLESTONE - ETHOS PLUS®;
- Sistema deionizador Milli-Q, Millipore®, Brasil;
- Chapa de aquecimento convencional Marconi® MA-085;
- Bomba a vácuo EXIPUMP®;
- Semimicro Kjeldhal com Destilador de Nitrogênio MA-036 Marconi®;
- Soxhlet extrator de óleos e gorduras MA-044/8/50 Marconi®;
- Mufla Q-318M25T Quimis®;
- Zn – Solução Padrão,  $1000 \pm 2 \text{ mg.L}^{-1}$ , (Merk);
- Cloreto Férrico Hexahidratado 97-102%,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  MM=270,30  $\text{g.mol}^{-1}$  (Vetec Química Fina LTDA);
- Sulfato de Cobre II 97%,  $\text{CuSO}_4$  MM=159,61  $\text{g.mol}^{-1}$  (Vetec Química Fina LTDA);
- Peróxido de Hidrogênio 30%,  $\text{H}_2\text{O}_2$  MM=34,02  $\text{g.mol}^{-1}$  (Vetec Química Fina LTDA);
- Ácido Nítrico 65%,  $\text{HNO}_3$  MM= 63,01  $\text{g.mol}^{-1}$  (Sigma-Aldrich);
- Éter de Petróleo, 30-60° (Vetec Química Fina LTDA);
- Sulfato de cobre pentahidratado,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , M.M.=249,68  $\text{g.mol}^{-1}$  (Labsynth);
- Sulfato de potássio anidro,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , M.M.= 174,27  $\text{g.mol}^{-1}$  (Dinamica química LTDA.);
- Ácido sulfúrico;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  M.M.=98,08  $\text{g.mol}^{-1}$  (Labsynth);
- Ácido bórico,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , M.M. 61,83  $\text{g.mol}^{-1}$  (Dinamica química LTDA.);
- Hidróxido de sódio;  $\text{NaOH}$ , M.M.= 40,0  $\text{g.mol}^{-1}$  (Dinamica química LTDA.);
- Indicadores: vermelho de metila e verde de bromocresol (solução alcoólica);
- Ácido clorídrico,  $\text{HCl}$ , M.M.= 35,5  $\text{g.mol}^{-1}$  (Labsynth);
- Acetonitrila, 100%,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , M.M.= 41,0  $\text{g.mol}^{-1}$  (J.T.Baker);
- Ácidos clorogênicos,  $\geq 95\%$ ,  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ , M.M.= 354,31  $\text{g.mol}^{-1}$  (Sigma-aldrich);
- Cafeína, 99%,  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$ , M.M.= 194,19  $\text{g.mol}^{-1}$  (Sigma-aldrich);
- Hidrocloridrato de trigonelina,  $\geq 95\%$   $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$ , M.M.= 173.60 (Sigma-aldrich);
- Peletizadora Indústria e Comércio Chavantes® modelo 7.5 HP;
- Moinho martelo de fabricação artesanal;
- Analisador de Umidade por Infravermelho Gehara® IV-2000;
- Secadora vertical de fabricação artesanal;
- Ração comercial Nuvilab CR-1 Nuvital®;

- Dihidrocloridrato de 1,2-dimetilhidrazina, 99,0%,  $C_2H_8N_2 \cdot 2HCl$ , M.M. =  $133,02 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Sigma-Aldrich);
- EDTA sal dissódico,  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ , M.M.:  $372,24 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Synth);
- Solução de NaCl 0,9% (FARMAX);
- Microscópio NIKON AXIOPHOT<sup>®</sup>;
- Eosina - Azul de metileno em solução  $0,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (Merck);
- Ácido acético,  $CH_3COOH$ , M.M.=  $60,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Dinâmica reagentes analíticos LTDA.);
- Formol 40% (Dinâmica reagentes analíticos Ltda);
- Azul de toluidina (Merck);
- Banho-maria MARCONI<sup>®</sup> TE127, TECNAL;
- Espectrofotômetro BIOCHROM<sup>®</sup> LIBRA 522;
- Balança analítica KERN<sup>®</sup> 410;
- Centrífuga QUIMIS<sup>®</sup> 0222 TM216;
- Espectrômetro de Fluorescência VARIAN<sup>®</sup> ACRY ECLIPSE;
- 2,4-dinitrofenilhidrazina,  $C_6H_6N_4O_4$ , M.M.= $198,14 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Dinâmica reagentes analíticos);
- Ácido tricloroacético (TCA), 99%,  $CCl_3COOH$ , M.M.=  $163,39 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Vetec indústria química);
- Álcool etílico 99,5%,  $C_2H_5OH$ , M.M.=  $74,12 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Proquimis);
- Acetato de etila,  $C_4H_8O_2$ , M.M.=  $86,1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Proquimis);
- Cloridrato de guanidina, 98,0%,  $CH_5N_3 \cdot HCl$ , M.M.=  $95,53 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Acros organics0);
- Fosfato monobásico anidro, 98-102%,  $NaH_2PO_4$ , M.M.=  $119,98 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Neon comercial LTDA.);
- Fosfato dibásico anidro, 99%,  $Na_2HPO_4$ , M.M.=  $141,96 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Dinâmica reagentes analíticos);
- Ácido fosfórico, 85%,  $H_3PO_4$ , M.M.= $98,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Merk);
- Comassie Brilliant Blue (Sigma);
- Albumina sérica, 96-100% (Acros Organics);
- Ácido tiobarbitúrico (TBA), 98%, M.M.=  $144,1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Sigma);
- Hidróxido de sódio, 97%, NaOH, M.M.=  $40 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Vetec);
- Metanol °HPLC, 100%,  $CH_3OH$ , M.M.=  $32,04 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (J.T.Baker);
- Metanol, 99%,  $CH_3OH$ , M.M.=  $32,04 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Vetec);

- 1,1,3,3-tetrametoxipropanol (TEP), 99%,  $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$ , M.M.= 164,20 g.mol<sup>-1</sup> (Aldrich);
- Kit enzimático BIOCLIN (Quimbasa química básica LTDA.);

## 4.2 Obtenção das amostras de café

As amostras de café torrado e moído utilizadas no presente trabalho são de boa qualidade, devidamente beneficiadas para distribuição comercial e embaladas sob alto vácuo. Ambos são da variedade Catuaí vermelho Safra 2008/2009, torra média (Agtron # 45) com uma temperatura de torra inicial de 200 ° C, e uma temperatura final de 215 ° C, durante um tempo de 15 minutos de torra. As amostras orgânicas e convencionais foram fornecidas pela Associação dos Pequenos Produtores de Poço Fundo - COOPFAM, Poço Fundo, Minas Gerais, Brasil. O café orgânico é certificado (BCS - OKO Garantie Master Certificados n ° POCO-7569/07.08/14291-BR) e sua adubação foi feita com farelo de mamona micro-nutrientes, já o café convencional utilizou o fertilizante NPK 20-05-20.

## 4.3 Preparo dos infusos e rações modificadas

O preparo dos infusos utilizados para produção das rações modificadas utilizadas nos delineamentos experimentais (Item 3.4) foi realizado seguindo uma proporção variável em percentual massa/volume (% m/v), ou seja, massa de café torrado e moído para volume de água aquecida a 90°C, essa mistura passou por agitação e em seguida filtração a vácuo (VITORINO et al., 2001). Para realização do delineamento experimental 1, foram preparados infusos de café convencional em concentrações de 3,2; 10 e 40 % (m/v). Para o delineamento experimental 2, foram preparados infusos de café orgânico e convencional em concentrações 5, 10 e 20% (m/v). As concentrações das infusões utilizadas no delineamento experimental 2 foram escolhidas de acordo com o consumo médio humano de 10% (m/v) sendo que foram analisados esse teor, a metade (5% m/v) e o dobro (20% m/v) (DUARTE et al., 2009).

Para o preparo das rações modificadas com café, a ração comercial foi triturada em moinho martelo, seguida pela incorporação dos infusos ao farelo por diluição geométrica,

adicionando 100 mL de infuso para cada quilograma de ração moída. No caso da incorporação do pó de café a ração, adicionou-se 100 mL de água para cada quilograma de ração moída. Este volume de líquido foi padronizado para obtenção de uma ração com umidade não superior a 20% e para uma boa peletização. A peletização foi realizada em peletizadora industrial e após esta etapa, passou por um processo de secagem em secadora vertical. As rações modificadas foram armazenadas em freezer a -18°C até utilização.

#### **4.4 Composição centesimal**

As análises de composição centesimal do pó de café orgânico e convencional, infusos e rações modificadas e comercial foram realizadas no Laboratório de Avaliação Nutricional e Toxicológica *in vivo* (LANT*in*) da Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG.

Para a determinação da umidade dos infusos utilizou secagem em estufa a 105°C até peso constante. Foi realizada dessecação por infravermelho a 120°C por oito minutos para a determinação de umidade do pó de café e das rações modificadas e comercial. Para o teor protéico total aplicou-se o método de semimicro Kjeldhal. Lipídeos totais foram determinados pelo método de Blight-Dyer. A incineração em mufla a 550°C forneceu o teor de cinzas. Por diferença percentual dos demais nutrientes obteve-se o teor de carboidratos (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 2000).

#### **4.5 Delineamentos experimentais**

Os delineamentos foram aplicados em ratos machos albinos *Wistar* (S.P.F.) seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) certificado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Unifal-MG (CEUA), Protocolo: 235/09. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram sob condições controladas, com temperatura de 22° C ( $\pm$  3° C); umidade relativa do ar de 50% ( $\pm$  20%) e um ciclo de luz 12h claro/12h escuro.

#### 4.5.1 Delineamento experimental 1

Para realização do delineamento experimental 1 foram utilizados ratos *Wistar* (S.P.F.), machos de 21 dias de idade com período de aclimação de duas semanas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG. Os animais receberam ração e água filtrada *ad libitum*. Utilizou-se 60 animais distribuídos em 10 grupos (n=6) mostrados no delineamento da Tabela 1.

Tabela 1 - Delineamento experimental 1.

<b>Grupo/ Tratamento</b>	<b>Nº de animais</b>	<b>Bebida</b>	<b>Ração</b>
Controle 1	6	Água filtrada	Comercial
T1	6	Infuso 1%	Comercial
T2	6	Infuso 2%	Comercial
T3	6	Infuso 3%	Comercial
T4	6	Infuso 6%	Comercial
T5	6	Infuso 12%	Comercial
Controle 2	6	Água filtrada	Comercial
T6	6	Água filtrada	Ração 3,2%*
T7	6	Água filtrada	Ração 10%
T8	6	Água filtrada	Ração 40%

\*considerando o infuso incorporado a ração comercial (incorporação 100 mL infuso/kg ração).

De acordo com o delineamento têm-se dois grupos Controle 1 e 2 que receberam apenas água filtrada e ração comercial, cinco grupos que receberam infusos de café a 1; 2; 3; 6 e 12 % (m/v), oferecidos diretamente nos bebedouros como única fonte de hidratação e três grupos que receberam rações incorporadas com infusos a 3,2; 10 e 40% (m/v). Durante o período oito semanas de experimentação os animais foram monitorados avaliando massa corpórea e consumo de infusão e não foi aplicado nenhum tipo de droga. A troca das caixas foi realizada periodicamente. A limpeza e troca dos bebedouros foram realizadas a cada dois dias.

#### 4.5.2 Delineamento experimental 2

Para realização do delineamento experimental 2 foram utilizados ratos *Wistar* (S.P.F.), machos de 21 dias de idade com período de aclimação de duas semanas, fornecidos pelo CEMIB/UNICAMP. Os animais receberam ração e água filtrada *ad libitum*. Utilizou-se 140 animais distribuídos em 14 grupos (n=10) mostrados no delineamento da Tabela 2.

Tabela 2 - Delineamento experimental 2.

<b>Grupo/ Tratamento</b>	<b>Nº de animais</b>	<b>Reagente</b>	<b>Café</b>	<b>Ração</b>
G1/comercial	10	DMH*	-	RC***
G2/orgânico	10	DMH	Infuso 5%	RCO 5%****
G3/orgânico	10	DMH	Infuso 10%	RCO 10%
G4/orgânico	10	DMH	Infuso 20%	RCO 20%
G5/orgânico	10	DMH	Pó de café	RCO 4%
G6/convencional	10	DMH	Infuso 5%	RCC 5%
G7/convencional	10	DMH	Infuso 10%	RCC 10%
G8/convencional	10	DMH	Infuso 20%	RCC 20%
G9/convencional	10	DMH	Pó de café	RCC 4%
G10/comercial	10	EDTA**	-	RC
G11/orgânico	10	EDTA	Infuso 20%	RCO 20%
G12/orgânico	10	EDTA	Pó de café	RCO 4%
G13/convencional	10	EDTA	Infuso 20%	RCC 20%
G14/convencional	10	EDTA	Pó de café	RCC 4%

\*DMH= 1,2-dimetilhidrazina (40mg. Kg<sup>-1</sup> p.c.), agente indutor de lesões pré-neoplásicas no cólon.

\*\*EDTA 1,5 % em NaCl 0,9% (veículo)

\*\*\*RC= ração com comercial; RCO= ração com café orgânico; RCC= ração com café convencional

\*\*\*\*considerando o infuso incorporado a ração comercial (incorporação 100 mL infuso/kg ração).

O delineamento experimental 2 possui catorze grupos sendo que nove grupos receberam injeções de DMH para indução de lesões pré-neoplásicas no cólon (estudo protetor) e os demais grupos receberam EDTA (estudo lesivo). O grupo G1 foi o controle positivo e G10 o controle negativo, quanto aos demais, utilizou-se os grupos G2, G3, G4 e G5 para a análise do potencial protetor do café orgânico e os grupos G6, G7, G8 e G9 para a análise do potencial protetor do café convencional. Para avaliação do efeito lesivo têm-se os grupos G11 e G12 que receberam café orgânico, G13 e G14 que receberam café convencional.

O experimento teve duração de doze semanas, na 2ª e 3ª semana de experimento, duas vezes por semana, os animais do estudo lesivo receberam injeções subcutânea de solução

1,5% de EDTA preparada em solução de NaCl 0,9%. Os animais do estudo protetor receberam injeções subcutânea de DMH na dose de  $40 \text{ mg.kg}^{-1} \cdot \text{pc}^{-1}$  (totalizando  $160 \text{ mg/kg p.c.}$ ). Estas foram fornecidas considerando-se a proporção de 1,0 mL de solução para cada 100g do animal (DIAS et al., 2006).

No final da 12<sup>a</sup> semana, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta do sangue, fígado e cólon para as análises. O sangue coletado foi imediatamente centrifugado, sendo o plasma armazenado. Os fígados coletados para análises de minerais foram armazenados em tubos previamente descontaminados. Para as análises de estresse oxidativo os fígados foram submetidos à perfusão com NaCl 0,9% e também armazenados. Todos os tubos foram devidamente rotulados e estocados em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  até análise.

Os cólons foram retirados em sua totalidade, fixados em placas de isopor e armazenados em recipientes contendo formol 10% (v/v) durante 24 horas, no fim desse período foram transferidos para recipientes com solução de álcool 70% (v/v) até análise, não havendo necessidade de processamento do material e inclusão em parafina.

#### **4.6 Determinação de Cu, Fe e Zn**

As análises de Cu, Fe e Zn foram realizadas no Laboratório de Química Analítica da Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG.

Para análise dos minerais das amostras de pó e infusos de café torrado e moído derivadas dos dois manejos, rações e fígados foi aplicado o método de digestão por micro-ondas. A quantidade de amostras, reagentes utilizados e a programação do micro-ondas está detalhada nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Antes da etapa de digestão, os infusos preparados segundo Item 4.3, tiveram seu volume reduzido a  $\frac{1}{4}$  do volume inicial em chapa de aquecimento devido ao baixo teor dos minerais presentes na amostra. Os fígados foram descongelados, homogeneizados e secos. As rações e fígados foram secos em estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  até atingirem peso constante, a umidade foi calculada para aplicação aos resultados.

Depois de encerrado o período de aquecimento, as amostras foram resfriadas. A solução obtida foi vertida em balões volumétricos de 25 mL, completada com água deionizada e em seguidas filtradas. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

Tabela 3 - Quantidade de amostras e reagentes adicionados para o processo de digestão.

<b>Amostras*</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>HNO<sub>3</sub> (mL)</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mL)</b>	<b>Referências</b>
Pó de café	0,3	7,0	1,0	Korn et al., 2009
Infusos (reduzidos)	2,0	5,0	1,0	Jorhem et al., 2000.
Rações e fígados (secos)	0,3	6,0	2,0	Jorhem et al., 2000

\*Todas as amostras ficaram por 30 minutos em pré-digestão.

Tabela 4 - Programa de digestão do micro-ondas para pó de café torrado e moído, infusos, rações modificadas e fígados.

<b>Amostras</b>	<b>Etapas</b>	<b>Tempo (min.)</b>	<b>Potencia (W)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Referências</b>
Pó de café	1	5	750	120	Korn et al., 2009
	2	3	750	120	
	3	10	750	210	
	4	15	750	210	
Infusos (reduzidos)	1	5	400	80	Jorhem et al., 2000.
	2	5	400	120	
	3	5	400	210	
Rações e Fígados (secos)	1	3	250	125	Jorhem et al., 2000
	2	5	630	125	
	3	22	500	125	
	4	15	0	125	

Os analitos Cu, Fe e Zn foram determinados em espectrômetro de absorção atômica com atomização em chama (FAAS). Para o preparo dos padrões todos os sais foram secos em estufa a 105°C por 12h e resfriados em dessecador. As concentrações dos padrões utilizados para Cu e Zn foram de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L<sup>-1</sup>; para o Fe foi de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mg.L<sup>-1</sup>. Para verificar a exatidão da metodologia empregada foi realizado teste de adição e recuperação nas amostras de pó de café e infusos 10 e 20% orgânico e convencional, fígados e rações moficadas adicionando quantidade de padrão suficiente para 1,0 mg.L<sup>-1</sup>.

#### 4.7 Determinação de compostos orgânicos

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Alfenas. Realizou-se análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), para

determinar o teor de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em infusos a 10% (m/v) e extrato metanólico de café orgânico e convencional.

Os infusos foram preparados adicionando 10 g de pó de café em 100 mL de água aquecida a 90 ° C. A mistura foi homogeneizada e filtrada a vácuo com papel de filtro qualitativo, o filtrado foi liofilizado. Para obter o extrato metanólico, 1 g de pó de café foi levado a refluxo com 4,0 ml de metanol por 2 hs ( $5,0 \pm 2,0$  ° C), em seguida filtrado e exposto à temperatura ambiente até evaporação completa do solvente. As amostras e os padrões de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina foram dissolvidas em metanol °HPLC obtendo concentração de  $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

A análise foi realizada em um cromatógrafo SHIMADZU modelo PROMINENCE acoplado a um detector espectrofotométrico UV/Vis modelo SPD-M20A, uma bomba injetora SIL-20A e uma coluna C-18 de 25 cm. A fase móvel consistiu de H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>COOH (95/5, v/v) (A) e acetonitrila (B), utilizando eluição gradiente de A/B: 0 min 95/5, 5 min 95/5, 10 min 87/13, com um fluxo de  $0,7 \text{ ml.min}^{-1}$ . Detecção do sinal de UV / Vis foi programada da seguinte forma: 0-15 min 272 nm, 15-23 min 320 nm e 23-40 min 272 nm (ALVES et al., 2006).

#### **4.8 Teste de Criptas Aberrantes (FCA) e Focos Depletados/Reduzidos de Mucina (FDM/FRM)**

O teste de criptas aberrantes e focos depletados de mucina foram realizadas no Laboratório de Avaliação Nutricional e Toxicológica *in vivo* (LANTin) da Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG.

A identificação das criptas aberrantes segue o método proposto por BIRD (1987), que consiste da análise microscópica (40x) da mucosa do cólon de rato, corada com azul de metileno. A observação é feita diretamente no tecido distendido sobre uma lâmina de vidro. As criptas aberrantes são identificadas por seu tamanho aumentado, aspecto mais escuro, abertura luminal variando desde circular até alongada ou tortuosa, e pela camada de células epiteliais mais espessas em relação às normais circunvizinhas. O número total de focos de criptas aberrantes, o número de criptas aberrantes por foco e a relação criptas/foco, nos diferentes grupos foram analisados (DIAS et al., 2006).

Após realizar o teste de criptas aberrantes os cólons foram armazenados em solução de álcool 70% (v/v) até retirada do corante azul de metileno para prosseguir a análise de FDM. Para a análise de FDM, os cólons foram colocados em solução de ácido acético 3,0 % (v/v), por três minutos e em seguida corados com azul de toluidina 1,0 % (v/v) em solução de ácido acético 3% (v/v) (pH=2,5) por 5 minutos (DIAS et al., 2010). Após a coloração, foram levados ao microscópio a fim de determinar a ocorrência de focos depletados de mucina e focos reduzidos de mucina por análise microscópica (40x).

## **4.9 Extresse oxidativo**

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Universidade federal de Alfenas, Alfenas, MG.

### *4.9.1 Estimativa de Proteínas*

A concentração protéica total presente nos homogeneizados hepáticos foi expressa utilizando albumina de soro bovino como padrão. Para isso, fez-se uma curva analítica de calibração sendo  $800 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a maior concentração utilizada. Após compor as cubetas foi medida a absorvância das amostras em 595 nm, usando espectrofotômetro UV-Vis. Execução em triplicata (BRADFORD, 1976).

### *4.9.2 Oxidação Protéica*

Para a determinação de danos oxidativos em estruturas protéicas utilizou-se a técnica de espectrofotometria. O fígado foi homogeneizado em tampão fosfato pH=7,0 na proporção de 1:5, em seguida passou por centrifugação por 5 minutos a 3500 rpm.

Adicionou-se em um tubo de ensaio 25  $\mu\text{L}$  de sobrenadante e 25  $\mu\text{L}$  de 2,4-dinitrofenilhidrazina ( $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) preparada previamente em solução de HCl ( $2 \text{ mol.L}^{-1}$ ),

após agitar a mistura esta foi incubada por uma hora ao abrigo da luz e em seguida adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (20%). Adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  da mistura etanol e acetato de etila (1:1) e após centrifugação o sobrenadante foi descartado, esse processo foi repetido por duas vezes sempre descartando o sobrenadante. Após este processo adicionou-se ao precipitado 500  $\mu\text{L}$  de hidrocloreto de guanidina ( $6,0 \text{ mol.L}^{-1}$ ).

Realizou-se leitura em espectrofotômetro a 370 nm da mistura de 300  $\mu\text{L}$  de amostra preparada anteriormente e 700  $\mu\text{L}$  de água destilada. O branco foi realizado adicionando 300  $\mu\text{L}$  de hidrocloreto de guanidina ( $6,0 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e 700  $\mu\text{L}$  de água destilada. As leituras foram realizadas em triplicata (EYMARD et al., 2009). A determinação seguiu a Lei de Beer, aplicando a formula:  $A = a \cdot b \cdot c$ , sendo, “A” a absorbância, “a” a absortividade ( $22000 \text{ M.cm}^{-1}$ ), “b” o caminho optico (1 cm) e “c” a concentração.

#### 4.9.3 Peroxidação Lipídica

A análise de peróxidação lipídica foi realizada medindo concentração de malonaldeído (MDA) em Espectrofluorímetro. O fígado foi homogeneizado em tampão fosfato pH=7,0 na proporção de 1:5, em seguida o homogeneizado foi centrifugado por 5 minutos a 3500rpm.

Agitou-se por 30” a mistura de 200  $\mu\text{L}$  de sobrenadante/padrão, 1000  $\mu\text{L}$  de ácido fosfórico ( $1,22 \text{ mol.L}^{-1}$ ), 1800  $\mu\text{L}$  de água deionizada e 1000  $\mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico (0,67%) preparado em ácido acético e água (1:1). A reação foi incubada por uma hora em banho-maria a  $95^{\circ}\text{C}$  e em seguida resfriada em banho de gelo a  $4^{\circ}\text{C}$  (BROWN et al., 1996).

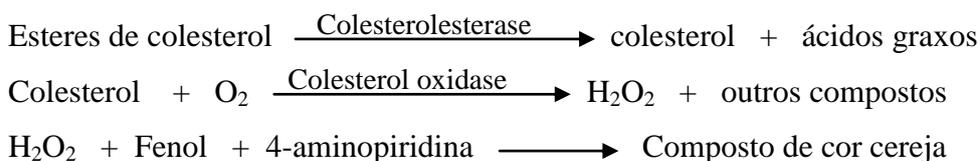
Para a leitura da amostra/padrão adicionou-se a 1000  $\mu\text{L}$  de sobrenadante/padrão 1800  $\mu\text{L}$  de metanol e 200  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sódio ( $1 \text{ mol. L}^{-1}$ ). As leituras foram realizadas no espectrofluorímetro em 532 nm de excitação e 553 nm de emissão. Foi realizado teste adição e recuperação para verificar a exatidão do método.

#### 4.10 Parâmetros bioquímicos

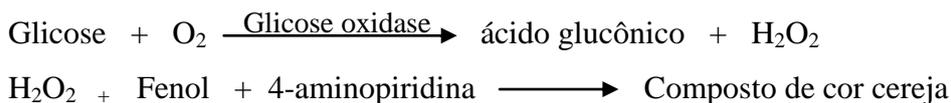
As análises dos parâmetros bioquímicos foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG.

As amostras de sangue foram coletadas de todos os animais do delineamento experimental 2. Os parâmetros bioquímicos foram determinados por métodos enzimáticos utilizando kits comerciais da BIOCLIN<sup>®</sup>. Para análise de colesterol, glicose, triglicérides e uréia foram utilizadas metodologia enzimática colorimétrica, e apenas colorimétrica para creatinina. Para análise de Aspartato Amino Transferase (AST) e Aspartato Amino Transferase (ALT) utilizou-se reação de Reitman e Frankel, apenas esta análise possui curva analítica os outros parâmetros necessitam de calibração semestral. A seguir são demonstradas as reações envolvidas nas determinações dos parâmetros bioquímicos (BURTIS et al., 2008):

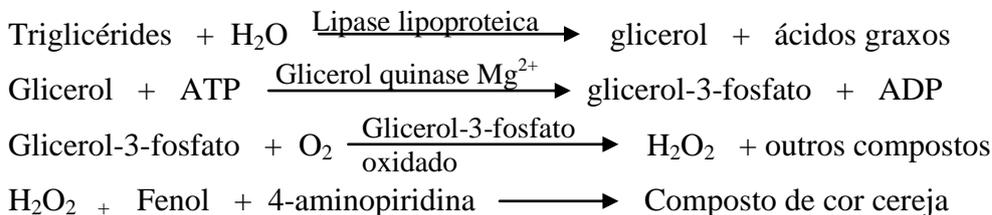
- Determinação de Colesterol (calibração com padrão):



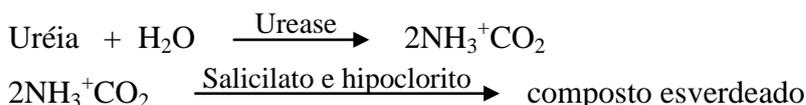
- Determinação de glicose (calibração com padrão):



- Determinação de triglicérides (calibração com padrão):



- Determinação de uréia (calibração com padrão):



- Determinação de creatinina (calibração com padrão):

Creatinina + ácido pícrico  $\longrightarrow$  complexo amarelo-esverdeado

\*com adição de reagente ácido  $\longrightarrow$  redução da cor

- Determinação das transaminases (calibração com substrato):

(AST) L-aspartato + alfa-cetogluturato  $\longrightarrow$  L-glutamato + oxalato + DNPH\*

(ALT) L-alanina + alfa-cetogluturato  $\longrightarrow$  L-glutamato + piruvato + DNPH\*

\*coloração é proporcional a quantidade de piruvato/oxalato.

#### 4.11 Análises estatísticas

O peso corpóreo, ganho de peso, consumo de dieta experimental dos animais do delineamento 1 e 2, composição centesimal, teores de minerais das amostras de pó de café, infusos, fígados e rações modificadas, análises bioquímicas dos fígados e plasma foram analisadas por ANOVA seguido de teste de Tukey. O número total de ACF, número de AC por foco, a relação entre criptas/FCA e o número de FDM/FRM nos diferentes grupos experimentais foram analisados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis (DIAS et al., 2010). Utilizou-se o programa BioEstat<sup>®</sup> 4.0, e para todas as análises estatísticas foi considerado estatisticamente significativo os resultados com  $p$  valor igual ou menor a 0,05.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição centesimal

Os resultados obtidos das análises de composição centesimal das amostras de café torrado e moído e dos infusos derivados dos manejos orgânico e convencional, das rações modificadas com café e da ração comercial utilizadas no delineamento experimental 2, estão apresentados na Tabela 5. Os valores médios dos teores de cada variável analisada foram expressos em  $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de amostra em base úmida.

Tabela 5 - Resultados da composição centesimal do pó de café e das infusões, obtido dos manejos orgânico e convencional ( $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ )(n=3).

Amostras	Carboidratos (g)	Cinzas (g)	Lipídios (g)	Proteínas (g)	Umidade (g)
CO**	58,30 ± 0,50 <sup>a*</sup>	4,14 ± 0,27 <sup>a</sup>	18,76 ± 0,02 <sup>a</sup>	17,94±0,56 <sup>a</sup>	2,33 ± 0,02 <sup>a</sup>
CC	58,36 ± 0,17 <sup>a</sup>	4,36 ± 0,01 <sup>a</sup>	18,59 ± 0,01 <sup>a</sup>	17,80±0,07 <sup>a</sup>	2,43 ± 0,03 <sup>a</sup>
IO 5%	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,29±0,33 <sup>a</sup>	98,54 ± 0,01 <sup>a</sup>
IO 10%	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,58±0,16 <sup>a</sup>	97,40 ± 0,02 <sup>a</sup>
IO 20%	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,69±0,17 <sup>a</sup>	94,96 ± 0,04 <sup>a</sup>
IC 5%	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,37±0,08 <sup>a</sup>	98,49 ± 0,21 <sup>a</sup>
IC 10%	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,68±0,09 <sup>a</sup>	97,42 ± 0,01 <sup>a</sup>
IC 20%	0,01 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,68±0,14 <sup>a</sup>	94,94 ± 0,01 <sup>a</sup>
RC	45,32 ± 1,01 <sup>a*</sup>	8,81 ± 0,32 <sup>a</sup>	4,92 ± 0,41 <sup>a</sup>	27,31 ± 0,31 <sup>a</sup>	11,91 ± 0,21 <sup>a</sup>
RCO 5%***	45,73 ± 0,32 <sup>a</sup>	8,93 ± 0,11 <sup>a</sup>	4,93 ± 0,22 <sup>a</sup>	27,62 ± 0,52 <sup>a</sup>	12,12 ± 0,12 <sup>a</sup>
RCO 10%	45,91 ± 1,22 <sup>a</sup>	8,82 ± 0,12 <sup>a</sup>	4,91 ± 0,22 <sup>a</sup>	27,51 ± 0,22 <sup>a</sup>	12,01 ± 0,11 <sup>a</sup>
RCO 20%	46,15 ± 1,44 <sup>a</sup>	8,63 ± 0,34 <sup>a</sup>	4,91 ± 0,11 <sup>a</sup>	28,22 ± 0,56 <sup>a</sup>	12,02 ± 0,13 <sup>a</sup>
RCO 4%(pó)	46,12 ± 1,43 <sup>a</sup>	8,92 ± 0,22 <sup>a</sup>	5,12 ± 0,14 <sup>a</sup>	27,71 ± 0,62 <sup>a</sup>	11,63 ± 0,11 <sup>a</sup>
RCC 5%	45,75 ± 2,81 <sup>a</sup>	8,91 ± 0,07 <sup>a</sup>	4,93 ± 0,11 <sup>a</sup>	28,33 ± 1,61 <sup>a</sup>	11,85 ± 0,32 <sup>a</sup>
RCC 10%	45,51 ± 1,87 <sup>a</sup>	9,46 ± 0,22 <sup>a</sup>	5,08 ± 0,12 <sup>a</sup>	28,41 ± 0,82 <sup>a</sup>	11,41 ± 0,33 <sup>a</sup>
RCC 20%	47,13 ± 1,58 <sup>a</sup>	8,71 ± 0,12 <sup>a</sup>	5,06 ± 0,12 <sup>a</sup>	27,81 ± 0,28 <sup>a</sup>	11,62 ± 0,17 <sup>a</sup>
RCC 4%(pó)	46,45 ± 1,12 <sup>a</sup>	9,24 ± 0,15 <sup>a</sup>	5,27 ± 0,19 <sup>a</sup>	27,82 ± 0,61 <sup>a</sup>	11,61 ± 0,18 <sup>a</sup>

\*Média ± Desvio padrão amostral. ANOVA seguida de teste Tukey ( $p < 0,05$ ).

\*\* CO=café orgânico; CC=café convencional; IO=infuso de café orgânico; IC=infuso de café convencional; RC=ração comercial; RCO= ração com café orgânico; RCC= ração com café convencional. \*\*\* Valor referente à concentração do infuso incorporado a ração comercial (incorporação 100 mL infuso/kg ração).

Observa-se (Tabela 5) que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas análises de composição centesimal entre o pó de café orgânico e convencional e também entre os infusos provenientes dos mesmos. Evidencia-se que todas as amostras de café se encontraram dentro do valor nutricional previsto na Portaria nº 377, de Abril de 1999 (ANVISA, 2010, b).

Para umidade, de acordo com a ANVISA (2010, b), o café torrado e moído deve conter um teor de no máximo  $5,0 \text{ g} \cdot 100,0 \text{ g}^{-1}$  de amostra, assim o valor encontrado é aceito dentro destas normas. Os valores de lipídeos, próximos de  $18,0 \text{ g} \cdot 100,0 \text{ g}^{-1}$ , foram maiores que os apresentados por Silva et al. (2007) que foi de  $11,6 \text{ g} \cdot 100,0 \text{ g}^{-1}$ . Eles analisaram o café da espécie arábica, manejo convencional obtido por torra tradicional (escura). Essas variações entre os trabalhos podem estar relacionadas à origem, tipo de torra, tipo de secagem, entre outros fatores envolvidos no processamento do café.

Os teores de proteínas totais encontradas nos pós de café foram de  $17,0 \text{ g} \cdot 100,0 \text{ g}^{-1}$  de amostra. Quando comparado com outros trabalhos da literatura esse teor mostrou-se elevado, entretanto as amostras não são de mesmo cultivar e não passaram pelo mesmo processamento (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURAL, 2010; SILVA et al., 2007). Como ocorrem com os lipídeos, as proteínas se degradam durante o processamento do café, assim a temperatura de torra é o principal determinante do teor de proteína do pó (SIVETZ; DESROSIER, 1979). Sugere-se que as proteínas tenham sofrido menor degradação por passarem por torra média e, conseqüentemente, ficando expostas a uma menor temperatura.

A determinação de cinzas é realizada a  $550^{\circ}\text{C}$ , assim é eliminada toda matéria orgânica do alimento, e o valor encontrado sendo referente aos compostos inorgânicos. A ANVISA preconiza teores de cinzas de no máximo  $5,0 \text{ g} \cdot 100,0 \text{ g}^{-1}$  de amostra e as amostras tanto de café orgânico como convencional estão dentro desse limite, apresentando 4,14 e 4,36  $\text{g} \cdot 100,0 \text{ g}^{-1}$  de amostra, respectivamente.

E por último, foi analisado o teor de carboidratos, sendo este determinado por diferença dos demais compostos encontrados, completando 100,0 g de amostras (AOAC, 2000). Os teores de carboidratos analisados pela USDA (2010) apresentaram um valor médio de  $78,42 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ , as quais foram maiores quando comparados com as amostras analisadas neste trabalho. Segundo Silva et al. (2007), os carboidratos presentes no pó de café têm importante função no processo de torra do café, pois estes participam da reação de Maillard, que atribui aroma e sabor para os grãos. Dessa forma as variações encontradas no pó de café orgânico e convencional deste trabalho em relação à literatura, podem ser devido ao processamento, que pode causar ou não degradação destes componentes. As amostras usadas pelos autores citados são de torra escura, a qual expõe o café a uma maior temperatura do que a torra média, em torno de  $220\text{-}228^{\circ}\text{C}$ .

Os teores dos compostos encontrados nos infusos analisados são extremamente dependentes dos valores encontrados no pó de café. A composição destes é relativa a compostos solúveis e não voláteis, que permaneceram na bebida durante o processo de

preparo frente a uma temperatura de 90°C. Observou-se proporcionalidade entre extrações realizadas nos dois manejos, as quais não foram estatisticamente diferentes.

Os teores apontados pelo da USDA (2010), 99g de umidade, 0,1g de proteínas e cinzas, 0g de lipídeos e 0,4g de carboidratos em 100g de amostra, considerando um infuso a 10% (m/v), foram próximos aos encontrados no presente trabalho para infusos do manejo orgânico e convencional. Dessa forma os infusos não são boa fonte calórica, considerando uma dieta diária humana de 2000 Kcal, pois o consumo médio diário humano é de 150,0 mL de infuso a 10% (m/v) equivalendo a 13,5 Kcal (TACO, 2006).

Os resultados da composição centesimal das rações modificadas e da comercial demonstram que as rações são similares entre si, sendo estatisticamente iguais, comprovando que elas atendem as quantidades mínimas de nutrientes necessárias para os animais (DOULL et al., 2007). Os valores encontrados foram próximos aos resultados obtidos por Oliveira (2007), para carboidratos, proteínas e lipídeos, que também incorporou café na ração comercial. Dessa forma o resultado da composição centesimal comprova que o processo utilizado para a incorporação do café nas formas de pó ou infusos foi incapaz de provocar alterações na composição centesimal, a qual foi homogênea e não interferiu nos resultados da evolução nutricional ao longo do experimento.

## **5.2 Delineamentos experimentais**

### *5.2.1 Delineamento experimental 1*

Os resultados do monitoramento dos animais durante o delineamento 1, avaliando a possibilidade de aplicação do infuso em maiores concentrações como fonte exclusiva de líquido na dieta ou sua incorporação a ração são verificados na Tabela 6. As concentrações dos infusos foram escolhidas baseadas no consumo humano médio de 250 mL de infuso a 10% (m/v) por dia, assim testou-se uma concentração acima (12% m/v), metade (6% m/v) e três infusos menores (1, 2 e 3% m/v), optou-se por estas concentrações a fim de estabelecer uma faixa de concentração para verificar a aceitação dos infusos pelos ratos.

Foi observado que os animais tratados com infusão nas concentrações 6 % e 12 % apresentaram perda de peso diária. Uma justificativa possível seria a ingestão baixa de líquidos, por serem os infusos a única fonte de hidratação concomitante a uma baixa aceitação

dos mesmos. Esta baixa aceitação dos infusos e, conseqüentemente de líquidos, repercutiu em um processo de desidratação. Os animais que ingeriram infusos de concentrações 1%, 2% e 3% apresentaram ganho de peso, consumo de infuso e ração estatisticamente igual a o grupo controle.

Tabela 6 - Resultado obtido da avaliação da evolução nutricional dos animais do delineamento experimental 1 (n=6).

<b>Grupos/ Tratamentos</b>	<b>Duração (dias)</b>	<b>Peso médio (g)</b>	<b>Ganho de peso/dia (g)</b>	<b>Consumo de bebida/rato/dia (mL)</b>	<b>Consumo de ração/rato/dia (g)</b>
Controle 1	60	341,36 ± 13,40*	1,50 ± 0,18 <sup>a</sup>	27,79 ± 4,40 <sup>a</sup>	21,81 ± 2,53 <sup>a</sup>
(T1) Infuso 1%	60	332,08 ± 25,88	1,42 ± 0,23 <sup>a</sup>	27,91 ± 3,42 <sup>a</sup>	21,91 ± 1,74 <sup>a</sup>
(T2) Infuso 2%	60	344,52 ± 21,61	1,56 ± 0,20 <sup>a</sup>	24,63 ± 3,12 <sup>a</sup>	21,29 ± 1,36 <sup>a</sup>
(T3) Infuso 3%	60	328,11 ± 6,79	1,42 ± 1,06 <sup>a</sup>	23,59 ± 4,42 <sup>a</sup>	20,87 ± 2,98 <sup>a</sup>
(T4) Infuso 6%	13	267,79 ± 22,17	-1,04 ± 1,64 <sup>a</sup>	21,62 ± 3,71 <sup>a</sup>	17,37 ± 3,38 <sup>b</sup>
(T5) Infuso 12%	06	259,74 ± 19,96	-6,87 ± 3,33 <sup>b</sup>	13,62 ± 5,52 <sup>b</sup>	11,16 ± 1,88 <sup>b</sup>
Controle 2	15	349,19 ± 17,29*	0,50 ± 0,07 <sup>c</sup>	n.m.**	5,13 ± 1,00 <sup>c</sup>
(T6) Ração 3,2%	15	371,24 ± 19,86	0,49 ± 0,13 <sup>c</sup>	n.m.	5,54 ± 1,02 <sup>c</sup>
(T7) Ração 10%	15	365,78 ± 14,19	0,31 ± 0,12 <sup>c</sup>	n.m.	5,37 ± 1,45 <sup>c</sup>
(T8) Ração 40%	15	376,11 ± 16,02	0,36 ± 0,13 <sup>c</sup>	n.m.	5,52 ± 2,23 <sup>c</sup>

\* Média ± Desvio padrão amostral.

\*\*n.m.= não monitorado

Sobre a ingestão das infusões foi observado que quanto menor a concentração do infuso maior seu consumo. Este fato pode ser comprovado pela comparação dos valores do grupo controle (que recebeu água) e dos grupos que receberam infusos 1, 2 e 3%, sendo estes estatisticamente iguais. De uma maneira geral, o consumo da bebida foi semelhante, porém uma redução considerada foi observada nos animais tratados com infuso 12%.

As concentrações de café incorporado a ração comercial também foram escolhidos com base no consumo humano. Assim, aplicando a concentração de 3,2% valor abaixo ao consumo humano, a de 10% (m/v) sendo equivalente ao consumo humano e uma maior 40% (m/v), sendo estabelecida assim, uma faixa de concentração ampla de infusos para investigar a aceitação pelos ratos.

Analisando o a evolução nutricional dos grupos que ingeriram ração modificada com café o consumo de ração e ganho de peso foram estatisticamente iguais em todos os tratamentos. Assim, verifica-se que o uso da ração modificada não altera a evolução nutricional ao longo do experimento. Outra análise pertinente é a necessidade de renovação das infusões, ou seja, infusos que foram oferecidos aos animais com mais de dois dias de

preparo fizeram que o consumo reduzisse (dados não apresentados), necessitando assim renovação em dias intercalados.

Não foi avaliada a capacidade de consumo das infusões pelos animais por gavagem, que se trata de um método de introdução de alimentos líquidos no estômago através de um tubo de polivinil colocado pelo nariz ou boca, causando assim intenso desconforto nos animais além de ser operacionalmente oneroso e demorado quando se pretende uma experimentação prolongada.

### *5.2.2 Delineamento Experimental 2*

Os animais submetidos ao delineamento dois foram monitorados durante doze semanas quanto à evolução de massa corpórea e consumo diário de ração ou café torrado e moído. Tais resultados são apresentados na Tabela 7. Os resultados obtidos do monitoramento do consumo de ração e pó de café, orgânico e convencional, não apresentaram diferenças significativas para nenhum dos grupos.

A injeção de DMH suprimiu a quantidade de ração consumida durante o período de aplicação, porém a massa corporal não foi afetada, assim a evolução de massa corpórea dos animais foi homogênea durante as doze semanas de experimento. Dessa forma, quando se compara o valor dos teores de café consumidos num mesmo manejo nota-se proporcionalidade das concentrações ingeridas quando relacionado com os teores aplicados a ração.

Quando há comparação entre os manejos verifica-se que os dados para uma mesma concentração foram iguais. Assim, a análise destes dados comprova que os resultados encontrados se devem a ação do café orgânico/convencional incorporado a ração. Considerando um indivíduo de 70 kg e realizando os cálculos de consumo diário de café (150 mL a 10% m/v), encontramos que o humano consome cerca de 0,0036 g de café torrado e moído por kg de peso corpóreo.

Assim, considerando-se a relação de consumo de café (g/kg de peso) verifica-se que os animais deste experimento ingeriram maior quantidade do que a média da população humana.

Tabela7 - Resultados obtidos do delineamento 2 relacionados ao peso corpóreo, evolução do peso dos animais, consumo de ração e café dos diferentes manejos.

Grupo/ Tratamento <sup>b</sup>	Número de animais	Peso corpóreo inicial (g)	Peso corpóreo final (g)	Ganho de Peso corpóreo (g)	Consumo de ração (g/rat/dia) <sup>c</sup>	Consumo de ração (g/Kg p.c./dia) <sup>c</sup>	Consumo de café torrado e moído (g/rat/dia) <sup>c</sup>	Consumo de café torrado e moído (g/Kg p.c./dia) <sup>c</sup>
(G1)RC+DMH**	10	115,8 ± 13,9*	429,7 ± 23,2	313,8 <sup>a</sup> ± 20,8	25,9 ± 0,8	60,4 <sup>a</sup> ± 2,8	-	-
(G2)RCO 5%***+DMH	10	127,1 ± 12,9	419,4 ± 29,9	292,3 <sup>a</sup> ± 31,2	28,2 ± 2,6	67,5 <sup>a</sup> ± 4,6	0,14 ± 0,01	0,3 ± 0,02
(G3)RCO 10%+DMH	10	118,2 ± 18,1	406,0 ± 19,9	287,9 <sup>a</sup> ± 20,4	25,5 ± 3,1	64,9 <sup>a</sup> ± 3,2	0,26 ± 0,03	0,6 ± 0,06
(G4)RCO 20%+DMH	10	106,0 ± 06,5	412,9 ± 40,0	306,9 <sup>a</sup> ± 39,1	26,3 ± 3,0	64,3 <sup>a</sup> ± 6,5	0,53 ± 0,06	1,3 ± 0,09
(G5)RCO 4%+DMH	10	119,7 ± 12,0	369,3 ± 40,3	269,6 <sup>a</sup> ± 35,5	24,7 ± 2,6	68,4 <sup>a</sup> ± 6,7	0,99 ± 0,08	2,4 ± 0,09
(G6)RCC 5%+DMH	10	118,6 ± 13,5	411,8 ± 25,2	293,3 <sup>a</sup> ± 29,4	25,9 ± 1,9	63,1 <sup>a</sup> ± 4,1	0,13 ± 0,01	0,3 ± 0,02
(G7)RCC 10%+DMH	10	120,0 ± 12,5	432,5 ± 22,7	312,5 <sup>a</sup> ± 31,1	25,4 ± 3,3	68,9 <sup>a</sup> ± 3,1	0,25 ± 0,03	0,6 ± 0,03
(G8)RCC 20%+DMH	10	119,2 ± 10,5	430,7 ± 31,3	311,5 <sup>a</sup> ± 31,7	27,4 ± 1,2	63,9 <sup>a</sup> ± 5,0	0,55 ± 0,02	1,3 ± 0,10
(G9)RCC 4%+DMH	10	114,5 ± 13,9	378,9 ± 37,6	264,5 <sup>a</sup> ± 30,7	25,9 ± 3,3	69,0 <sup>a</sup> ± 7,9	1,04 ± 0,14	2,8 ± 0,38
(G10)RC+EDTA	10	118,0 ± 15,8	418,3 ± 37,5	300,3 <sup>a</sup> ± 43,7	25,2 ± 2,5	60,7 <sup>a</sup> ± 5,3	-	-
(G11)RCO 20%+EDTA	10	135,5 ± 13,2	431,4 ± 38,3	295,9 <sup>a</sup> ± 33,9	27,3 ± 1,9	63,7 <sup>a</sup> ± 5,7	0,54 ± 0,04	1,3 ± 0,11
(G12)RCO 4%+EDTA	10	124,7 ± 15,5	408,9 ± 21,8	284,2 <sup>a</sup> ± 24,4	28,3 ± 1,2	69,4 <sup>a</sup> ± 3,7	1,13 ± 0,05	2,8 ± 0,15
(G13)RCC 20%+EDTA	10	130,9 ± 11,2	441,8 ± 18,6	310,9 <sup>a</sup> ± 18,4	27,3 ± 0,9	61,9 <sup>a</sup> ± 2,7	0,55 ± 0,02	1,3 ± 0,05
(G14)R CC 4%+EDTA	10	114,6 ± 13,8	408,5 ± 42,2	269,9 <sup>a</sup> ± 41,6	27,4 ± 1,6	67,8 <sup>a</sup> ± 6,5	1,10 ± 0,06	2,7 ± 0,26

\*Valores médios de cada variável analisada seguido do desvio padrão amostral das mesmas,  $x_m \pm s$ .

<sup>a</sup> Diferença estatística do grupo controle (+) vs. grupo controle (-); e estes vs. G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11e G12. G13 e G14; ANOVA seguida de teste Tukey para  $p < 0,05$ .

<sup>b</sup> DMH – 1,2-dimetilhidrazina (4x40mg/kg p.c), EDTA – ácido etilenodiaminotetracético 1,50% em NaCl 0,9%.

<sup>c</sup> a partir da terceira, de doze semanas de experimento

\*\* CO=café orgânico; CC=café convencional; IO=infuso de café orgânico; IC=infuso de café convencional; RC=ração comercial; RCO= ração com café orgânico; RCC= ração com café convencional; F=ffgado; G= grupo experimental e Rec.= teste de recuperação.

\*\*\*\* Valor referente à concentração do infuso incorporado a ração comercial (incorporação 100 mL infuso/kg ração).

As variáveis monitoradas (peso, ganho de peso e consumo de ração) durante todo período experimental servem como um sensível indicador do estado geral do animal durante a sua vida (APPEZENLLER et al., 2008). Sendo assim, o consumo das rações não foi diferente entre os grupos, concluindo que a ingestão não foi significativamente afetada pela droga mutagênica ou pela síndrome da caquexia. A síndrome da caquexia consiste na anorexia do câncer que causa a perda excessiva de peso, principalmente de tecido gorduroso e músculo esquelético (INUI, 2002). Esses resultados também indicam que o consumo das rações não causou alterações nutricionais e este aspecto é de fundamental importância, pois alterações metabólicas podem influir na atuação de agentes mutagênicos e/ou antimutagênicos (RABELLO-GAY, 1985).

### 5.3 Determinação de Cu, Fe e Zn

Foram realizadas análises das amostras de pó de café e infusos, orgânico e convencional e rações utilizados no estudo *in vivo* do delineamento 2, além das amostras de fígados coletados de três animais de cada grupo experimental.

Os parâmetros analíticos obtidos no FAAS das análises de Cu, Fe e Zn estão apresentados na Tabela 8. Além disso, foram realizados testes de adição e recuperação (Tabela 9), a fim de verificar a exatidão do método para determinação de Cu, Fe e Zn em amostras de café (pó e infusos - orgânico e convencional), rações (comercial e modificada) e fígados (animais do delineamento 2). Os resultados obtidos mostraram que os métodos utilizados na determinação de Cu, Fe e Zn foram eficientes, uma vez que as recuperações encontram-se dentro da faixa de  $\pm 10\%$ , confirmando a exatidão da metodologia utilizada (HARRIS, 2005).

A determinação de espécies químicas o cálculo dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) é utilizada para avaliar o desempenho do método analítico. Define-se o limite de detecção como a menor quantidade de analito detectável por um método, no entanto, sem precisão e exatidão satisfatórias. Podendo ser ainda definido como a menor quantidade que pode ser detectada estatisticamente diferente do branco. O limite de quantificação é mais adequado e traduz, com precisão e exatidão consideráveis, a menor quantidade do analito que pode ser medida na amostra.

Tabela 8 - Parâmetros analíticos para determinação de Cu, Fe e Zn em HNO<sub>3</sub> 0,5 mol. L<sup>-1</sup> por FAAS.

	Limite de detecção (mg.L <sup>-1</sup> )	Limite de quantificação (mg.L <sup>-1</sup> )	Coefficiente angular	Coefficiente linear	Coefficiente de correlação	Faixa Linear mg.L <sup>-1</sup>
Cu	0,065	0,215	0,0449	0,0021	0,9981	0,215-2,5
Fe	0,127	0,424	0,0398	0,0088	0,9998	0,091-6,0
Zn	0,024	0,081	0,185	0,0172	0,9954	0,081-2,5

Segundo a IUPAC (*International Union Pure and Applied Chemistry*) (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 1987), matematicamente os cálculos referentes ao limite de detecção e quantificação baseiam-se na razão entre o desvio padrão obtido de dez leituras do branco e o coeficiente angular da curva analítica. Multiplicando-se o valor obtido por três obtém-se o LD e multiplicando-se por dez o LQ.

Em relação aos teores Cu, Fe e Zn encontrados no pó de café torrado e moído, houve diferença significativa entre os manejos orgânico e convencional, sendo que o convencional apresentou maiores teores. As alterações ocorridas na composição química do café podem ser um indício de desequilíbrio metabólico ou necessidade fisiológica da planta, que ocorre durante o tratamento agrônomico (FILHO et al., 1999). Assim, os mecanismos de adsorção no solo fazem com que a planta durante o processo de extração remova os elementos do solo. O processo de fertilização oferece artificialmente aos solos, nutrientes para complementar sua composição, e o uso repetido desses processos fazem com que haja um acúmulo no solo ou absorção extra pela planta (SANTOS et al., 2009).

Quanto aos infusos, não foi detectado Cu (< 0,08 mg.L<sup>-1</sup>) e não foi possível quantificar os teores de Fe (> 0,127 mg.L<sup>-1</sup> e < 0,424 mg.L<sup>-1</sup>). Quanto aos teores de Zn encontrados nas amostras, houve diferença entre os manejos apenas para os infusos 20%, obtendo maior concentração no orgânico, isso pode ter ocorrido devido à complexidade da matriz analisada além da influência do manejo empregado na lavoura. Tal matriz, quando passa por processamento tem sua complexidade aumentada, o que pode alterar a disponibilidade dos minerais durante a extração (SANTOS et al., 2010).

Dessa forma, justificam-se os teores mais elevados de Cu, Fe e Zn na composição do pó de café convencional, pois este passou por um processo de fertilização inorgânico utilizando o fertilizante NPK formula 20-05-20. O teor limite desses minerais definidos pela Associação Brasileira de Alimentos é de 50,0 mg.Kg<sup>-1</sup>

para Zn e 30,0 mg.Kg<sup>-1</sup> para Cu, mostrando que os valores encontrados estão dentro das normas exigidas para pó de café (MALGORZATA et al., 2007).

O fertilizante utilizado, NPK formula 20-05-20, possui teores de N, K, Ca, Mg, Cu, Zn, Fe e Mn, a absorção desses minerais pela planta melhora o crescimento e a composição química dos frutos (COELHO et al., 2007). Segundo análises realizadas desse fertilizante por Pires et al. 2009, foram encontrados teores de 4,0; 85,8 e 34,6 g.Kg<sup>-1</sup> de Cu, Fe e Zn, respectivamente, e observou que estes causam alterações significativas na planta como: crescimento, alterações de composição química e oferecem para a planta nutrição adequada em concentrações controladas.

Ao contrário, na plantação do café orgânico, a adição de micronutriente de mamona durante o período de fertilização pode ter auxiliado na redução destes minerais, alterando a disponibilidade para planta e conseqüentemente no pó de café desse manejo. A ação da matéria orgânica pode imobilizar ou mobilizar metais no solo, assim, os cátions dos metais se ligam a matéria orgânica e são absorvidos rapidamente, estando disponíveis baixos teores de minerais para ser absorvido e distribuído na planta e frutos do cafeeiro (SANTOS et al., 2009). Dessa forma observa-se alterações minerais da planta e conseqüentemente dos frutos em virtude da fertilização utilizada.

Para os resultados das análises dos infusos de café (Tabela 9), observa-se que houve alteração em relação aos teores de Zn apenas para as maiores concentrações de infuso (20% m/v). Os teores de Cu e Fe não foram quantificados em todos os infusos, mesmo tendo seus volumes reduzidos. Apesar das diferenças encontradas no pó de café, não foi observado o mesmo comportamento para as infusões (extração aquosa), podendo inferir que a disponibilidade de Zn e Fe foi maior no café orgânico durante o processo de extração com água aquecida a 90°C. Durante um processo de extração a relação soluto/solvente afeta significativamente a eficiência do processo. Alguns trabalhos mostraram resultados semelhantes durante as análises de compostos como cafeína, ácidos clorgênicos e cinamatos (BELL et al., 1996; CLIFFORD, 1999; KOLAYLI et al., 2004).

Por ser uma amostra complexa, o café possui variações incontroláveis em relação ao equilíbrio metabólico ou necessidades fisiológicas da planta, decorridas durante o tratamento natural, podendo provocar alterações nas ligações dos minerais a outros componentes presentes no fruto como, por exemplo, proteínas, fazendo com que os minerais sejam liberados com maior facilidade (FILHO et al., 1999). Segundo Takenaka et al. (2005) a presença de melanoidinas e alguns compostos fenólicos agem

como quelantes, alterando a solubilidade de certos metais, como Fe e Zn durante processos de extrações.

Tabela 9 - Resultados dos teores médios de Cu, Fe e Zn encontrados nas amostras de café torrado e moído ( $\text{mg.Kg}^{-1}$  pó de café) e de infusões ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), ração ( $\text{mg.Kg}^{-1}$  ração seca) e fígado ( $\text{mg.g}^{-1}$  de fígado\*\*\*\*\*).

Amostras	Cu		Fe		Zn	
		Rec. (%)		Rec. (%)		Rec. (%)
CO	21,29± 0,80 <sup>a</sup>	103,0	40,90± 1,50 <sup>a</sup>	100,0	22,21± 0,24 <sup>a</sup>	102,0
CC	25,03± 0,29 <sup>b</sup>	100,0	45,70± 1,10 <sup>b</sup>	100,2	27,09± 1,59 <sup>b</sup>	96,0
IO 5%	n. d. <sup>**</sup>	100,0	n.q.	101,0	0,13± 0,01 <sup>a</sup>	99,9
IO 10%	n. d. <sup>**</sup>	100,0	n.q.	101,0	0,23± 0,01 <sup>b</sup>	100,0
IO 20%	n. d. <sup>**</sup>	103,0	n.q.	100,0	0,59± 0,01 <sup>c</sup>	105,0
IC 5%	n. d. <sup>**</sup>	108,0	n.q.	100,0	0,14± 0,01 <sup>a</sup>	103,0
IC 10%	n. d. <sup>**</sup>	100,0	n.q.	101,0	0,25± 0,01 <sup>b</sup>	99,9
IC 20%	n. d. <sup>**</sup>	100,0	n.q.	100,0	0,36± 0,01 <sup>d</sup>	100,0
RC	34,03± 0,29 <sup>*</sup>	101,0	107,57 ± 10,08	100,0	0,15± 0,00	100,0
RCO 5%	36,38± 0,78	101,0	94,42 ± 12,33	100,0	0,17± 0,01	99,1
RCO 10%	35,92± 1,46	-	105,36 ± 12,33	-	0,16± 0,01	-
RCO 20%	37,53± 3,36	-	105,27 ± 14,55	-	0,15± 0,01	-
RCO 4% (pó)	35,87± 3,59	-	127,51 ± 15,80	-	0,14± 0,02	-
RCC 5%	34,76± 3,53	100,0	97,23 ± 13,20	100,0	0,12± 0,00	100,0
RCC 10%	32,28± 3,28	101,1	129,38 ± 15,33	99,7	0,13± 0,00	99,7
RCC 20%	35,66± 3,21	-	128,69 ± 12,63	-	0,17± 0,00	-
RCC 4% (pó)	32,78 ± 0,04	-	128,12 ± 15,64	-	0,16± 0,01	-
F-G1	n. d. <sup>*</sup>	-	0,55 ± 0,08	-	0,12 ± 0,02	-
F-G2	n. d.	-	0,63 ± 0,06	-	0,12 ± 0,01	-
F-G3	n. d.	-	0,69 ± 0,09	-	0,13 ± 0,01	-
F-G4	n. d.	-	0,67 ± 0,07	-	0,13 ± 0,01	-
F-G5	n. d.	-	0,62 ± 0,04	-	0,12 ± 0,01	-
F-G6	n. d.	97,0	0,61 ± 0,08	98,00	0,12 ± 0,02	93,00
F-G7	n. d.	-	0,70 ± 0,13	-	0,13 ± 0,01	-
F-G8	n. d.	-	0,66 ± 0,12	-	0,12 ± 0,01	-
F-G9	n. d.	-	0,66 ± 0,09	-	0,13 ± 0,01	-
F-G10	n. d.	96,0	0,56 ± 0,06	96,00	0,12 ± 0,00	102,00
F-G11	n. d.	-	0,68 ± 0,11	-	0,12 ± 0,00	-
F-G12	n. d.	-	0,62 ± 0,11	-	0,13 ± 0,01	-
F-G13	n. d.	-	0,62 ± 0,04	-	0,12 ± 0,01	-
F-G14	n. d.	94,0	0,57 ± 0,06	98,00	0,13 ± 0,01	96,00

\* Média ± Desvio padrão amostral.

\*\* n.d.=não detectado.

\*\*\* CO=café orgânico; CC=café convencional; IO=infuso de café orgânico; IC=infuso de café convencional; RC=ração comercial; RCO= ração com café orgânico; RCC= ração com café convencional; F=fígado; G= grupo experimental e Rec.= teste de recuperação.

\*\*\*\* Valor referente à concentração do infuso incorporado a ração comercial (incorporação 100 mL infuso/kg ração).

\*\*\*\*\*Umidade de 6,65%

Nos resultados obtidos das análises das rações modificadas (Tabela 9), foi observado que não houve diferença dos teores de Cu, Fe e Zn entre os manejos. As rações modificadas quando comparadas com a comercial, não apresentam diferenças significativas quanto aos teores de minerais e esta homogeneidade comprova que o processamento de incorporação do café a ração não provocou alterações na sua composição. Essas análises são de extrema importância uma vez que a ocorrência de modificações na composição química poderia influenciar nos resultados das análises bioquímicas e toxicológicas *in vivo*. Acrescenta-se que alterações discrepantes em relação aos limites recomendados pela ANVISA (2010, b) tornariam as rações impróprias para realização do experimento.

Quanto à determinação de minerais no fígado (Tabela 9), observa-se que não houve diferença nos teores de metais em todas as amostras de fígado. Além disso, não foi detectado Cu em nenhuma das amostras. Desta maneira pode-se supor que há uma manutenção das propriedades dos minerais hepáticos e que não houve influência do café e da dieta na biodisponibilidade destes minerais. A não detecção de cobre ( $<0,08 \text{ mg. L}^{-1}$ ) permite inferir que o elemento é um mineral encontrado em baixas concentrações no fígado.

A participação de metais como co-fatores enzimáticos em tecidos específicos faz com que esses sejam importantes para o organismo, regulando as reações metabólicas. Esses metais são bons indicadores do desenvolvimento de doenças causadas por fatores endógenos ou exógenos. Um exemplo é o diabetes que causa alterações significativas nos teores de Zn, Cu e Mn, ocorrendo sérias mudanças nos tecidos específicos do fígado por meio do desequilíbrio crônico endócrino (PRAT et al., 2009).

Alguns estudos realizando análise de minerais em fígados de animais que possuíam algum tipo de patologia relacionado a este órgão mostraram altos teores de Zn, Cu, Mn, Mg e Fe quando comparado aos grupos controle. Análises realizadas por Prat et al., 2009, encontraram teores de Zn, Cu e Fe, respectivamente em fígados sem nenhuma patologia induzida, verificando uma proximidade com os valores encontrados neste trabalho e quanto aos teores de Cu, estes foram em média  $12 \mu\text{g.g}^{-1}$ , justificando-se assim a não detecção pela técnica de FAAS. Os teores de minerais no fígado são dependentes de um bom funcionamento do metabolismo, alterações teciduais e presença de nutrientes.

Devido aos valores obtidos nas análises do pó de café, infusos, rações e os valores obtidos nos teores de minerais no fígado dos animais que ingeriram café

incorporado a ração em diferentes concentrações, conclui-se que os cafés, orgânico e convencional, nas concentrações administradas, não provocaram alterações significativas na saúde dos animais. Entretanto, deve-se considerar o tempo de ingestão e a biodisponibilidade dos minerais na presença de outros compostos presentes nas rações.

#### 5.4 Determinação de compostos orgânicos

O teor de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina foram identificados pela comparação do tempo de retenção (em minutos) das amostras com os padrões e o teor dos compostos foram quantificados usando uma curva padrão de calibração. O tempo de retenção dos padrões de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina foram 17,693 min., 21,084 min., 3,967 min, respectivamente.

Observa-se que o infuso 10% (m/v) e o extrato metanólico de café orgânico apresentaram maiores teores de ácido clorogênicos, cafeína e trigonelina em relação ao convencional (Tabela 10), esta diferença pode ser devido ao tipo de manejo empregado na lavoura.

Tabela 10 - Concentrações de ácido clorogênicos, cafeína e trigonelina nos infusos e extratos metanólicos de café orgânico e convencional ( $\text{g.kg}^{-1}$  de café).

Amostras	Ácidos clorogênicos	Trigonelina	Cafeína
IO**	$1,82 \pm 0,01^{*a}$	$24,31 \pm 0,01^a$	$26,14 \pm 0,01^a$
IC	$1,74 \pm 0,02^b$	$22,19 \pm 0,02^b$	$25,07 \pm 0,01^b$
EMO	$2,03 \pm 0,02^c$	$27,25 \pm 0,02^c$	$38,55 \pm 0,02^c$
EMC	$1,89 \pm 0,01^d$	$18,69 \pm 0,01^d$	$36,72 \pm 0,02^d$

\*Média  $\pm$  Desvio padrão amostral.

\*\* IO=infuso de café orgânico; IC=infuso de café convencional; EMO=extrato metanólico de café orgânico e EMC=extrato de café convencional.

<sup>a,b</sup> Diferença estatística em cada coluna. ANAVA, seguido de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A falta de estudos comparativos entre os compostos orgânicos presentes em cafés de diferentes manejos, faz com que a comparação destes resultados seja limitada. Entretanto, estudos comparativos entre produtos orgânicos e convencionais como carne de coelho; leites de vaca, ovelha e de cabra e manjerição mostram que os produtos de origem orgânica apresentaram níveis mais altos dos compostos analisados. Em contraste, resultados de estudos com minerais, mostraram maiores níveis em café

convencional, sendo os fertilizantes utilizados na plantação a causa destas diferenças entres os manejos (PLA et al., 2007; KLIMÁNKOVÁ et al., 2008; PATTONO et al, 2009;. SANTOS et al., 2010).

### **5.5 Teste de Criptas Aberantes (FCA) e Focos Depletados/Reduzidos de Mucina (FDM/FRM)**

Estão apresentados na Tabela 11 os resultados do teste de criptas aberrantes realizados nos 140 cólons obtidos dos animais do delineamento experimental dois. As análises de criptas aberrantes por focos depletados de mucina e a análise de criptas aberrantes por focos reduzidos de mucina são mostrados nas Tabelas 12 e 13, respectivamente.

O presente estudo analisou carcinogênese através do protocolo de focos de criptas aberrantes e focos depletados/reduzidos de mucina em colóns de ratos *Wistar*. Tais protocolos foram escolhidos, pois as células epiteliais da mucosa de intestino apresentam a maior taxa de proliferação dos tecidos do organismo e rapidamente mostram resultados sobre mutagenicidade. A taxa de regeneração é regulada por mecanismos de controle endógenos, mas também pode ser modificada pela dieta (POTTEN, 1997).

Foi realizado o teste de criptas aberrantes e focos depletados/reduzidos de mucina para avaliar as ações protetoras do café orgânico e convencional sob lesões pré-neoplásicas quimicamente induzidas por DMH, analisando a área total dos cólons dos ratos e comparando os resultados ao controle positivo. Foi avaliado também o efeito lesivo destes cafés no colón dos animais que receberam EDTA, comparando-os ao controle negativo. De acordo com a literatura, o aumento no número de FCA pode refletir o estágio inicial da carcinogênese no cólon, enquanto o aumento progressivo no número da criptas/FCA pode corresponder ao estágio de promoção (FENOGLIO-PRICE; NOFFSINGER, 1999). A proteção observada na fase de promoção da carcinogênese pode, por exemplo, ser usada na supressão da expansão clonal da célula iniciada, sendo que isso significativamente reduz o número de criptas por foco (DIAS et al, 2006).

Quanto ao tempo de tratamento, os ratos receberam as rações modificadas com infusos (5; 10 e 20% m/v) e pó (4% m/m) de café orgânico/convencional por uma semana antes (pré-tratamento), duas semanas (tratamento) e nove semanas após (pós-tratamento) o tratamento com DMH. Os tratamentos pré e pós-aplicação da droga mutagênica permitem o fornecimento de respostas diferentes ao evento protetor. Segundo a literatura, o aumento do número de focos relativos ao tratamento anterior à aplicação da droga pode refletir no favorecimento/proteção ao processo de iniciação da carcinogênese cólon retal e o posterior pode refletir auxílio ao reparo das lesões ou inibição da promoção ao adenoma (BIRD, 1995; HAMBLBY et al, 1997).

Pela análise dos resultados de FCA no teste de criptas aberrantes, percebeu-se que o controle positivo exibiu maior número de focos de criptas que o controle negativo sendo estes estatisticamente diferentes. Os grupos que receberam DMH não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre si quanto ao número de criptas/FCA, tal resultado demonstra a ação do DMH como agente indutor de lesões de cólon. No controle negativo, não foi observado presença de criptas e caso fossem observadas lesões as mesmas seriam de causa espontânea. Assim, como em estudo feito por Sung e Choi (2008), o número de focos de criptas aberrantes se mostrou significativamente menor, mas não negativos, nos grupos que não receberam DMH. Porém, se diferenciou de estudos de Dias et al. (2006) e Lima et al. (2005) em que os animais que não receberam a droga mutagênica não apresentaram nenhum foco de cripta aberrante.

Ao se comparar os grupos que receberam dietas experimentais e EDTA com o controle negativo, não se observou diferença significativa para nenhum tratamento, podendo-se concluir que os produtos testados não foram capazes de causar lesões no cólon.

Com relação ao efeito dos produtos sobre a ação da DMH (efeito protetor/potencializador), os resultados indicam que tais alimentos não foram capazes de suprimir a expansão clonal iniciada pela droga nas células da mucosa do cólon. A explicação dada por Dias et al. (2006) foi que possivelmente o alimento não poderia substancialmente chegar à luz do cólon e exercer os seus efeitos quimiopreventivos devido a absorção no intestino delgado, o que pode ter ocorrido também com o café. Além disso, pode ter ocorrido um baixo grau de absorção e, portanto, pequenas quantidades de compostos bioativos com efeito protetor foram metabolizados pelo organismo, não surtindo efeitos protetores.

Para o teste de focos depletados/reduzidos de mucina foram utilizados os grupos que confirmaram presença de criptas/focos no teste de criptas aberrantes (G1, G3, G4, G5, G6, G9, G10, G11 e G12). Os grupos não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre si. Dessa forma, por meio do teste de FDM/FRM confirma-se o resultado encontrado no teste de criptas aberrantes e conclui-se que o café nas concentrações e formas aplicadas no delineamento experimental 2 não provocaram efeito protetor nos cólons dos ratos.

Diferente dos resultados encontrados, vários estudos comprovam que os alimentos a base de café são ricos em compostos antioxidantes e estes são compostos que apresentam atividade anticarcinogênica. (STOPPER; ABRAHAM, 2004). Estudos realizados envolvendo experimentos *in vivo*, com protocolos utilizando rações a base de café, mostraram que o café possui efeito protetor em relação à mutagenicidade/carcinogenicidade em cólon de ratos (ABRAHAM, 1996; ABRAHAM et al., 1998; CHINTHALAPALLY et al., 1998; CAVIN et al., 2002). Entretanto, tais trabalhos são de curta duração e a administração do café é direta, geralmente realizada por gavagem ou oferecida na bebida. Neste trabalho, avaliou-se a interação do café com a dieta incorporando o pó de café ou infusos a ração comercial, tentando-se aproximar do que ocorre na prática, quando o café é consumido junto a outros alimentos.

Assim, as rações modificadas com café convencional ou orgânico, nas concentrações administradas no delineamento dois, não interferiram no desenvolvimento de FCA e na multiplicidade das criptas. Assumindo que o processo carcinogênico começa com a iniciação, em que um dano no DNA não reparado é replicado, seguido da promoção e expansão clonal das células pré-neoplásicas, há uma série de estágios com possibilidade para atividade anticarcinogênica ainda a ser explorada (SMITH et al., 2003). Esses fatores implicam na necessidade de estudos complementares que possam abordar diferentes tempos de tratamentos, drogas e concentrações do produto.

Tabela 11 - Resultados da análise do número de focos de criptas aberrantes e número de criptas por foco obtido da análise dos cólons do delineamento experimental 2.

Grupo/ Tratamento	Número de ratos	Número de criptas aberrante por foco							Total CA	Total FCA	CA/ FCA
		1	2	3	4	5	6	>=7			
(G1)RC+DMH**	10	1,0± 1,2*	5,9± 4,5	9,7± 7,5	9,1± 7,3	5,8± 3,8	2,4± 0,9	2,2± 2,5	138,9 ±80,8 <sup>a</sup>	36,2± 20,9	4,0 ± 0,7 <sup>a</sup>
(G2)RCO 5%+DMH	10	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0 <sup>b</sup>	0,0± 0,0	0,0 ± 0,0
(G3)RCO 10%+DMH	10	3,6± 2,8	18,0±12,2	26,3±23,4	19,4±15,3	12,0± 12,3	5,5± 7,5	5,0± 11,3	326,5 ± 325, 6 <sup>a</sup>	89,8± 77,7	3,4 ± 0,5 <sup>a</sup>
(G4)RCO 20%+DMH	10	2,0± 1,8	12,9± 7,4	18,2± 8,0	15,8± 8,6	10,4± 8,0	5,4± 4,4	4,5± 3,8	267,7 ± 143,9 <sup>a</sup>	69,2± 32,6	3,8 ± 0,7 <sup>a</sup>
(G5)RCO 4%+DMH	10	2,4± 2,4	10,2± 8,6	15,4± 12,7	13,1± 11,7	8,9± 8,5	3,3± 2,7	2,5± 2,5	195,2 ± 155,7 <sup>a</sup>	55,8± 44,6	3,2 ± 1,3 <sup>a</sup>
(G6)RCC 5%+DMH	10	5,5± 5,9	23,8± 20,5	26,6± 20,3	19,9± 15,2	12,2± 8,7	4,8± 3,9	3,5± 3,8	329,9 ± 243,2 <sup>a</sup>	96,3± 71,5	3,5 ± 0,6 <sup>a</sup>
(G7)RCC 10%+DMH	10	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0± 0,0	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
(G8)RCC 20%+DMH	10	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0± 0,0	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
(G9)RCC 4%+DMH	10	3,8± 4,3	20,0± 15,5	24,5± 21,6	17,0± 12,8	7,3± 3,5	3,5± 3,0	2,3± 2,7	241,4 ± 150,1 <sup>a</sup>	78,4± 59,0	3,2 ± 0,4 <sup>a</sup>
(G10)RC+EDTA	10	3,7± 3,9	16,9± 14,7	23,7± 17,0	21,3± 17,2	11,3± 9,5	7,8± 8,3	5,5± 6,2	328,2 ± 281,2 <sup>a</sup>	90,2± 70,4	3,5 ± 0,5 <sup>a</sup>
(G11)RCO 20%+EDTA	10	4,2± 2,7	18,5± 9,6	21,4± 12,7	19,7± 11,2	10,4± 7,4	3,7± 4,2	3,5± 6,0	285,5 ± 168,5 <sup>a</sup>	81,4± 39,6	3,4 ± 0,6 <sup>a</sup>
(G12)RCO 4%+EDTA	10	2,0± 2,4	12,8± 8,2	17,2± 11,6	11,9± 8,3	8,1± 8,1	3,7± 3,4	5,5± 6,7	228,5 ± 146,7 <sup>a</sup>	61,2± 34,7	3,3 ± 1,4 <sup>a</sup>
(G13)RCC 20%+EDTA	10	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0± 0,0	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>
(G14)R CC 4%+EDTA	10	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0± 0,0	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,0± 0,0	0,0 ± 0,0 <sup>b</sup>

\*Média ± S. \*\*CA – criptas aberrantes; \*\*\*FCA – focos de criptas aberrantes; Médias seguidas de mesma letra em cada coluna não diferem entre si estatisticamente.

RC=ração comercial; RCO= ração com café orgânico; RCC= ração com café convencional; DMH= 1,2-dimetilhidrazina; EDTA:etilenodiamintretacetico de sódio.

Tabela 12 - Resultados da análise do número de focos depletados de mucina e número de criptas por foco obtido da análise dos cólons do delineamento 2.

Grupo/ Tratamento	Número de ratos	Número de criptas aberrantes por foco depletados de mucina							Total FDM
		1	2	3	4	5	6	>=7	
(G1)RC+DMH**	10	0,8 ± 0,8*	4,1 ± 3,1	10,1 ± 7,2	8,0 ± 6,3	4,3 ± 3,5	2,9 ± 2,0	2,3 ± 2,3	32,5 ± 20,1
(G2)RCO 5%+DMH	10	2,9 ± 3,3	12,1 ± 10,2	21,4 ± 19,3	17,0 ± 13,2	9,4 ± 10,4	5,8 ± 6,5	4,5 ± 11,1	73,1 ± 67,4
(G3)RCO 10%+DMH	10	1,7 ± 1,4	9,9 ± 5,5	15,0 ± 6,6	13,4 ± 9,5	8,0 ± 6,5	4,7 ± 3,4	3,4 ± 3,0	56,1 ± 26,9
(G4)RCO 20%+DMH	10	1,5 ± 2,1	7,9 ± 8,1	14,1 ± 13,7	12,7 ± 12,3	8,0 ± 7,1	3,3 ± 2,9	2,7 ± 2,7	49,5 ± 43,3
(G5)RCO 4%+DMH	10	4,8 ± 6,1	19,1 ± 15,1	26,0 ± 20,7	18,8 ± 15,3	11,6 ± 9,5	4,1 ± 2,8	3,6 ± 4,7	86,6 ± 67,1
(G6)RCC 5%+DMH	10	4,3 ± 6,3	16,2 ± 14,8	23,4 ± 22,7	16,0 ± 10,9	8,1 ± 4,9	3,4 ± 2,7	1,7 ± 2,3	73,1 ± 59,6
(G7)RCC 10%+DMH	10	3,7 ± 3,4	13,4 ± 12,0	20,7 ± 17,1	18,6 ± 15,1	10,3 ± 9,8	5,6 ± 5,4	5,7 ± 6,7	78,0 ± 66,2
(G8)RCC 20%+DMH	10	3,3 ± 3,1	16,1 ± 8,7	18,3 ± 10,0	15,6 ± 7,5	9,8 ± 5,4	4,5 ± 3,9	2,8 ± 4,4	70,4 ± 28,6
(G9)RCC 4%+DMH	10	1,4 ± 2,1	9,6 ± 6,9	15,3 ± 9,4	9,3 ± 6,6	7,3 ± 8,0	4,1 ± 3,6	5,5 ± 7,1	52,5 ± 30,8

\*Média ± S. \*\*FDM= Focos Depletados de Mucina; RC=ração comercial; RCO= ração com café orgânico; RCC= ração com café convencional; DMH= 1,2-dimetilhidrazina; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético.

Tabela 13 - Resultados da análise do número de focos reduzidos de mucina e número de criptas por foco obtido da análise dos cólons do delineamento 2.

Grupo/ Tratamento	Número de ratos	Número de criptas aberrantes por foco reduzidos de mucina							Total FRM
		1	2	3	4	5	6	>=7	
(G1)RC+DMH**	10	0,3 ± 0,9*	1,5 ± 1,6	0,7 ± 1,3	0,7 ± 1,2	0,3 ± 0,7	0,1 ± 0,3	0,0 ± 0,0	3,6 ± 3,1
(G2)RCO 5%+DMH	10	1,1 ± 1,4	3,8 ± 4,0	5,1 ± 4,7	3,3 ± 3,1	1,6 ± 2,0	0,4 ± 0,7	0,0 ± 0,0	15,3 ± 14,4
(G3)RCO 10%+DMH	10	0,4 ± 0,7	3,1 ± 3,1	3,9 ± 2,9	2,7 ± 2,3	1,8 ± 1,3	0,5 ± 0,7	0,6 ± 1,0	13,0 ± 8,7
(G4)RCO 20%+DMH	10	0,2 ± 0,4	1,6 ± 2,4	1,3 ± 1,4	1,1 ± 1,6	0,4 ± 0,7	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,6	5,0 ± 5,4
(G5)RCO 4%+DMH	10	0,8 ± 0,9	3,7 ± 3,2	4,0 ± 5,2	2,1 ± 2,1	1,0 ± 1,3	0,4 ± 0,7	0,1 ± 0,3	12,1 ± 11,1
(G6)RCC 5%+DMH	10	0,4 ± 0,7	3,4 ± 3,7	2,5 ± 2,5	0,7 ± 1,3	0,4 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	7,4 ± 7,4
(G7)RCC 10%+DMH	10	0,9 ± 1,0	4,0 ± 4,2	5,3 ± 3,8	2,7 ± 1,9	1,2 ± 1,8	0,3 ± 0,7	0,2 ± 0,4	14,6 ± 10,6
(G8)RCC 20%+DMH	10	0,9 ± 0,7	4,1 ± 4,3	3,9 ± 5,4	2,0 ± 3,5	0,9 ± 1,5	0,5 ± 1,0	0,6 ± 1,6	12,9 ± 15,2
(G9)RCC 4%+DMH	10	0,5 ± 1,0	2,7 ± 4,5	4,1 ± 3,8	2,8 ± 3,1	0,9 ± 1,4	0,5 ± 0,7	0,7 ± 0,8	12,2 ± 12,2

\*Média ± S. \*\*FRM=Focos Reduzidos de Mucina. RC=ração comercial; RCO= ração com café orgânico; RCC= ração com café convencional; DMH= 1,2-dimetilhidrazina; EDTA: ácido etilenodiaminotetracético.

## 5.6 Estresse oxidativo

Os parâmetros analíticos obtidos nas análises de proteína e MDA estão apresentados na Tabela 14. Além disso, a fim de verificar a exatidão do método para determinação de peroxidação lipídica em amostras de fígado foi realizado teste de adição e recuperação nos fígados coletados aleatoriamente dos grupos G1, G4, G10 e G14 (Tabela 14). Os resultados obtidos mostraram que o método utilizado na determinação foi eficiente, uma vez que as recuperações encontram-se dentro da faixa de  $\pm 10\%$ , confirmando a exatidão da metodologia utilizada (HARRIS, 2005). As análises de estresse oxidativo dos fígados obtidos do delineamento experimental dois são apresentados na Tabela 15.

Tabela 14 - Parâmetros analíticos para determinação de proteína e MDA.

	LD (mg.L <sup>-1</sup> )	LQ (mg.L <sup>-1</sup> )	Coefficiente angular	Coefficiente linear	Coefficiente de correlação	Faixa Linear
Proteína	0,009	0,052	0,0919	0,0002	0,9524	0,052- 800( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ )
MDA	0,011	0,037	182,7	27,434	0,9939	0,037- 4,8( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )

Tabela 15 - Efeito do café orgânico e convencional nos níveis de MDA e PCO (n=4).

Group/Treatment	PCO (nmol.mg <sup>-1</sup> proteína)	MDA	
		( $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ proteína)	Recuperação (%)
(G1)RC+DMH**	4,32 $\pm$ 1,34 <sup>a</sup>	12,04 $\pm$ 1,51 <sup>a</sup>	95,0
(G2)RCO 5%+DMH	4,12 $\pm$ 1,79 <sup>a</sup>	7,12 $\pm$ 1,05 <sup>b</sup>	-
(G3)RCO 10%+DMH	2,32 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup>	6,80 $\pm$ 1,97 <sup>b</sup>	-
(G4)RCO 20%+DMH	3,81 $\pm$ 2,38 <sup>a</sup>	5,74 $\pm$ 2,07 <sup>b</sup>	98,6
(G5)RCO 4%+DMH	4,55 $\pm$ 1,28 <sup>a</sup>	11,09 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	-
(G6)RCC 5%+DMH	2,20 $\pm$ 1,27 <sup>a</sup>	6,90 $\pm$ 1,53 <sup>b</sup>	-
(G7)RCC 10%+DMH	4,25 $\pm$ 2,59 <sup>a</sup>	5,45 $\pm$ 2,91 <sup>b</sup>	-
(G8)RCC 20%+DMH	2,97 $\pm$ 1,56 <sup>a</sup>	5,04 $\pm$ 2,27 <sup>b</sup>	-
(G9)RCC 4%+DMH	4,48 $\pm$ 2,76 <sup>a</sup>	12,67 $\pm$ 1,65 <sup>a</sup>	-
(G10)RC+EDTA	3,50 $\pm$ 1,79 <sup>a</sup>	11,71 $\pm$ 1,53 <sup>a</sup>	102,0
(G11)RCO 20%+EDTA	4,26 $\pm$ 2,82 <sup>a</sup>	6,84 $\pm$ 2,34 <sup>b</sup>	-
(G12)RCO 4%+EDTA	2,88 $\pm$ 1,42 <sup>a</sup>	12,64 $\pm$ 2,36 <sup>a</sup>	-
(G13)RCC 20%+EDTA	3,24 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup>	7,07 $\pm$ 1,08 <sup>b</sup>	-
(G14)R CC 4%+EDTA	2,75 $\pm$ 1,62 <sup>a</sup>	11,22 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>	99,7

\*Média  $\pm$  Desvio padrão amostral. <sup>a,b</sup> Diferença estatística em cada coluna. ANAVA, seguido de teste de Tukey (p<0.05). RC = ração comercial, RCO = ração com café orgânico, RCC = ração com café convencional, PCO= carbonilas protéicas, MDA= malonaldeído; DMH= 1,2-dimetilhidrazina e EDTA= etilenodiaminotetraacetico de sódio.

A determinação de espécies químicas o cálculo dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) é utilizada para avaliar o desempenho do método analítico. Define-se o limite de detecção como a menor quantidade de analito detectável por um método, no entanto, sem precisão e exatidão satisfatórias. Podendo ser ainda definido como a menor quantidade que pode ser detectada estatisticamente diferente do branco. O limite de quantificação é mais adequado e traduz, com precisão e exatidão consideráveis, a menor quantidade do analito que pode ser medida na amostra.

Segundo a IUPAC (*International Union Pure and Applied Chemistry*) (AMC, 1987), matematicamente os cálculos referentes ao limite de detecção e quantificação baseiam-se na razão entre o desvio padrão obtido de dez leituras do branco e o coeficiente angular da curva analítica. Multiplicando-se o valor obtido por três obtém-se o LD e multiplicando-se por dez o LQ.

O estresse oxidativo tem sido definido como um distúrbio no estado de equilíbrio no sistema de pró-oxidantes e antioxidantes, nas células intactas. Esta definição implica no fato de que a célula deve ter um sistema em equilíbrio entre a produção e a eliminação de espécies reativas de oxigênio durante o metabolismo aeróbico, normal. Quando existe maior ocorrência de eventos oxidativos, o sistema pende para o lado pró-oxidativo, o que pode afetar os níveis de antioxidantes como a glutathione e a vitamina E, tendo, como resultado final o dano oxidativo em lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (VANNUCCHI et al., 1998).

Compostos bioativos que exercem efeitos contra os danos oxidativos são encontrados na bebida, dessa forma eles são conhecidos como compostos antioxidantes. Esses compostos interferem nos processos metabólicos na ativação de enzimas hepáticas e na detoxificação celular (MONTEIRO; TRUGO, 2005; STOPPER; ABRAHAM, 2004). Entre esses componentes pode-se citar cafeína, niacina, ácidos clorogênicos, quinídeos, ácido cafeico, elágico, kahweol e cafestol o qual variam de acordo com a espécie e manejo (MONTEIRO; TRUGO, 2005; HASEGAWA et al., 1995).

O fígado é órgão de processamento e síntese de substâncias que são transportadas para outras áreas do organismo. Esse órgão desempenha funções importantes no metabolismo sendo um bom representante das reações oxidativas, estando envolvido na biotransformação e eliminação de compostos químicos e estruturalmente diversos a que eventualmente o organismo possa estar exposto (OLIVEIRA, 2007).

Devido à importância deste órgão e sua ligação direta com as reações metabólicas do organismo, foram analisados os níveis de carbonilas protéicas (PCO) e malonaldeído (MDA) que são utilizados como indicadores do estresse oxidativo. Assim, avaliaram-se estes níveis presente nos fígados de animais que receberam café incorporado á ração na forma de pó (4% m/m) e infusos (5,10 e 20% m/v).

A oxidação protéica resulta do ataque das espécies reativas de oxigênio/nitrogênio nas estruturas das proteínas causando danos estruturais e funcionais destas, os quais podem ser avaliados através da adição de 1,2-dinitrofenilhidrazina (DNPH). A peroxidação lipídica produz vários compostos complexos e dentre estes os eletrofílicos são os mais reativos nas proteínas e DNA podendo resultar efeitos tóxicos e mutagênicos. O malonaldeído (MDA) é um dos principais compostos secundários que derivam de ácidos graxos poliinsaturados sendo altamente reativos na presença de proteínas, lipídeos e DNA (GONSEBATT et al., 2009).

Assim, foi avaliado o dano oxidativo por peroxidação lipídica através dos níveis de MDA e oxidação protéica através dos níveis de PCO. Os níveis de carbonilas protéicas não mostraram diferenças entre os grupos, verificando-se que a DMH e café orgânico e convencional, não produziram estresse além do que foi gerado espontaneamente, com um valor médio de  $3,55 \pm 1,83$  nmol PCO.mg<sup>-1</sup> de proteína. Os níveis de MDA não diferiram entre os grupos controle que receberam DMH e EDTA, com uma média de  $11,88 \pm 1,52$  mmol MDA.mg<sup>-1</sup> proteína. Apesar da geração de danos oxidativos pela DMH, os níveis de estresse oxidativo observados no controle positivo foram os mesmos que os gerados espontaneamente no controle negativo.

Estes resultados diferem de Rajeshkumar; Kuttan (2003), provavelmente devido à dose e o tempo de ação da DMH no estudo de 90 dias. Os autores citados acima administraram um total de 120 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corporal da DMH entre nos dias 45 e 69 do experimento, antes de sacrificar os animais, em contraste com os 160 mg.kg<sup>-1</sup> de peso corporal aplicados neste trabalho entre os dias 73 e 82 antes de sacrificar os animais em estudo. De acordo com Sengottuvelan et al. (2006) a DMH é capaz de aumentar metabólitos reativos de oxigênio em células de tumores em estágios iniciais, mas em fases posteriores da carcinogênese (neste estudo nos dias 69 e 82) pode diminuir a peroxidação lipídica das membranas e reduzir a produção de hidroperóxidos lipídicos. Assim, a utilização de DMH em fases posteriores da carcinogênese limitado a interpretação do efeito protetor contra danos oxidativos no presente estudo, pois o tempo não foi suficiente para manter o dano oxidativo detectável.

Quanto ao efeito da ingestão de café orgânico e convencional na peroxidação lipídica nos fígados dos animais, não foram observadas diferenças estatísticas em nenhum dos grupos que receberam café em pó na dieta quando comparados com os grupos controles (G1 e G2). Entretanto, os grupos que receberam ração incorporada com infusos tiveram seus níveis de MDA reduzidos, sendo estes estatisticamente diferentes dos grupos controles e dos grupos que receberam pó de café incorporado na ração. Pode-se sugerir que as rações com diferentes concentrações de infuso possuíam maior biodisponibilidade de compostos que os grupos alimentados com pó de café 4% (m/m). Assim essas dietas exerceram efeito protetor na peroxidação lipídica causada espontaneamente.

De acordo com Duarte et al. (2009) a ingestão de café na forma de infuso, ingerida durante trinta dias por gavagem, diminuiu a peroxidação lipídica. Dessa forma os autores consideram que o café tem efeito benéfico para a saúde.

A importância do desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende dos fatores: tipos radicais livres formados, onde e como são gerados esses radicais, análise e métodos para identificação dos danos e doses ideais para obter proteção. Assim, é perfeitamente possível que uma substância que possui antioxidante atue como protetor em um determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas ou tecidos, provocando um efeito conhecido como sinergismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998).

## **5.7 Parâmetros bioquímicos**

Avaliação dos parâmetros bioquímicos das amostras de sangue coletadas dos animais do delineamento experimental 2 encontra-se na Tabela 16.

Alguns compostos presentes no café possuem capacidade de reduzir os níveis de colesterol, glicose, triglicérides e uréia. O colesterol pode ter seus níveis reduzidos através da ingestão de niacina mais conhecida como vitamina B3, a qual está presente no café com cerca de 0,6 mg em uma xícara (MONTEIRO; TRUGO, 2005). Em contraste, outros estudos verificaram que a ingestão de café na forma de infuso, sem passar pelo processo de filtragem (tipo turco), provoca aumento nos níveis de colesterol.

Esse efeito é relacionado a presença de compostos como caveol e cafestol, presentes na fração lipídica do café (BOEKSCHOTEN et al., 2005).

Neste trabalho, não foram observadas alterações significativas dos parâmetros bioquímicos no plasma dos animais que ingeriram rações modificadas com café orgânico e convencional quando comparados com os grupos G1 (controle positivo) e G2 (controle negativo). Os níveis encontrados de colesterol, triglicérides, glicose, creatinina e uréia e a atividades das ALT e AST encontram-se dentro dos padrões normais observados em ratos *Wistar*. Segundo Nicols (2006) e Harkness; Wagner (1993) são aceitos como normais, valores dentro da faixa de 40 a 130 mg.dL<sup>-1</sup> para colesterol, 26 a 145 mg.dL<sup>-1</sup> para triglicérides, 50 a 135 para glicose, 0,2 a 0,8 mg.dL<sup>-1</sup> para creatinina, 15 a 21 para uréia mg.dL<sup>-1</sup>, 54 a 120 U.L<sup>-1</sup> para ALT e 57 a 166 U.L<sup>-1</sup> para AST.

Neste trabalho os níveis de creatinina e uréia não mostraram diferença significativa em relação ao controle mostrando que o café não alterou a função renal dos animais (SOARES et al., 2002).

Quanto à glicose, qualquer alteração dos seus mecanismos de controle pode conduzir a estados de hiper/hipoglicemia, sendo que esses mecanismos não foram influenciados pelo café em nenhuma das concentrações administradas (CHATTERJEE et al., 2005). Análises da atividade de ALT/AST permitem avaliar possíveis distúrbios no funcionamento do coração, fígado e músculo esquelético, sendo que os níveis observados neste trabalho confirmaram que a ingestão de café nas concentrações e formas aplicadas não provocou alterações nos teores dessas enzimas (VALKO et al., 2007).

Pode-se inferir que mediante resultados obtidos o café orgânico e convencional, nas concentrações aplicadas, não produziu patologias, disfunção renal ou hepática, capazes de afetar os níveis dos parâmetros bioquímicos analisados e que a interação com a dieta pode ter interferido na absorção de substâncias que poderiam alterar os níveis bioquímicos no plasma.

Tabela16 - Avaliação dos parâmetros bioquímicos das amostras de sangue coletadas de todos os animais do delineamento experimental 2.

<b>Grupos/Tratamentos</b>	<b>Número de ratos</b>	<b>Colesterol (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Creatinina (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Glicose (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Triglicerídeos (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Uréia (mg.dL<sup>-1</sup>)</b>	<b>ALT (TGP) (U RF.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>AST (TGO) (U RF.mL<sup>-1</sup>)</b>
(G1)RC+DMH**	9	39,13 ± 11,04*	0,54 ± 0,05	250,71 ± 20,73	75,86 ± 39,48	48,99 ± 5,26	66,00 ± 16,90	21,60 ± 3,10
(G2)RCO 5%+DMH	9	37,25 ± 07,02	0,54 ± 0,04	230,43 ± 23,59	77,57 ± 29,29	48,49 ± 7,44	63,25 ± 15,98	20,90 ± 5,74
(G3)RCO 10%+DMH	9	28,80 ± 08,42	0,55 ± 0,06	239,25 ± 24,39	75,89 ± 31,27	47,85 ± 4,05	70,88 ± 15,38	18,60 ± 4,27
(G4)RCO 20%+DMH	9	30,21 ± 05,23	0,53 ± 0,05	264,75 ± 26,56	59,71 ± 23,31	50,31 ± 6,63	57,11 ± 15,06	19,30 ± 5,74
(G5)RCO 4%+DMH	9	35,83 ± 05,98	0,51 ± 0,04	197,00 ± 29,15	53,83 ± 38,42	49,15 ± 5,81	66,63 ± 17,50	18,90 ± 4,91
(G6)RCC 5%+DMH	9	37,89 ± 11,71	0,61 ± 0,06	235,38 ± 47,43	57,00 ± 23,70	45,65 ± 6,08	77,86 ± 18,77	24,00 ± 8,62
(G7)RCC 10%+DMH	9	34,00 ± 11,60	0,56 ± 0,07	209,86 ± 31,25	64,14 ± 16,68	51,63 ± 6,00	70,00 ± 24,43	20,20 ± 5,20
(G8)RCC 20%+DMH	9	36,86 ± 06,23	0,58 ± 0,07	253,00 ± 29,78	74,25 ± 24,14	45,70 ± 5,16	70,14 ± 19,84	19,60 ± 7,46
(G9)RCC 4%+DMH	9	35,29 ± 07,65	0,56 ± 0,06	184,75 ± 27,65	48,25 ± 23,73	47,30 ± 8,74	95,43 ± 30,20	23,13 ± 8,22
(G10)RC+EDTA	9	31,33 ± 04,92	0,56 ± 0,04	263,86 ± 53,80	68,75 ± 14,18	49,93 ± 4,16	56,63 ± 21,84	17,20 ± 4,18
(G11)RCO 20%+EDTA	9	35,80 ± 06,05	0,55 ± 0,03	271,38 ± 42,33	50,75 ± 35,29	46,97 ± 5,18	59,22 ± 16,85	17,00 ± 4,45
(G12)RCO 4%+EDTA	9	40,10 ± 11,02	0,56 ± 0,05	220,13 ± 22,66	48,00 ± 18,01	51,00 ± 3,32	87,14 ± 27,54	16,64 ± 7,15
(G13)RCC 20%+EDTA	9	32,29 ± 13,18	0,55 ± 0,06	260,63 ± 44,87	56,57 ± 34,67	46,14 ± 5,67	63,78 ± 18,06	18,00 ± 5,06

\*Média ± Desvio padrão amostral.

## 6 CONCLUSÕES

Mediante análises realizadas, conclui-se que a melhor forma de aplicar o café em estudos *in vivo* de longa duração é a incorporação do café a ração comercial, uma vez que não se necessita de preparação diária, permite aplicação de maiores concentrações de café e garante a homogeneidade experimental sem produzir desgaste aos animais.

Quanto ao estudo do café orgânico e convencional, conclui-se que o pó de café convencional mostrou diferença significativa quanto aos maiores teores de Cu, Fe e Zn em relação ao café orgânico, determinando que a fertilização, tanto à base de matéria orgânica como química, tenha influência direta na composição do alimento.

Entretanto, os infusos 10% (m/v) consumidos pela maioria da população, obtidos de ambos os manejos, não apresentaram diferenças na composição mineral e centesimal, mas tiveram teores mais altos de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina no manejo orgânico. Além disso, o infuso na maior concentração de pó (20% m/v) apresentou diferença no teor de Zn para o manejo orgânico, apesar dos menores níveis desse elemento no pó de café. Essa diferença nos níveis de Zn foi provavelmente devido a relação soluto/solvente durante a extração.

Apesar das diferenças químicas entre os manejos, os cafés na forma de infuso, em todas as concentrações utilizadas, tiveram efeito antioxidante verificado através da redução de MDA. Entretanto, não foram capazes de provocar proteção/lesão nos cólons. Além disso, não produziram alterações significativas no teor de minerais dos fígados, nem nos níveis de uréia, creatinina, colesterol, triglicérides, glicose, AST e ALT.

As possíveis interações de compostos presentes no café, orgânico e convencional, citadas na literatura não foram capazes de alterar a distribuição de Cu, Fe e Zn hepático. Quanto aos efeitos benéficos registrados na literatura, estes são dependentes de doses, animais, interação com a dieta, entre outros. Acredita-se que outros delineamentos experimentais possam verificar melhor esses benefícios e o estudo em humanos seria essencial para confirmação final dos efeitos benéficos ou colaterais da ingestão de café para a saúde.

Dessa forma, a ingestão de café orgânico e convencional apresentou os mesmos benefícios à saúde dos animais pela redução no nível de estresse oxidativo, apesar das variações nos teores de minerais e compostos orgânicos entre os pós e infusos.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. K. Anti-genotoxic effects in mice after the interaction between coffee and dietary constituents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 15 - 20, 1996.
- ABRAHAM, S. K. et al. *In vivo* anti-genotoxicity effects of dietary agents and beverages co-administered with urethane: assessment of the role of glutathione S-transferase activity. **Mutation Research**, v. 413, p. 103 – 110, 1998.
- ABRAHAM, S. K.; SINGH, S. P. Anti-genotoxicity and glutathione S-transferase activity in mice pretreated with caffeinated and decaffeinated coffee. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 733 - 739, 1999.
- ALFIERI, M. A. et al. selenium and zinc levels in surgical patients receiving total parenteral nutrition. **Biological Trace element Research**, v. 61, n. 1, p. 33 - 39, 1998.
- ALVES, S. T. et al. Method for simultaneous analysis of nicotinic acid, trigonelline, chlorogenic acid and caffeine in roasted coffee by Liquid Chromatography with High efficiency. **Química Nova**, v. 29, p. 1164 - 1168, 2006.
- ALVES, B. H. P. et al. Composição química de cafés torrados do cerrado e do Sul de Minas Gerais. **Ciência & Engenharia**, v. 16, p. 9 – 15, 2007.
- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE – AMC (Estados Unidos). Recommendation for definition, estimation and use of the detection limit. **Analyst**. v. 112. p. 199 - 204, 1987.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA (Brasil). Testes toxicológicos para produtos químicos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br> . Acesso em 12 dez. 2010(a).
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA (Brasil). Valores nutricionais do pó de café torrado e moído. Ministério da saúde. [www.anvisa.org.br](http://www.anvisa.org.br), acesso em dez. 2010(b).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (Estados Unidos). Official methods of analysis AOAC. 17.ed. Maryland, 2000.
- APPENZELLER, L. M. et al. Subchronic feeding study of herbicide-tolerant soybean DP-356Ø43-5 in Sprague-Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 2201 - 2213, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC. Indicadores da indústria de café do Brasil. Disponível em: [www.abic.com.br](http://www.abic.com.br). Acesso em: 01 mai. 2010.
- BANNASCH, P. Preneoplastic lesion as end-points in carcinogenicity testing. **Carcinogenesis**, v. 7, p. 689 - 95, 1986.
- BELL, L.N. et al. Caffeine content in coffee as influenced by grinding and brewing techniques, **Food Research International**, v. 29, n. 8, p. 785-789, 1996.

BIRD, R. P. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. **Cancer Letters**, v. 93, p. 55 - 71, 1995.

BIRD, R. P. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. **Cancer Letter**, v. 37, p. 47-151, 1987.

BIRT, D. F. Update on the effects of vitamins A, C and E and selenium on carcinogenesis. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 183, n. 3, p. 311-320, 1986.

BOEKSCHOTEN, M. V. et al. Coffee oil consumption increases plasma levels of 7 alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one in humans. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 785 - 799, 2005.

BOURN, D.; PRESCOTT, J. A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, p. 1 - 34, 2002.

BRADFORD, M. N. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 - 254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2007.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1994.

BROWN, R. K. et al. Peroxides and other products. In: PUNCHARD, N.A.; KELLY, F.J. (Ed.). **Free radicals: a practical approach**. New York: IRL, p.119 - 131, 1996.

BURTIS, C. A. et al. **Tietz textbook of clinical chemistry**. 6.ed.rev. Philadelphia: W.B. Saunders Elsevier, 2008.

CADERNI, G. et al. Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 63, p. 2388 - 2392, 2003.

CAMPA, C. et al. Qualitative relationship between caffeine and chlorogenic acid contents among wild *Coffea* species. *Food Chemistry*, v. 93, p. 135-139, 2005.

CAVIN, C. et al. Cafestol and Kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1155 - 1163, 2002.

CHARTTERJEE, S. et al. A modified, economic, sensitive method for measuring total antioxidant capacities of human plasma and natural compounds using Indian saffron (*Crocus sativus*). **Clinica Chimica Acta**, v. 256, p. 2835 - 2838, 2005.

CHINTHALAPALLY, V. R. et al. Prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inulin and pectin. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 10, p. 1815 - 1819, 1998.

CHRISTENSEN, B. et al. Abstention from filtered coffee reduces the levels of homocysteine and cholesterol- a randomized, controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 302 - 307, 2001.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates- nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 79, p. 363 – 372, 1999.

COELHO, R. I. et al. Estado nutricional e características de crescimento do abacaxizeiro jupi cultivado em latossolo amarelo distrófico em função da adubação com NPK. **Ciências Agrotécnicas**, v. 31, n. 6, p. 1696-1701, nov./dez., 2007.

CORPET, D. E. et al. Promotion of colonic microadenoma growth in mice and rats fed cooked sugar and cooked casein and fat. **Cancer Research**, v. 50, p. 6955 - 6958, 1990.

DEVASAGAYAM, T. P. A. et al. Caffeine as an antioxidant: Inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 1282, p. 63 – 70, 1996.

DIAS, M. C. et al. Lack of chemopreventive effects of ginger on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 877 - 884, 2006.

DIAS, M. C. et al. Effects of lycopene, symbiotic and their association on early biomarkers of rat colon carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 772 - 780, 2010.

DOREA, J. G.; DA COSTA, H. M. Is coffee a functional food? **British Journal Nutrition**, v. 93, p. 773 – 782, 2005.

DOULL, J. et al. Report of an Expert Panel on the reanalysis by Seralini et al. (2007) of a 90-day study conducted by Monsanto in support of the safety of a genetically modified corn variety (MON 863). **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, p. 2073–2085, 2007.

DUARTE, M. P. et al. Genotoxicity of instant coffee: possible involvement of phenolic compounds. **Mutation Research**, v. 442, p. 43 - 51, 1999.

DUARTE, S. M. S. et al. Efeito da bebida de café descascado sobre a atividade antioxidante, os parâmetros hematológica e bioquímicos em ratos. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 703-708, out./dez., 2009.

EYMARD, S. et al. Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. **Food Chemistry**, v. 114, p. 57 - 65, 2009.

FANG, Y. Z. et al. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

FEMIA, A. P. et al. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 277 - 281, 2004.

FENOGLIO-PREISER, C. M.; NOFFSINGER, A. Aberrant crypt foci: a review. **Toxicol. Pathol.**, v. 27, p. 632-42, 1999.

FILHO, P. F. et al. **Café: (Re)conquista do mercado**. Rio de Janeiro: BNDES Setorial, n. 10, 1999, p. 56.

FILHO, R. D. S. et al. Fatores de Risco para Doença Cardiovascular: Velhos e Novos Fatores de Risco, Velhos Problemas ! **Arq. Bras. Endocrinological Metabolism**, v. 46, n.3, Jun. 2002.

GARCIA, G. S. **Avaliação do desenvolvimento de girassol por meio de análise de proteínas e metaloproteínas (2006)**. Tese (Doutorado), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GLICK, P. L. et al. Colon interposition an adjuvant operation for short-gut syndrome. **Journal Pediatr. Surg.**, v. 19, p. 719-25, 1984.

GONSEBATT, M. E. et al. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, p. 137-147, 2009.

GRIOLO, B. et al. copper/zinc superoxide dismutase expression by different human osteosarcoma cell lines. **Anticancer Research**, Athens, v. 18, n. 2A, p. 1175-1180, 1998.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Biologically relevant metal ion-dependent OH<sup>•</sup> generation. An update. **FEBS Letters**. v. 307, p. 108 - 116. 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University. 3.ed. 1998.

HAMBLY, R. J. et al. Influence of diets containing high and low risk factors for colon cancer on early stages of carcinogenesis in human flora-associated (HFA) rats. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 1535 - 1539, 1997.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biologia Clínica de coelhos e roedores**, 3.ed. São Paulo: Rocca, 1993.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**, 6.ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos, 2005.

HASEGAWA, R. et al. Analysis of the potential carcinogenicity of Coffee and related compounds in a medium-term liver bioassay of rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 1, p. 15 - 20, 1995.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 46, p. 101 - 123, 2006.

HIGGINS, L. G. et al. Induction of cancer chemopreventive enzymes by coffee is mediated by transcription factor Nrf2. Evidence that the coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol confer protection against acrolein. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 226, p. 328 - 337, 2008.

HOFFMAN-GOETZ, L. Physical activity and cancer prevention: animal-tumor models. **Medical Science Sports Exercise**, v. 35, p. 1828 - 1833, 2003.

HYON, K. C.; GARY, C. Coffee, Tea, and Caffeine Consumption and Serum Uric Acid Level: The Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)**, v. 57, n. 5, p. 816 - 821, junho, 2007.

INUI, A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management, **CA Cancer Journal of Clinical**, v. 52, p. 72, 2002.

JORDAN, C. F. Organic farming and agroforestry: Alleycropping for mulch production for organic farms of southeastern United States. **Agroforestry Systems**, v. 61, p. 79 - 90, 2004.

JORDÃO, A. M. et al. Evolução das antocianidinas e protocianidinas ao longo da maturação das uvas tintas das castas touriga francesa e castelão francês. In: Actas do 4º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo, v. 4, p. 167 - 174, 1998. **Actas...**

JORHEM, L. et al. Copper and iron in foods by atomic absorption spectrometry after microwave digestion: NMKL collaborative study. **Journal of OAC International**, v. 83, n. 5, p. 1189 - 1203, 2000.

KLIMÁNKOVÁ, E. et al. Aroma profiles of five basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown under conventional and organic conditions. **Food Chemistry**, v. 107, p. 464 - 472, 2008.

KOLAILY, S. et al. Does caffeine bind to metal ions? **Food chemistry**, v. 84, p. 383-388, 2004.

KORN, M. G. A. et al. A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, v. 78, p. 1378 - 1382, 2009.

LARANGEIRA, L. L. S. et al. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 13, n.3, p. 00-00, 2006.

LAMB, E. J. et al. Creatinina, uréia e ácido úrico. In: BURTIS CA, ASHWOOD ER. **Tietz textbook of clinical chemistry**. 6.ed.rev. Philadelphia: W.B. Saunders Elsevier, 2008.

LIMA, R. O. A. et al. Avaliação do efeito do própolis contra o DMH. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 45, p. 8-16, 2005.

LIMA, D. R. Café e saúde. Disponível em: <http://www.cafeesaude.com.br/cafeesaude.htm> . Acesso em 20 dez. 2010.

MAGKOS, F. et al. Organic food: buying more safety or just peace of mind? A critical review of the literature. **Critical Review Food Science Nutrition**, v. 46, p. 23 – 56, 2003

MALGORZATA, G. et al. Differentiation of market coffee and its infusions in view of their mineral composition. **Science of the Total Environment**, v. 383, p. 59 – 69, 2007.

MALTA, M. R. et al. Qualidade sensorial do café de lavouras em conversão para o sistema de produção orgânico. **Bragantia**, v. 67, n. 3, p. 775 - 783, 2008.

MCLELLAN, E. A. et al. Dose response and proliferative characteristics of aberrant crypt foci: Putative preneoplastic lesions in rat colon. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 2093-98, 1991(a).

MCLELLAN, E. A. et al. Sequential analysis of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. **Cancer Research**, v. 51, p. 5270-74, 1991(b).

MCGARRITY, T. J. et al. Cellular proliferation in proximal and distal rat colon during 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 95, p. 343-8, 1988.

MICHELS, K. B. et al. Coffee, tea, and caffeine consumption and incidence of colon and rectal cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 4, p. 282 - 292, 2005.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determination of bioactive compounds in Brazilian roasted coffees. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 637 - 631, 2005.

MONTOYA R. G.; WARGOVICH M. J. Chemoprevention of gastrointestinal cancer. **Cancer Metastasis Ver.**, v. 16, p. 405-19, 1997.

MORAIS, S. A. L. et al.. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Ciência Tecnologia dos Alimentos**, v. 28, p. 198 - 207, 2008.

MORGANO, M. A. et al. Determinação de minerais em café cru. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 19 - 23, 2002.

NASCIMENTO, P. M. **Estudo da composição química, atividade antioxidante e potencial odorífico de um café conillon, em diferentes graus de torrefação e análise comparativa com café arábica (2006)**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

NARDINI M, et al. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. **Journal of Agricultural Food and Chemical**, v. 50, p. 5735 – 5741, 2002.

NICHOLS, J. B. **Veterinary Services**. Florica: Florida Atlantic University, mai. 2003.

NOGUEIRA, F. N.. **Sistema antioxidante e peroxidação lipídica em glândulas salivares em ratos diabéticos**. 2004. 71p. Dissertação (Doutorado) Faculdade de odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OKAMURA, S. et al. The effects of coffee on conjugation reactions in human colon carcinoma cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 2, p. 271 - 274, 2005.

OLIVEIRA, E. M. S. **Efeito modulador do café sobre a carcinogênese hepática induzida em ratos (2007)**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PANTEGHINI, M; BAIS, R. Enzimas. In: BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. 6.ed.rev. Philadelphia: W.B. Saunders Elsevier, 2008.

PITOT, H. C. The terminal stage in carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 80, p. 599-607, 1989.

PATTONO, D. et al. Presence of synthetic antioxidants in organic and conventional Milk. **Food Chemistry**, v. 115, p. 285-289, 2009.

PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v. 72, p. 962-70, 1993.

PITOT, H. C. et al. A method to quantitate the relative initiating and promoting potencies of hepatocarcinogenic agents in their dose-response relationships to altered hepatic foci. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1491-9, 1987.

PIRES, N. M. et al. Adubação orgânica e mineral sobre a composição química das folhas de maracujazeiro amarelo. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 3, p. 36 - 48, 2009.

PLA, M. et al. Prediction of fatty acid content in rabbit meat and discrimination between conventional and organic production systems by NIRS methodology. **Food Chemistry**, v. 100, p. 165–170, 2007.

PRAT, M. L. et al. Ultrassound-assisted extraction for rapid determination of Zn, Cu, Fe, Mg and Mn in liver of diabetic rats under different antioxidant treatments. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis**, v. 49, p. 1040-1044, 2009.

PRETLOW, T. P. et al. Aberrant crypt correlate with tumor incidence in f344 rats treated with azoxymethane and phitrate. **Carcinogenesis**, v. 13, p. 1509 - 1512, 1992.

POTTEN, C.S. et al. Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrostinal epithelium. **Stem Cells**, v.15, p. 82 - 93, 1997.

RABELLO-GAY, M.N. et al. The effects of age, sex and diet on the clastogenic action of cyclophosphamide in mouse bone marrow. **Mutation research**, v. 158, p. 181 - 188, 1985.

RAJESHKUMAR, N. V.; KUTTAN, R. Modulation of carcinogenic response and antioxidant enzymes of rats administered with 1,2-dimethylhydrazine by Picroliv. **Cancer Letters**, v. 191, p.137–143, 2003.

RAMEL, C. General environmental modifiers of carcinogenesis. **Acta Pharmacological Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 181-196, 1984.

RAMOS, M. E. **Efeito protetor do café sobre a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos desnutridos (2007)**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

REGLERO, M. M. et al. Heavy metal exposure in large game from a lead minning área: Effects on oxidative stress and fatty acid composition in liver. **Enviromental Poluition**, v.1 57, p. 1388 - 1395, 2009.

RIBEIRO, L.R. et al. **Mutagenese Ambiental**. Ed ULBRA, 2003.

RIFAI, N. et al. Lipídeos, lipoproteínas, apolipoproteínas e outros fatores de risco cardiovascular. In: Burtis CA et al., Ashwood ER. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. 6rd rev edn. Philadelphia: W.B. Saunders Elsevier Company. 2008.

RIVERA, E. A. B. et al. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002.

SANTOS, J. S. et al.. Evaluation of some metals in Brazilian coffees cultivated during the process of conversion from conventional to organic agriculture. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1405 – 1410, 2009.

SANTOS, J. S. et al. Comparative Study of metal contents in Brazilian Coffees Cultivated by Conventional and Organic agriculture applying principal component analysis. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 1468 - 1476, 2010.

SCHMELZ, E. M. et al. Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1,2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 522 -527, 2000.

S´CIBIOR, A. et al. Selected Haematological and Biochemical Parameters of Blood in Rats After Subchronic Administration of Vanadium and/or Magnesium in Drinking Water. **Arch. Environmental Contaminants Toxicology**, v. 51, p. 287 – 295, 2006.

SACKS, D. B.; PATH, F. R. C. Carboidratos. In: Burtis CA, Ashwood ER. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. 6rd rev edn. Philadelphia: W.B. Saunders Elsevier, 2008.

SENGOTTUVELAN, M. et al. Modulatory influence of dietary resveratrol during different phases of 1,2-dimethylhydrazine induced mucosal lipid-peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis. **Biochimica Biophysical Acta**, v. 1760, p. 1175 – 1183, 2006.

SHIRTLIFF, N.; BIRD, R. P. Growth features of aberrant crypt foci that resist modulation by cholic acid. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 2093 - 2096, 1996.

SILVA, F. et al. Avaliação bioquímica dos efeitos do pré-condicionamento isquêmico após isquemia e reperfusão hepática em ratos. **Revista Colonoscopia Brasileira Cirurgica**, v. 33, n.6, nov/dez, 2006.

SILVA, R. F. et al. Composição Centesimal e perfil de aminoácidos de arroz e pó de café. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 325 - 330, jul./set., 2007.

SILVA, J. S. et al. Adenomas Colorretais: Fatores de Risco Associados à Displasia de Alto Grau. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 29, n. 2, p. 209 - 215, 2009.

SIVETZ, M.; DESROSIER, N. M. Physical and chemical aspects of coffee. **Coffee technologies**, Westpor, v. 60, p. 527-575, 1979.

SMITH, T. K. et al. Effects of Brassica vegetable juice on the induction of apoptosis and aberrant crypt foci in rat colonic mucosal crypts *in vivo*. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 3, p. 491 - 495, 2003.

SOARES, J. L. M. F. et al. **Métodos diagnósticos-Consulta Rápida**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

STOPPER, H.; ABRAHAM, S. K. Anti-genotoxicity of coffee against N-methyl-N-nitro-N-itosoguanidine in mouse lymphoma cells. **Mutation Research**, v. 561, p. 23 – 33, 2004.

SUNG, H. Y.; CHOI, Y. S., Frutooligosaccharide and soy Isoflavone suppress colonic aberrant crypt foci and cyclooxygenase-2 expression in dimethylhydrazine-treated rats, **Journal of medicine food**, v. 11 n. 1, p. 78 - 85, 2008.

SZPUNAR, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 54 - 55, 2004.

TAKENAKA, M. et al. Characterization of a metal-chelating substance in coffee. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 69, p. 26 - 30, 2005.

TAO, K. et al. The multifaceted mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on liver. **Medical Hypotheses**, v. 71, p. 730 - 736, 2008.

TRUGO, L. Ph.D. Thesis: **High Performance Liquid Chromatography in coffee analysis** (1984). Tese (pós-doutorado), University of Reading, England.

TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchange and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 365, p. 147 - 159, 1996.

UNICAMP. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentos. Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos. Campinas, **2006**. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/home.php?ativo=home>. Acesso 22 dez. 2010.

UNIFESP. Universidade Federal de São Paulo - Disciplina de Neurologia Experimental. <http://www.unifesp.br/dneuro/nexp/riboflavina/d.htm> . Acesso em janeiro de **2011**.

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

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURAL - USDA. International Food Composition Resources. [http://fnic.nal.usda.gov/nal\\_display/index.php?info\\_center=4&tax\\_level=1&tax\\_subject=242](http://fnic.nal.usda.gov/nal_display/index.php?info_center=4&tax_level=1&tax_subject=242) Acesso em 10 dez. **2010**.

VALKO, M. et al. Free Radical and antioxidants in normal physiological functions and humans disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VANNUCCHI, H. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 31, p. 434-449, jul./set., 1998.

VITORINO, M. D. et al. Metodologia de obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos não-voláteis. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 3, p. 17 - 24, 2001.

WANG, R. et al. Protective versus promotional effects of White tea and caffeine on PhIP-induced tumorigenesis and  $\beta$ -catenin expression in the rat. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 4, p. 834 - 839, 2008.

WELCH, K. D. et al. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radicals Biology Medical**, v. 32, p. 577 - 583, 2002.

WOJTKOWSKI, P. A. **Introduction to agroecology: principles and practices**. New York: Haworth Food & Agricultural Products Press, v. 404, 2006.

ZAKRZEWSKI, S. F. **Principles of environmental toxicology**. 2 Ed. Oxford: American Chemical Society, p. 352, 1997.