

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**MÁRIO HENRIQUE SOUZA SIMÕES**

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DOS  
EFEITOS DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE FOLHAS DO CAFEEIRO (*Coffea  
arabica*) SOBRE O PERFIL LIPÍDICO, ESTRESSE OXIDATIVO E AGREGAÇÃO  
PLAQUETÁRIA EM RATOS DISLIPIDÊMICOS**

Alfenas/MG

2014

**Mário Henrique Souza Simões**

**CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO  
HIDROETANÓLICO DE FOLHAS DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica*) SOBRE O PERFIL LIPÍDICO,  
ESTRESSE OXIDATIVO E AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA EM RATOS DISLIPIDÊMICOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula.

Alfenas/MG

2014

Simões, Mário Henrique Souza.

Caracterização de compostos bioativos e avaliação dos efeitos do extrato hidroetanólico do cafeeiro (*Coffea arabica*) sobre o perfil lipídico, estresse oxidativo e agregação plaquetária em ratos dislipidêmicos / Mário Henrique Souza Simões. - Alfenas, 2014. 64 f. -

Orientador: Fernanda Borges de Araújo Paula  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.  
Bibliografia.

1. Coffea. 2. Dislipidemias. 3. Aterosclerose. 4. Estresse Oxidativo. I. Paula, Fernanda Borges de Araújo. II. Título.

CDD: 615.321

MÁRIO HENRIQUE SOUZA SIMÕES

CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO  
HIDROETANÓLICO DE FOLHAS DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica*) SOBRE O PERFIL LIPÍDICO,  
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA EM RATOS DISLIPIDÊMICOS

A Banca examinadora abaixo-assinada,  
aprova a Dissertação apresentada como  
parte dos requisitos para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas pela Universidade Federal  
de Alfenas.

Aprovada em: 29/10/2014

Prof.: *Alexsandra dos Santos Damazini Silveira*

Instituição: *Unifenas*

Assinatura:



Prof.: *Fernanda Borges de Araújo Paula*

Instituição: *Unifal - MG*

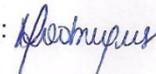
Assinatura:



Prof.: *Márcia Rita Rodrigues*

Instituição: *UNIFAL-MG*

Assinatura:



Dedico aos meus pais, meus irmãos e a toda minha família, que são minha base e minha vida, em todo os momentos, sempre juntos. Agradeço a Deus, por atender minhas preces e estar sempre ao meu lado, iluminando meus caminhos.

Aos funcionários do laboratório pela força e prontidão que sempre precisei, em especial a Eliana pessoa que me ensinou grandes valores e com quem pude sempre contar e ao Bruno um amigo fiel e companheiro com quem pude contar nesta jornada, deixo aqui meus sinceros agradecimentos

Aos meus pais, José Américo Oliveira Simões e Lenira Cássia Souza Simões, razão da minha vida, minha base, meu alicerce, meu porto seguro, sempre. Por todo apoio e por acreditar em mim, em meu potencial, me dando forças para seguir em frente sem temer os obstáculos. A minha querida namorada Úrsula Liy Pinto Pólvora André, por todos os conselhos, carinho e amor, por acreditar que tudo é possível.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Alfenas por me acolher e oferecer esta grande oportunidade em minha carreira.

A todos os professores que participaram direta e indiretamente do meu trabalho, contribuindo para minha formação. Especialmente aos professores Dr. Marcelo Aparecido, profa. Dra. Stella, profa. Dra. Maria Rita Rodrigues, profa. Dra. Vanessa Bergamin e profa. Dra. Maísa Brigagão pelos ensinamentos, contribuindo na realização deste trabalho.

A todos os alunos de iniciação científica que ajudaram na realização deste estudo, especialmente a Carolina e Krissia, a contribuição de vocês foi fundamental.

A todos os técnicos do laboratório, especialmente a Eliana, pelo apoio e paciência, quando o laboratório estava uma bagunça, ajudando em todos os momentos.

Ao amigo Bruno, por ter me ensinado tudo, me ajudado em todos os momentos, desde minha entrada no laboratório até minha defesa. Sua ajuda foi fundamental, nunca vou esquecer de tudo que fez por mim. Minha eterna gratidão.

Ao amigo Luis Felipe e Bruno Faria, por ter me apoiado, me ajudado nos momentos difíceis, pelos seus ensinamentos e conselhos. Minha eterna gratidão.

Aos membros da banca avaliadora, pela disponibilidade em participar e contribuir para finalização da minha dissertação.

Finalmente agradeço a minha orientadora, profa, Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula, por ter me acolhido em seu laboratório, por ter acreditado em mim e me ajudado de todas as formas, fazendo possível a realização deste trabalho, obrigado por me mostrar com bom e gratificante é a vida de pesquisador e professor. Ensinamentos que levarei para a vida toda.

## RESUMO

A aterosclerose tem ocupado um lugar de destaque entre os fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, que por sua vez, constituem uma das principais causas de morte no mundo. As dislipidemias, o estresse oxidativo e a ativação plaquetária são importantes fatores de risco para aterosclerose. Sendo assim, o uso de hipolipemiantes em associação com antioxidantes, anticoagulantes, antiagregantes plaquetários, anti-inflamatórios ou vasodilatadores, têm sido sugerido no controle e até mesmo na prevenção do processo aterosclerótico. Assim como a bebida de café, as folhas do cafeeiro apresenta uma composição química diversificada, contendo diferentes substâncias químicas, alguns associados com a saúde humana, como o ácido clorogênico. O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar o potencial antioxidante do extrato seco de folhas de *Coffea arabica* bem como seus possíveis efeitos sobre o perfil lipídico, função hepática, função renal e a agregação plaquetária em ratos dislipidêmicos. As folhas coletadas foram submetidas à secagem em estufa, pulverizadas em moído de facas e o extrato foi obtido através do método de extração exaustivo de percolação simples em solução hidroalcoólica 70% (V/V), seguida de evaporação sob pressão reduzida e liofilização. A triagem fitoquímica foi realizada através da determinação da concentração de fenóis método de Folin & Ciocalteu e da análise do extrato por espectrometria de massas, com ionização por *electrospray*, no modo negativo e positivo. O potencial antioxidante *in vitro* foi avaliado através da determinação da capacidade sequestrante de radicais DPPH. Ratos "Wistar" machos (300 ± 25g), foram divididos em quatro grupos: controle, extrato, dislipidêmico e dislipidêmico-extrato, sendo que os dois últimos receberam Triton WR-1339, via i.p. para indução da dislipidemia. Os níveis séricos de uréia, colesterol total, triglicérides e colesterol HDL foram determinados por métodos enzimáticos e a concentração de creatinina foi determinada pelo método do picrato alcalino. A atividade de AST e ALT foi determinado pelo método de Reitman e Frankel e a atividade de fosfatase alcalina pelo método de Roy modificado. A peroxidação lipídica foi determinada no plasma e em homogeneizados de aorta por meio da determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por fluorimetria. A agregação plaquetária foi avaliada em plasma rico em plaquetas por turbidimetria. A concentração de fenóis totais foi igual a 6,817 ± 0,133 g EAG/100 g de extrato. O

conjunto de dados fornecidos pelo espectro de massas sugeriu que o extrato em estudo possui em sua composição compostos fenólicos como o ácido quínico, a rutina e o ácido clorogênico. O extrato apresentou atividade sequestrante de radicais DPPH máxima de 90,1%, na concentração de 0,16 mg/ml, comparável aos padrões BHT (95,5%) e ácido gálico (88,2%). Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de uréia e creatinina bem como nas atividades de AST, ALT e fosfatase alcalina. Os animais tratados com Triton WR 1339 apresentaram um aumento nos níveis séricos de colesterol (CT) e de triglicérides, na concentração de TBARS no plasma e na aorta bem como na agregação plaquetária. O grupo de animais tratados com o extrato não foi capaz de induzir alterações no perfil lipídico, mas apresentou uma redução significativa na concentração de TBARS e na agregação plaquetária em comparação com os animais dislipidêmicos não tratados com o extrato. Estes resultados sugerem que o extrato em estudo pode apresentar um efeito benéfico sobre a prevenção da aterosclerose, por prevenir o aumento da peroxidação lipídica no plasma e na aorta bem como a agregação plaquetária em ratos dislipidêmicos.

Palavras-chave: Coffea. Dislipidemias. Aterosclerose. Estresse Oxidativo.

## ABSTRACT

Atherosclerosis has occupied a prominent place among the risk factors for developing cardiovascular disease, which in turn, constitute a major cause of death worldwide. Dyslipidemias, oxidative stress and platelet activation are important risk factors for atherosclerosis. Thus, the use of statins in combination with antioxidants, anticoagulants, antiplatelet, antiinflammatory or vasodilators has been suggested to control and even prevent atherosclerotic processes. As the coffee beverage, its leaves has a diversified chemical composition, containing different chemicals, some associated with human health, such as chlorogenic acid. This work has as main objective to evaluate the antioxidant potential of dried extract of leaves of *Coffea arabica* and its possible effects on the lipid profile, liver function, renal function and platelet aggregation in dyslipidemic mice. The collected leaves were dried in an oven, pulverized in a Wiley mill and the extract was obtained by the method of exhaustive extraction of simple percolation in water-alcohol solution 70% (V / V), followed by evaporation under reduced pressure and lyophilization. Phytochemical screening was done by determining the concentration of phenols Folin & Ciocalteu and analysis of the extract by mass spectrometry with electrospray ionization in negative and positive ways. The antioxidant potential in vitro was assessed by determining the ability of scavenging DPPH radicals. Rats "Wistar" rats ( $300 \pm 25\text{g}$ ) were divided into four groups: control, extract, extract-dyslipidemic and dyslipidemic, with the latter two received Triton WR-1339, ip To induce dyslipidemia. Serum urea, total cholesterol, triglycerides and HDL cholesterol were determined by enzymatic methods and creatinine concentration was determined by the alkaline picrate method. The activity of AST and ALT were determined by the method of Reitman and Frankel and alkaline phosphatase activity by the method of Roy with modifications. Lipid peroxidation was determined in plasma and aortic homogenates by determining the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) by fluorimetry substances. Platelet aggregation was evaluated in platelet-rich plasma by turbidimetry. The concentration of total phenols was equal to  $6.817 \pm 0.133$  g EAG/100 g of extract. The data set provided by the mass spectrum suggested that the extract under study has in its phenolic composition as quinic acid, rutin and chlorogenic acid. The extract showed maximum scavenging activity of DPPH radicals of 90.1% at a concentration of 0.16 mg / ml, comparable to BHT standards (95.5%) and gallic acid (88.2%). No

significant change was observed in the levels of urea and creatinine as well as in AST, ALT and alkaline phosphatase activities. The animals treated with Triton WR 1339 showed an increase in serum levels of cholesterol (TC) and triglycerides in TBARS concentration in plasma and aorta as well as platelet aggregation. The group of animals treated with the extract was not able to induce changes in the lipid profile, but showed a significant decrease in TBARS concentration and platelet aggregation compared with dyslipidemic animals not treated with the extract. These results suggested that the extract study has a beneficial effect on the prevention of atherosclerosis by preventing the increase in lipid peroxidation in plasma and aorta as well as platelet aggregation in dyslipidemcs rats.

Keywords: Coffea. Dyslipidemias. Atherosclerosis. Oxidative Stress

## LISTA DE ABREVIATURAS

- DCV** – doenças cardiovasculares
- LDL** – lipoproteínas de baixa densidade
- ERO** – espécies reativas de oxigênio
- ERN** – espécies reativas de nitrogênio
- LDLox** – lipoproteínas de baixa densidade oxidadas
- CT** – colesterol
- TG** – triglicerídeos
- VLDL** – lipoproteínas de muito baixa densidade
- QM** – quilomícrons
- HDL** – lipoproteínas de alta densidade
- SBC** – Sociedade Brasileira de Cardiologia
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- MDA** - malonaldeído
- ICAM-1** – molécula de adesão intercelular
- VCAM-1** – molécula de adesão vascular
- IL-8** – interleucina-8
- M-CSF** – fator estimulador de colônia de macrófagos
- CCL2/MCP-1** – proteína quimiotática de monócito
- NADPH** – nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
- NOS** – óxido nítrico sintase
- DNA** – ácido desoxirribonucleico
- SODs** – superóxidos dismutases
- GPx** – glutathione peroxidase
- CAT** – catalase
- PPS** – perda por secagem
- EAG** – equivalente ácido gálico
- DPPH** – difenil-picril-hidrazil
- BHT** – butilhidroxitolueno
- PVDF** – fluoreto de polivinilideno
- FIA** – injeção direta da amostra
- CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
- NaCl** – cloreto de sódio

**i.p.** – intraperitoneal

**EDTA** – ácido etilenodiamino tetra-acético

**AST** – transaminase oxalacética

**ALT** – transaminase pirúvica

**PBS** – tampão fosfato salino

**PRP** – plasma rico em plaquetas

**TBARS** – ácido tiobarbitúrico

**KCl** – cloreto de potássio

**CaCl<sub>2</sub>** – cloreto de cálcio

**ADP** – adenosina 5'-difosfato

**FT** – fenóis totais

**H<sup>+</sup>** - hidrogênio

**MS** – espectrometria de massas

**ESI-IT-MS/MS** – espectrometria de massas com analisador de íons do tipo *íon-trap* com interface de ionização por *Electrospray*.

**MS<sup>2</sup>** – fragmentação de segunda ordem

**ARE** – elemento de resposta antioxidante

**PECAM-1** – moléculas de adesão plaquetária à células endoteliais

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>TABELA 1-</b>	Relação de massa fresca e seca das folhas de <i>Coffea arabica</i>	33
<b>TABELA 2-</b>	Frequências percentuais e tamanho médio das partículas na análise granulométrica das folhas de <i>Coffea arabica</i>	34
<b>TABELA 3-</b>	Conteúdo de fenóis totais (FT) do extrato seco de folhas de <i>Coffea arabica</i>	36
<b>TABELA 4-</b>	Perfil lipídico	45
<b>TABELA 5-</b>	Avaliação da função hepática após administração do extrato da folha de <i>Coffea arabica</i>	45
<b>TABELA 6-</b>	Avaliação da função renal após administração do extrato da folha de <i>Coffea arabica</i>	47
<b>TABELA 7-</b>	Avaliação da peroxidação lipídica após administração do extrato da folha de <i>Coffea arabica</i>	48
<b>TABELA 8-</b>	Avaliação da agregação plaquetária após administração do extrato da folha de <i>Coffea arabica</i>	49
<b>GRÁFICO 1-</b>	Histograma de distribuição granulométrica das folhas de <i>Coffea arabica</i>	34
<b>GRÁFICO 2-</b>	Atividade sequestrante do radical DPPH (%) do extrato hidroetanólico das folhas de café	38
<b>FIGURA 1-</b>	Espectro de massas <i>full-scan</i> , do extrato hidroetanólico das folhas do cafeeiro avaliado em modo negativo, faixa de íons com $m/z$ de 100-1900 Da	39
<b>FIGURA 2-</b>	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de $m/z$ 191, obtido em modo negativo com energia de colisão de 20 ev	40
<b>FIGURA 3-</b>	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de $m/z$ 353, obtido no modo negativo com uma energia de colisão de 20 ev	41
<b>FIGURA 4-</b>	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de $m/z$ 609, obtido no modo negativo com energia de colisão de 35 ev	42
<b>FIGURA 5-</b>	Espectro de massas <i>full-scan</i> , do extrato hidroetanólico das folhas do cafeeiro avaliado em modo positivo, faixa de íons com $m/z$ de 100-1900 Da	43

## Sumário

<b>1.</b>	<b>Introdução</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>Revisão da Literatura</b>	<b>17</b>
<b>2.1.</b>	<b>Cafeeiro</b>	<b>17</b>
<b>2.2.</b>	<b>Plantas medicinais</b>	<b>19</b>
<b>2.3.</b>	<b>Dislipidemia</b>	<b>20</b>
<b>2.4.</b>	<b>Estresse oxidativo</b>	<b>21</b>
<b>2.5.</b>	<b>Aterosclerose</b>	<b>23</b>
<b>2.6.</b>	<b>Plaquetas e agregação plaquetária</b>	<b>25</b>
<b>3.</b>	<b>Objetivo</b>	<b>28</b>
<b>3.1.</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>28</b>
<b>4.</b>	<b>Materiais e métodos</b>	<b>28</b>
<b>4.1.</b>	<b>Obtenção e identificação do material vegetal</b>	<b>28</b>
<b>4.2.</b>	<b>Perda de água por secagem</b>	<b>29</b>
<b>4.3.</b>	<b>Moagem e Análise granulométrica</b>	<b>29</b>
<b>4.4.</b>	<b>Preparo do extrato seco das folhas de Coffea arábica</b>	<b>29</b>
<b>4.5.</b>	<b>Etapa química</b>	<b>30</b>
<b>4.5.1.</b>	<b>Determinação do teor de polifenóis</b>	<b>30</b>
<b>4.5.2.</b>	<b>Avaliação da atividade sequestrante de radicais livres</b>	<b>30</b>
<b>4.5.3.</b>	<b>Espectrometria de massas</b>	<b>31</b>
<b>4.6.</b>	<b>Ensaio biológicos</b>	<b>31</b>
<b>4.6.1.</b>	<b>Grupos experimentais</b>	<b>31</b>
<b>4.6.2.</b>	<b>Administração do extrato seco e indução da dislipidemia</b>	<b>32</b>
<b>4.6.3.</b>	<b>Obtenção das amostras biológicas</b>	<b>32</b>
<b>4.6.4.</b>	<b>Parâmetros bioquímicos</b>	<b>33</b>
<b>4.6.5.</b>	<b>Peroxidação Lipíca</b>	<b>33</b>
<b>4.6.6.</b>	<b>Determinação de proteínas</b>	<b>34</b>

4.6.7.	<b>Agregação plaquetária</b>	34
4.7.	<b>Análise estatística</b>	35
5.	<b>Resultados e Discussões</b>	35
5.1.	<b>Droga vegetal</b>	35
5.2.	<b>Análise Granulométrica</b>	36
5.3.	<b>Determinação do teor de fenóis</b>	38
5.4.	<b>Avaliação da atividade sequestrante de radicais livres</b>	39
5.5.	<b>Espectrometria de massas</b>	41
5.6.	<b>Ensaio biológico</b>	46
5.6.1.	<b>Perfil lipídico</b>	46
5.6.2.	<b>Função hepática</b>	48
5.6.3.	<b>Função renal</b>	49
5.6.4.	<b>Peroxidação Lipídica</b>	50
5.6.5.	<b>Agregação Plaquetária</b>	52
6.	<b>Conclusão</b>	54
	<b>Referências</b>	55

## 1. Introdução

Evidências científicas têm demonstrado uma forte associação entre a presença de dislipidemias e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), uma das principais causas de morte no mundo. Neste contexto, a aterosclerose tem ocupado um lugar de destaque entre os fatores de risco para o desenvolvimento de tais doenças (AJJAN, ARIENS, 2009; ALONSO, CERVANTES, 2011).

Além das dislipidemias, fatores como disfunção endotelial, inflamação e coagulação aumentada também desempenham um papel crucial no desenvolvimento do processo aterosclerótico, levando ao aumento da permeabilidade celular a partículas de lipoproteínas ricas em colesterol, como por exemplo, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que ficam retidas no espaço subendotelial (DEGIROLAMO et al., 2009).

Estudos têm demonstrado que as LDL podem passar por processos oxidativos mediados por espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) que levam a modificações estruturais e funcionais nestas partículas. A LDL oxidada (LDLox) é capaz de induzir lesão de células endoteliais, além de estimular a adesão plaquetária e o recrutamento de monócitos, que posteriormente se diferenciam em macrófagos. Neste processo ocorre a liberação de uma série de citocinas e fatores de crescimento que contribuem para a ampliação da resposta inflamatória. A captação de LDLox por macrófagos presentes no sítio de lesão resulta na formação das células espumosas (*foam cells*), que constituem o principal componente das lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (STEINBERG, 2009; STEINBERG, WITZTUM, 2012)

Sendo assim, o uso de hipolipomiantes em associação com antioxidantes, anticoagulantes, antiagregantes plaquetários, anti-inflamatórios ou vasodilatadores, têm sido sugerido por diversos autores (CORRÊA-CAMACHO, 2007; LIBBY, 2009; MOORE, TABAS, 2011).

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor. Enquanto a bebida de café é mundialmente consumida de acordo com os hábitos de vida de cada população, o chá das folhas de cafeeiro tem sido utilizados na medicina popular para combater fadiga, cansaço, diarreia e cólicas em geral. Há relatos também de que o tratamento de animais diabéticos com tinturas de folhas de café foi capaz de reduzir os níveis séricos de colesterol (CT), triglicerídeos (TG) e glicose em ratos diabéticos (REZENDE, COCCO, 2002; STEIN, 2012).

Assim como o grão de café e a bebida dele preparada, as folhas do cafeeiro também possuem uma composição muito diversificada, contendo diferentes substâncias químicas, entre as quais destacam-se os ácidos clorogênicos e caféico, alguns alcalóides e metilxantinas como a cafeína, além de outros compostos considerados como praguicidas. Além destes, a presença de outros compostos com atividade antioxidante tais como o alfa-tocoferol, carotenóides e ascorbato também tem sido relatada na literatura (LEPELLEY, 2007; MAGALHÃES, 2008; CAROCHO, FERREIRA, 2013).

Embora os dados disponíveis na literatura científica sobre a composição química das folhas do cafeeiro sejam em sua maioria relacionados à avaliação do efeito protetor que estes metabólitos exercem sobre a planta, sabe-se que estes compostos podem ser considerados também como compostos bioativos. Sendo assim, estudos relacionados à avaliação da composição química e da atividade biológica das folhas do cafeeiro podem fornecer informações relevantes para o consumo seguro e racional das mesmas (RAMIRO, 2006; CAROCHO, FERREIRA, 2013).

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1. Cafeeiro**

O cafeeiro é uma planta dicotiledônea pertencente à família Rubiaceae, do gênero *Coffea*, com várias espécies identificadas (CARVALHO, et. al., 2001; MONROY, 2005) mas somente 10 cultivadas em todo mundo e duas delas são consideradas as mais importantes por corresponder a mais de 90 % da produção mundial: *Coffea arabica* L., conhecida como café arábica e *Coffea canephora* Pierre, conhecida como café robusta. As duas espécies de café apresentam distinções sob o ponto de vista econômico, com diferenças intrínsecas, pelas suas características organolépticas, físicas e químicas (BRASIL, 2012; MURTHY, NAIDU, 2012).

A importância do café para o Brasil é indiscutível, uma vez que se trata do principal produto agrícola brasileiro de exportação, agregando considerável volume de recursos à balança comercial. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e o segundo maior consumidor, atrás apenas dos Estados Unidos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ, 2012).

Enquanto a bebida de café é mundialmente consumida de acordo com os hábitos de vida de cada população, o chá de folhas de cafeeiro tem sido utilizado na medicina popular para combater fadiga, cansaço, diarreia e cólicas em geral. Tem sido relatada também ação estimulante digestiva e dilatadora dos brônquios em casos de bronquite e asma (REZENDE, COCCO, 2002; STEIN, 2012).

Embora a maioria dos estudos disponíveis na literatura científica sobre a composição química das folhas do cafeeiro seja relacionada à avaliação do efeito protetor que estes metabólitos exercem sobre a planta, sabe-se que estes compostos podem ser considerados também como compostos bioativos (RAMIRO, 2006; MAGALHÃES, 2008; CAROCHO, FERREIRA, 2013).

Os compostos fenólicos presentes em vegetais tem recebido considerável atenção por serem os principais componentes com atividade antioxidante, embora não sejam únicos. O ácido cafeico é o principal representante destes, sendo encontrado nos vegetais, principalmente, como um ácido clorogênico na sua forma mais conhecida o ácido 5-*O*-cafeoilquínico, que é um éster do ácido quínico com o ácido cafeico (OLIVEIRA, BASTOS, 2011).

Os ácidos clorogênicos são formados pela estereificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos *trans*-cinâmicos: o ácido cafeico, o ferúlico, sináptico ou *p*-cumárico. Podem ser classificados de acordo com o tipo, número e posição dos resíduos acila: mono ésteres (ácidos cafeoilquínicos, cumaroilquínicos e feruloilquínicos), di, tri, e tetra ésteres e ainda ésteres mistos dos ácidos cafeico e ferúlico (ácidos cafeoil-feruloilquínicos). Os mais comuns e conhecidos são os mono ésteres do ácido cafeoilquínico, principalmente o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (OLIVEIRA, 2011).

A atividade antioxidante destes compostos tem sido atribuída às suas propriedades de óxido-redução, que desempenham importante papel na adsorção ou neutralização de radicais livres. Estudos sobre os efeitos destes compostos sobre a saúde têm despertado o interesse do meio científico. Alguns autores têm relatado que estes compostos podem atuar reduzindo os fatores de risco para o desenvolvimento de diversas patologias, tais como, diabetes *mellitus*, câncer e aterosclerose. Contudo, os dados disponíveis na literatura científica ainda são controversos (MENNEN et al, 2005; CAROCHO, FERREIRA, 2013).

Além destes, a presença de outros compostos com atividade antioxidantes tais como alfa-tocoferol, carotenóides e ascorbato também tem sido observada nas folhas de cafeeiro de diferentes espécies (SIMKIN et al 2008; FORTUNATO et al, 2010).

Estudos sobre a constituição química do cafeeiro têm demonstrado a presença de macro e micronutrientes importantes na folha do cafeeiro, tais como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, cobre, ferro, manganês e zinco (VALARINI et al, 2005; TEZOTTO, 2012;). Além de exercerem importantes funções para a nutrição da planta, sabe-se que elementos como, cobre, manganês e zinco são importantes componentes do sítio ativo das SODs, enzimas com atividade antioxidante (CAROCHO, FERREIRA, 2013). Por outro lado, é conhecido também que o excesso de alguns metais como, por exemplo, cobre podem produzir efeitos deletérios em organismos vivos (VALENTINE, 2010). Além disso, vale ressaltar que alguns estudos têm demonstrado que certos antioxidantes podem apresentar efeitos prejudiciais em animais e em cultura de células, sugerindo que consumo excessivo dos mesmos poderia ser prejudicial à saúde humana (MENNEN et al, 2005; CAROCHO, FERREIRA, 2013).

## **2.2. Plantas medicinais**

A OMS define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”.

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993).

Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Muitas vezes, entretanto, as supostas propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validade científica, por não terem sido investigadas, ou por não terem tido suas

ações farmacológicas comprovadas em testes científicos pré-clínico ou clínicos (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes estas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é real. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente. As pesquisas realizadas para a avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

### **2.3. Dislipidemias**

O termo dislipidemia se refere a um grupo de distúrbios caracterizados por anormalidades quantitativas e/ou qualitativas das lipoproteínas plasmáticas. De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), podem ser adotadas duas classificações para as dislipidemias: a laboratorial e a etiológica (MARTINEZ, LOPES, 2004). A classificação laboratorial compreende os quatro tipos de dislipidemias descritos a seguir:

Hipercolesterolemia isolada: caracterizada pela elevação isolada dos níveis séricos de CT. Em geral é causada pelo aumento da concentração de LDL no soro.

Hipertrigliceridemia isolada: caracterizada pela elevação isolada dos níveis séricos de TG. Em geral é representada pelo aumento das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), ou dos quilomícrons (QM), ou de ambos.

Hiperlipidemia mista: evidenciada pelo aumento da concentração de CT e de TG no soro.

Concentração reduzida de lipoproteína de alta densidade (HDL): identificada por baixas concentrações de HDL no soro. Esta redução pode ser observada de maneira isolada ou em associação com aumento das concentrações séricas de LDL e/ou de TG. (MARTINEZ, LOPES, 2004; SBC, 2007).

Segundo a classificação etiológica, as dislipidemias podem ser divididas em primárias e secundárias. As dislipidemias primárias caracterizam-se por aumento ou diminuição dos lipídios plasmáticos, resultantes de alterações genéticas que interferem com os mecanismos de síntese ou remoção das lipoproteínas circulantes. Entre as mais frequentes destacam-se: a síndrome da hiperquilomicrenemia, a hipercolesterolemia familiar, a hiperlipidemia (ou hipercolesterolemia) familiar combinada, a disbetalipoproteínemia, a hipertrigliceridemia familiar, o aumento do VLDL e de QM, a hipoalfalipoproteínemia familiar e a hiperalfalipoproteínemia familiar (SBC, 2001; MARTINEZ, LOPES, 2004; DATTA et al., 2011).

As dislipidemias secundárias resultam de alterações nas concentrações plasmáticas das lipoproteínas, secundárias a uma causa específica. Podem ser observadas em decorrências do uso de medicamentos, patologias e hábitos de vida. Entre as causas mais frequentes podemos citar: diabetes *mellitus*, hipotireoidismo, insuficiência renal crônica, hepatopatias colestáticas, obesidade, uso de corticosteróides, etilismo, tabagismo, sedentarismo e ingestão excessiva de alimentos ricos em ácidos graxos trans (gordura parcialmente hidrogenada) e/ou saturados (MARTINEZ, LOPES, 2004; DATTAS et al., 2011).

Dados da literatura científica têm demonstrado o envolvimento da dislipidemia no desenvolvimento da aterosclerose (AJJAN, ARIENS, 2009; ALONSO, CERVANTES, 2011). Estudos epidemiológicos e experimentais desenvolvidos com diferentes populações ou com modelos experimentais variados têm demonstrado uma forte associação entre o aumento dos níveis séricos de CT, LDL e ou TG, as concentrações reduzidas de HDL e o desenvolvimento da aterosclerose (DEGIROLAMO, 2009; ALONSO, CERVANTES, 2011; KHERA et al., 2011).

#### **2.4. Estresse oxidativo**

*In vivo*, o oxigênio é reduzido à água, via quatro elétrons, na cadeia respiratória. Porém, aproximadamente 1 a 3 % do oxigênio consumido pelo organismo pode sofrer uma redução parcial com formação de produtos intermediários altamente reativos, sendo sua toxicidade decorrente da formação de seus derivados parcialmente reduzidos (ânion radical superóxido, radical hidroxila), juntamente com peróxido de hidrogênio, são denominadas ERO (CAROCHO, FERREIRA, 2013). Diversas substâncias de interesse biológico que podem se

autooxidar gerando ERO. Além disso, enzimas tais como, xantina oxidase, aldeído oxidase, NADPH oxidase e uma série de flavinas desidrogenases também são capazes de gerar estas espécies. Outras fontes geradoras de ERO incluem a oxidação de compostos reduzidos (nicotinamida e flavina dinucleotídeos) via transporte de elétrons mitocondrial e redução unieletrônica do oxigênio pela citocromo P-450 ou pela óxido nítrico sintase (NOS) quando a arginina ou a tetraidropterídina estão deficientes (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2008; CAROCHO, FERREIRA, 2013).

Estas espécies podem atuar na regulação de uma variedade de mecanismos moleculares relacionados a importantes processos, tais como, resposta imune, adesão e proliferação celular, inflamação e morte celular. Várias moléculas que são criticamente importantes na sinalização celular e na regulação da expressão gênica são sensíveis às ERO quando produzidas em concentrações ideais (CAROCHO, FERREIRA, 2013).

Por outro lado, a produção exarcebada destas espécies pode determinar uma lesão mitocondrial, que leva à morte celular e lesões do DNA por quebra ou formação de adutos, ou ainda pela sua interação com lipídios, proteínas, carboidratos, por provocar modificações nestas macromoléculas (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2008). Portanto, apesar de serem moléculas essenciais para os organismos aeróbios, as ERO podem, em certas condições, se tornarem potencialmente tóxicas, aumentando assim o risco de lesão celular. Sendo assim, os organismos aeróbios são protegidos por um sistema de defesa antioxidante composto por enzimas e substâncias protetoras não enzimáticas (RATNAM et al., 2006; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2008; PAMPLONA, CONSTANTINI, 2011). Alguns atuam reduzindo a velocidade de iniciação de processos oxidativos, suprimindo a geração de espécies oxidantes, ou eliminando-as.

Entre os antioxidantes enzimáticos, destacam-se as superóxidos dismutases (SODs), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT). As SODs são enzimas que atuam diretamente na prevenção do acúmulo do radical superóxido, enquanto que a GPx e CAT evitam o acúmulo de peróxido de hidrogênio para que não haja produção de radical hidroxil, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa (ZOPPI et al., 2003; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2008; PAMPLONA, CONSTANTINI, 2011).

Os antioxidantes sequestradores captam os radicais rapidamente, inibindo a iniciação da cadeia radicalar e/ou interrompendo a propagação da mesma, doando um átomo de hidrogênio para formar um composto estável e um radical derivado do antioxidante. Entre estes se destacam compostos tais como ascorbato, urato, bilirrubina, albumina e componentes

contendo grupamento tiol, alfa-tocoferol, beta (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2008; PAMPLONA, CONSTANTINI, 2011).

Os componentes do sistema de reparo são enzimas capazes de destruir proteínas danificadas por radicais livres, remover ácidos graxos oxidados presentes nas membranas e reparar lesões no DNA induzidas por radicais livres (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2008; CAROCHO, FERREIRA, 2013).

Estes antioxidantes agem cooperativamente protegendo os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios das ERO e ERN. No entanto, em condições de exaustão, é criado um estado de estresse oxidativo, o qual tem sido relacionado a uma variedade de doenças como, por exemplo, a aterosclerose (STEINBERG, 2009;HAIDARI et al, 2010; CAROCHO, FERREIRA, 2013).

## **2.5. Aterosclerose**

A aterosclerose pode ser definida como uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. Destacada entre as principais causas de doenças cardiovasculares, tais como, doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica, doença arterial congênita e falência cardíaca, a aterosclerose pode ser considerada como um sério problema de saúde pública, uma vez que este grupo de doenças é o responsável por cerca de 30% do número de mortes no mundo (FÓRUM ECONÔMICO MUNDIAL, 2011).

Segundo as projeções da Organização Mundial da Saúde (OMS), a tendência de elevação na prevalência da doença cardiovascular tende a persistir, principalmente nos países em desenvolvimento. Estima-se que em 2030, cerca de 23,6 milhões de pessoas morram de doenças cardiovasculares no mundo (MENDIS et al., 2011). No Brasil, estas doenças também têm sido apontadas como principal causa de óbito (MANSUR, FAVARATO 2012).

Dados anatopatológicos e de investigações experimentais, clínicas e epidemiológicas, têm demonstrado o indiscutível papel das dislipidemias (principalmente LDL elevado e HDL diminuído) como fatores de risco para a aterosclerose (SANTOS FILHO et al., 2002; DEGIROLAMO,2009; ALONSO, CERVANTES, 2011; KHERA et al., 2011).

Os mecanismos celulares e moleculares que levam ao seu aparecimento ainda não estão totalmente estabelecidos, mas o início da formação da placa aterosclerótica está relacionado à geração de uma lesão ou disfunção endotelial devido a fatores como dislipidemias, hipertensão arterial ou tabagismo. Este processo leva ao aumento da permeabilidade vascular às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a sua retenção no espaço subendotelial. O acúmulo de lipoproteínas, principalmente, de LDL na parede vascular tem sido considerado como processo-chave no início da aterogênese (LIBBY, 2009; TOMKIN, OWENS, 2012)

Estas lipoproteínas podem passar por processos oxidativos mediados por ERO e ERN, levando a modificações estruturais e funcionais destas partículas (YOSHIDA, KISUGI, 2010). O início deste processo decorre da interação de um iniciador com o oxigênio que, uma vez ativado, pode reagir com o ácido graxo insaturado levando à retirada de um átomo de hidrogênio do carbono metilênico adjacente à ligação dupla cis do ácido graxo insaturado, resultando na formação de radicais alílicos. Uma vez iniciada, a reação segue em cadeia, levando à formação de diversos peróxidos. Todavia, como os peróxidos são instáveis, as reações continuam a ocorrer até a fase de terminação, tendo como principais produtos finais da peroxidação de lipídios, os derivados da decomposição de hidroperóxidos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos. Entre estes, destaca-se o malonaldeído (MDA), que apesar de ser produzido em pequena quantidade na maioria dos tecidos, é o aldeído gerado pela decomposição de hidroperóxidos mais conhecido, podendo ser mensurado e servir como indicador da peroxidação lipídica (HALLIWELL, B.; CHIRIC, 1993; NIKI et al., 2005; YOSHIDA, KISUGI, 2010).

A LDLox é capaz de induzir lesão de células endoteliais além de estimular o recrutamento de monócitos e a adesão plaquetária no foco de lesão (STEINBERG, 2009). Assim, o acúmulo de LDLox na parede vascular contribui para a liberação de uma série de citocinas e fatores de crescimento, tais como molécula de adesão intercelular (ICAM-1), E-selectina, a molécula de adesão vascular (VCAM-1), a interleucina-8 (IL-8), fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e a proteína quimiotática de monócito (CCL2/MCP-1) derivada de células endoteliais. Neste processo, observa-se uma ampliação da resposta inflamatória estimulando a migração de monócitos para a íntima bem como a sua diferenciação em macrófagos, que através de receptores *scavenger*, podem captar a LDLox, levando à formação de células espumosas ou *foam cell*. Estas constituem o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (STEINBERG, 2009; STEINBERG, WITZTUM, 2012)

A interação entre macrófagos e linfócitos leva a liberação de fatores de migração e proliferação de células da musculatura lisa bem como a produção de matriz extracelular com consequente infiltração por fibrose mediada por colágeno e proteoglicanos. Com a evolução, o processo inflamatório e a fibrose se prolongam por muitos anos, levando à calcificação e necrose, obstruindo gradativamente a luz do vaso (MOORE, TABAS, 2011).

Geralmente, durante os estágios iniciais de desenvolvimento da placa aterosclerótica, a doença é clinicamente silenciosa, mas com o passar do tempo, as placas podem se tornar instáveis e, eventualmente se romper, expondo um núcleo pró-trombótico. Este processo resulta na ativação de plaquetas e de fatores de coagulação com a formação de um trombo, o qual pode obstruir parcial ou completamente o lúmen do vaso. Nesta situação observam-se manifestações clínicas como sintomas isquêmicos, que, não raro, podem causar danos irreversíveis ao órgão afetado (MOORE, TABAS, 2011).

Portanto, os mecanismos que levam ao desenvolvimento da aterosclerose têm sido relacionados a uma associação de fatores tais como, anormalidades lipídicas, estresse oxidativo, ativação plaquetária, trombose, inflamação e alterações metabólicas da matriz (CORRÊA-CAMACHO et al., 2007; LIBBY, 2009; STEINBERG, 2009; MOORE, TABAS, 2011; STEINBERG, WITZTUM, 2012).

## **2.6. Plaquetas e agregação plaquetária**

As plaquetas são produzidas na medula óssea através de fragmentos citoplasmáticos anucleados de células chamadas megacariócitos. Permanecem na circulação sanguínea durante uma média de dez dias quando são retiradas pelas células reticuloendoteliais do baço e do fígado (ITALIANO, HARTWING, 2002; SCHULZE, SHIVDASANI, 2005; CASTRO, et al., 2006).

A forma da plaqueta quando em repouso é mantida por um citoesqueleto constituído por uma rede de microtúbulos que sustentam a membrana plaquetária, que é constituída por uma camada bilípídica, e sendo responsáveis pela alteração da sua conformação, quando ocorre a ativação. No citoplasma plaquetário são observados dois tipos de grânulos fundamentais para as funções plaquetárias, os grânulos alfa e os grânulos densos. Além disso, possui o sistema tubular denso e o sistema canicular de membrana, que servem para as comunicações com o meio extracelular. Essa disposição de componentes faz com que as

plaquetas sejam adaptadas para aderir aos vasos sanguíneos lesados, agregar com outras plaquetas e facilitar a geração local de trombina. Essas ações contribuem para a hemostasia com a formação do agregado plaquetário e sua estabilização pela ação local da trombina, que converte o fibrinogênio em fibrina (SILVA, 2010).

Além das estruturas descritas, as plaquetas possuem vários receptores de superfície que promovem a adesão e agregação plaquetária. Onde se incluem o complexo glicoprotéico (GP) Ib/IX/V, que promove a adesão das plaquetas ao se ligar ao fator de von Willerbrand (FVW), a GPIIb/IIIa que faz a mediação da agregação de plaquetas através da ligação com o fibrinogênio e/ou o FVW e a GPVIa para o colágeno que contribui para a adesão e agregação plaquetária (SILVA, 2010).

O sistema hemostático é responsável pela manutenção do fluxo sanguíneo e da integridade vascular, sendo capaz de estancar uma superfície danificada do endotélio vascular quando este sofre uma injúria, através da formação de um tampão. Dessa forma, a hemostasia minimiza a perda sanguínea e promove a restauração dos vasos sanguíneos (ERHARDTSEN, 2002; STASSEN, et. al., 2004; CASTRO, 2006).

A adesão plaquetária à parede do vaso danificado é a primeira etapa da hemostasia. Quando o vaso sofre uma injúria e é rompido, as plaquetas interagem com os componentes da matriz extracelular expostos na parede do vaso sanguíneo, através da interação entre GPIIb/IX/V e FVW. Essa interação é considerada responsável pela regulação primária da adesão plaquetária (ISRAEL, 2002; CASTRO, 2006).

No contato inicial o complexo plaquetário GPIIb/IX/V, ou a integrina  $\alpha_{Ib}\beta_3$  em sua conformação ativada, associado ao colágeno da superfície subendotelial, liga-se ao FVW, possibilitando a adesão de outras plaquetas circulantes formando uma camada de células que cobrirá o tecido exposto (CANOBBIO, et. al., 2004; CASTRO, 2006).

A ligação do FVW à GPIIb/IX/V possibilita o aumento da adesão plaquetária através da indução para secreção de ADP, que aumenta a afinidade da integrina  $\alpha_{Ib}\beta_3$  pelo FVW contribuindo para a formação posterior de um agregado plaquetário pela ligação ao fibrinogênio (ASAZUMA, 1997; CASTRO 2006).

Outro receptor de colágeno é um complexo multiprotéico formado pela GPVI e pelo receptor Fc de cadeia  $\gamma$  (FcR $\gamma$ ), a exposição de plaquetas ao colágeno resulta no agrupamento da GPVI, que ativa a fosforilação da tirosina do FcR $\gamma$ , sendo esse complexo o principal receptor envolvido na ativação plaquetária via colágeno. (GIBBINS, 1996; CASTRO, 2006).

Outros receptores de colágeno são GPIb e o  $\alpha_2\beta_1$ . Ao interagirem com o colágeno ativam o processo de exposição do receptor de fibrinogênio GPIIb/IIIa e proporcionam o

contato das plaquetas circulantes com aquelas já aderidas à superfície endotelial. A integrina  $\alpha_2\beta_1$  permite ainda que o colágeno interaja com um segundo receptor de colágeno (GPVI) que pode ativar a sinalização dependente de tirosina quinase (ASAZUMA, 1997; FURMAN, 2004; GIBBINS, 2004; HEEMSKERK, 2004; CASTRO, 2006).

Outros receptores de adesão, incluindo o receptor de fibronectina  $\alpha_5\beta_1$  e o receptor de laminina  $\alpha_6\beta_1$  também estimulam e sustentam a adesão plaquetária. A ligação do FVW à GPIb estimula a mobilização de cálcio, a ativação das proteinoquinases C e G, fosfoinosítídeo 3-quinase e rearranjos do citoesqueleto promovendo a mudança conformacional da plaqueta (MAZZUCATO, 2002; CASTRO, 2006).

Após a adesão plaquetária ocorre a formação do agregado plaquetário através da exposição da GPIIb/IIIa. O receptor de fibrinogênio GPIIb/IIIa viabiliza a ligação de fibrinogênio ou FVW entre as plaquetas possibilitando a interação plaqueta/plaqueta (GAWAZ, 1991; FLAUMENHAFT, 2003; CASTRO, 2006).

Ambas, adesão e agregação plaquetárias, induzem sinalização intracelular que medeia várias respostas, como formação e secreção de serotonina, ADP e  $\text{TXA}_2$ , que servem como amplificadores da resposta plaquetária e como agentes pró-trombóticos. Essas moléculas reforçam a vasoconstrição, a ativação plaquetária, promovendo diminuição no fluxo sanguíneo e aumentada afinidade das integrinas  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  e  $\alpha_2\beta_1$ , facilitando a formação do trombo, e também o aumento da adesão plaqueta/plaqueta e plaqueta/parede vascular (GIBBINS, 2004; CASTRO, 2006).

A regulação negativa das plaquetas é essencial para prevenir o processo de formação inespecífico de trombo denominado trombose. O papel do óxido nítrico e da prostaciclina no processo de regulação da função plaquetária está bem estabelecido, e sua interação com o endotélio é descrita na literatura como essencial. A ativação plaquetária também pode ser inibida por sinalização, através da molécula de adesão PECAM-1. Essa molécula estaria relacionada à inibição da sinalização quinase-dependente, também atuando sobre os receptores GPIb e sobre as respostas envolvendo o FcRIIA. Dessa forma, as interações entre PECAM-1 e as plaquetas restringem o crescimento do trombo através de mecanismos do tipo *feedback* negativo (JONES, 2001; CASTRO, 2006).

### 3.Objetivos

O presente estudo tem como objetivo geral caracterizar compostos bioativos e o seu potencial antioxidante em extrato seco de folhas do cafeeiro (*Coffea arabica* L) bem como seus possíveis efeitos sobre o perfil lipídico, função hepática, função renal, estresse oxidativo e agregação plaquetária em ratos dislipidêmicos.

#### 3.1. Objetivos específicos:

- Caracterizar e identificar compostos fenólicos no extrato.
- Avaliar os efeitos da ingestão do extrato seco de folhas de *Coffea arabica* L sobre o perfil lipídico bem como sobre as funções hepática e renal em animais normais e dislipidêmicos;
- Verificar os efeitos da ingestão do extrato seco de folhas de *Coffea arabica* L sobre peroxidação lipídica no plasma e em artéria aorta de ratos normais e dislipidêmicos;
- Avaliar os efeitos da ingestão do extrato seco de folhas de *Coffea arábica* L sobre agregação plaquetária em ratos normais e dislipidêmicos.

### 4.Materiais e Métodos

#### 4.1.Obtenção e identificação do material vegetal

As folhas de *Coffea arabica* L foram coletadas no município de Alfenas-MG localizadas a 806 m do nível do mar, com latitude 21° 25' 48'' S, longitude 46° 02' 23'' W, em março de 2013. A exsicata foi depositada e registrada no herbário da UNIFAL-MG sob o registro n° 2440.

## 4.2. Perda por secagem

A determinação da perda por secagem (PPS) das folhas de *Coffea arabica* foi realizada em estufa a  $44,8 \pm 0,3^\circ\text{C}$  com  $175,2 \pm 0,07\text{g}$  da droga vegetal fresca, sendo mensurado seu peso em turnos de 12h, até peso constante.

## 4.3. Moagem e Análise granulométrica

Foram pesados 150g das folhas secas e pulverizadas em moinho de faca Marconi®, onde em seguida foram submetidas à passagem por tamises em tamizador Belter®, previamente tarados, com aberturas de malha previamente padronizadas de 250  $\mu\text{m}$ , 355  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 710  $\mu\text{m}$  e 850  $\mu\text{m}$ , durante 15 min. Para a análise dos dados foram calculados o tamanho médio das partículas pelo método aritmético, conforme a Equação 1, e construído o histograma de frequência para a análise da distribuição granulométrica.

Foi utilizada a seguinte expressão dada por Samyra et al., (2009) para o cálculo do diâmetro médio das partículas:

$$d_{\text{médio}} = \frac{\sum(AM \cdot Fr\%)}{100\%} [1]$$

Onde:  $d_{\text{médio}}$  = diâmetro médio de partícula; AM = abertura da malha (mm) e  $Fr\%$  = fração retida em cada tamis.

## 4.4. Preparo do extrato seco das folhas de *Coffea arabica*

As folhas de *Coffea arabica* foram secas em estufa, a uma temperatura de  $44,8 \pm 0,3^\circ\text{C}$ , durante 168h, sendo em seguida pulverizadas. O extrato seco das folhas *Coffea arabica* foi obtido por percolação, das folhas secas e pulverizadas, em solução hidroetanólica 70% (V/V), seguida de evaporação sob pressão reduzida a  $45,3 \pm 4,1^\circ\text{C}$  e liofilização à  $-53^\circ\text{C}$ , 429  $\mu\text{Hg}$  por 120 horas (MANCINI FILHO, 2001).

## **4.5.Etapa química**

### **4.5.1.Determinação do teor de fenóis**

A concentração de compostos fenólicos totais do extrato seco foi determinada como descrito por Woisky e Salatino (1998). Aliquotas de 0,1 ml do extrato seco diluído em água(0,05%) foram misturadas com 0,5 ml de reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água (1:10). Após oito minutos, foram adicionados 0,4 ml de solução de carbonato de sódio a 4% (m/v) e os tubos mantidos no escuro a temperatura ambiente por 2 horas. Decorrido o tempo, a densidade óptica foi determinada a 740 nm. A concentração de fenólicos foi calculada utilizando-se ácido gálico como padrão. Os resultados foram expressos em gramas equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de extrato (g EAG/100g extrato). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

### **4.5.2.Avaliação da atividade sequestrante de radicais livres**

A avaliação do poder sequestrante de radicaisdifenil-picril-hidrazil (DPPH) foi feita a partir de uma solução aquosa do extrato seco da folha de *Coffea arabica*Ln a concentração de 1% (m/v) e então diluída nas seguintes concentrações, em etanol: 0,8%; 0,5%; 0,3%; 0,2%; 0,1%; 0,05%; 0,03%; 0,01%; 0,008%; 0,005%(v/v). E então adicionados 1 ml de DPPH, na concentração de 0,02% (m/v) em etanol, e completado para 5 ml com etanol. O tubo controle foi preparado com 4 ml de etanol e 1ml de DPPH. O aparelho foi zerado com o tubo controle. A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em repouso, sob proteção da luz, por 30 min. Logo após, foi feita a leitura das absorbâncias a 517 nm. O material utilizado no preparo do DPPH e os tubos foram cobertos com papel alumínio, já que o reagente é fotossensível. O butilhidroxitolueno (BHT) e ácido gálico foram usados como padrões.

### 4.5.3. Espectrometria de massas

O extrato seco foi solubilizado em água na concentração de 1 mg/mL e em seguida uma alíquota da solução foi filtrada em filtro para seringa PVDF com poro de 0,45 µm. A solução foi analisada por injeção direta (FIA), tendo como fase móvel água ultrapura obtida no equipamento Milli-Q Plus da marca Merck Millipore. Os espectros (FIA-ESI-MS/MS) de massa foram obtidos no equipamento Shimadzu's LCMS-8030 LC/MS/MS Triple Quadrupole operando em modo negativo e positivo. O modo *full scan* foi empregado na faixa de massa de  $m/z$  100 – 1000 Da. A amostra foi mantida a 25 °C durante a análise.

## 4.6. Ensaio biológicos

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos para experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG, conforme o protocolo número 492/2013. Foram utilizados ratos machos “Wistar”, com peso de 300 ±25g, obtidos no Biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, receberam água e ração comercial *ad libitum*.

### 4.6.1. Grupos experimentais

Para o desenvolvimento dos experimentos 64 animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais contendo 16 animais em cada grupo, conforme descrito abaixo:

- Grupo controle: composto por animais não dislipidêmicos e não submetidos ao tratamento com o extrato seco das folhas de *Coffea arabica*L.
- Grupo dislipidêmico: formado por animais submetidos ao tratamento com Triton WR-1339 e não tratados com o extrato seco das folhas de *Coffea arabica*L.

- Grupo extrato seco: animais submetidos ao tratamento com o extrato seco das folhas de *Coffea arabica* e não tratados com Triton WR-1339.
- Grupo dislipidêmico extrato seco: composto por animais submetidos ao tratamento com Triton WR-1339 e tratados com o extrato seco das folhas de *Coffea arabica*.

#### **4.6.2. Administração do extrato seco e indução da dislipidemia**

O extrato seco das folhas de *Coffea arabica* foi reconstituído em água e administrado por gavagem na dose de 300mg/Kg de peso corporal durante 56 dias (OECD, 2001). No 54º dia após o início do tratamento com o extrato, a dislipidemia foi induzida pela administração Triton WR-1339 (Tyloxapol, Sigma Aldrich) dissolvido em NaCl a 0,9% aos animais em jejum, por via intraperitoneal (i.p.), na dose de 300mg/kg de peso corporal. Os animais controle receberam solução salina 0,9%, por via i.p. (MATHUR et al, 1964).

#### **4.6.3. Obtenção das amostras biológicas**

No 56º dia, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e em seguida anestesiados, com Ketamina (70 mg/kg de peso corporal) e Xilazina (6 mg/kg de peso corporal), para a coleta do sangue por punção da artéria aorta abdominal e cardíaca. As amostras de sangue foram distribuídas em tubos siliconizados sem aditivo para a obtenção do soro, em tubos contendo citrato de sódio para a obtenção do PRP e em tubos contendo EDTA para a obtenção do plasma. O soro separado foi armazenado a -20°C para a avaliação dos parâmetros bioquímicos. O plasma obtido com EDTA foi armazenado em nitrogênio líquido para avaliação da peroxidação lipídica enquanto que o plasma rico em plaquetas (PRP) obtido a partir do sangue colhido com citrato foi utilizado para a avaliação da agregação plaquetária.

Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia e a artéria aorta foi retirada e armazenada em tampão fosfato para avaliação da peroxidação lipídica.

#### 4.6.4. Parâmetros bioquímicos

As concentrações de ureia, colesterol total, triglicerídeos e colesterol HDL foram determinadas por métodos enzimáticos e para a determinação de creatinina foi utilizado o método do picrato alcalino baseado na reação de Jaffé (cinético). A atividade de ALT e de AST foi determinada pelo método de Reitman e Frankel enquanto que a atividade de fosfatase alcalina foi determinada pelo método de Roy modificado (BURTIS, SAHWOOD, 1999). As determinações de creatinina, e de colesterol HDL foram realizadas em equipamento automatizado Labmax 240 da LabTest enquanto que as demais determinações foram realizadas em equipamento semi-automático Bioplus. Foi realizado um branco de amostra para todas as determinações realizadas no equipamento Bioplus para corrigir a interferência ocasionada pela lipemia.

#### 4.6.5. Peroxidação Lipídica

A artéria aorta dos animais de todos os grupos experimentais foi removida, pesada e homogeneizada, em banho de gelo, com auxílio de homogeneizador de tecidos (Tecnal – modelo TE – 100), após adição de um volume de PBS, pH 7,4, equivalente a 4 vezes o peso fresco do tecido. O homogeneizado obtido foi centrifugado a 3000 g, por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante retirado foi armazenado em nitrogênio líquido.

A peroxidação lipídica foi determinada pela formação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Amostras de 150 µL, de plasma e de homogeneizado da aorta foram adicionadas a 750 µL de ácido fosfórico 1,22M, 1350 µL de água milliQ e 750 µL de TBARS 0,67%. A mistura foi aquecida em banho-maria a 95°C por uma hora, resfriada em banho de gelo. Alíquota de 1 ml da mistura foi retirada e homogeneizada com 200 µL de hidróxido de sódio 1M e metanol 1,8 ml. Foi realizada leitura em fluorímetro utilizando comprimentos de onda de excitação e leitura em 532 e 553 nm respectivamente (BUEGE, AUST, 1978).

#### 4.6.6 Determinação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada em homogeneizados de aorta pelo método de Bradford (1976) e no plasmapelo método de Biureto (BURTIS, ASHWOOD, 1999).

#### 4.6.7. Agregação plaquetária

A agregação plaquetária foi avaliada em alíquotas de plasma rico em plaquetas (PRP) obtido de acordo com Baldissera Jr. (2010) utilizando como agonista o ADP a 5  $\mu$ M em agregômetro Qualitem duplo canal a 37°C.

Segundo Baldissera Jr. (2010), modificado por Silvério et. al. (2013), o PRP foi obtido pela centrifugação do sangue total (em citrato de sódio 1:9) a 345 G, por 10 min em centrífuga Excelsa®, realizado logo após a coleta do sangue.

Em seguida as plaquetas foram lavadas para a retirada do cálcio, adicionando-se a cada 5 partes de PRP, 7 partes de solução de tampão de lavagem (NaCl; KCl; citrato de sódio; glicose; sacarose; água deionizada). O pellet de plaquetas obtido foi ressuspensão delicadamente com 3 mL de solução de Krebs sem cálcio (com pH de 7,2 – 7,4 em CO<sub>2</sub>). O número de plaquetas foi ajustado para  $2,25 \times 10^8$ /por reação.

Para cada leitura do ensaio de agregação o volume final de reação foi de 450  $\mu$ L, onde foram adicionados a cubeta de agrgação x  $\mu$ L do PRP, 450 – x  $\mu$ L de solução de Krebs e 17  $\mu$ L de cloreto de cálcio a 1 mM, previamente incubado a 37°C. Em seguida adicionou-se 10  $\mu$ L do ADP a 5 mM. A variação da transmissão da luz foi monitorada pelo método turbidimétrico por 5 min na temperatura de 37°C.

#### 4.7. Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste-*t* de Student ( $P < 0,05$ ) (DE MUTH, 1999).

### 5. Resultados e Discussões

#### 5.1. Droga vegetal

Foi utilizado um cultivar livre de agrotóxicos, visto que o cultivo convencional leva uma grande demanda do uso destes, o que pode vir a ser prejudicial a saúde e também interferir nos resultados do presente estudo (GERMANO et. al., 2007).

Após as operações preliminares de coleta e triagem da matéria prima vegetal foram realizadas as etapas de secagem e moagem das folhas de *Coffea arabica*L.

A presença de água na matéria-prima vegetal favorece a ação enzimática além de propiciar o crescimento de fungos e de bactérias. Existem diferentes métodos analíticos oficiais para a determinação de água em matéria-prima vegetal. O método de secagem em estufa é um método de simples execução. Entretanto este método determina não somente a perda de água, mas também a perda de constituintes voláteis (BORGES et al., 2005).

A determinação da PPS das folhas de *Coffea arabica*L ocorreu em estufa a  $44,8 \pm 0,3^\circ\text{C}$  com  $175,2 \pm 0,07\text{g}$  da droga vegetal fresca, onde a estabilização no processo de secagem da droga vegetal se deu após uma semana de secagem em estufa, conforme demonstram os resultados da tabela 1.

O extrato seco das folhas de *Coffea arabica*L obtido após o processo de extração, teve um rendimento total de  $6,56 \pm 0,6\text{ g}$  de extrato seco em  $100\text{ g}$  da droga vegetal seca e pulverizada.

Tabela 1: Relação de massa fresca e seca das folhas de *Coffea arabica*L.

Massa Fresca (g)	Massa Seca (g)	Perda (g e %)	Temperatura (°C)	Tempo (h)
175,2±0,07	50,1±0,07	125,1±0,07 71,4±0,04	44,7±0,3	168

Fonte: do autor

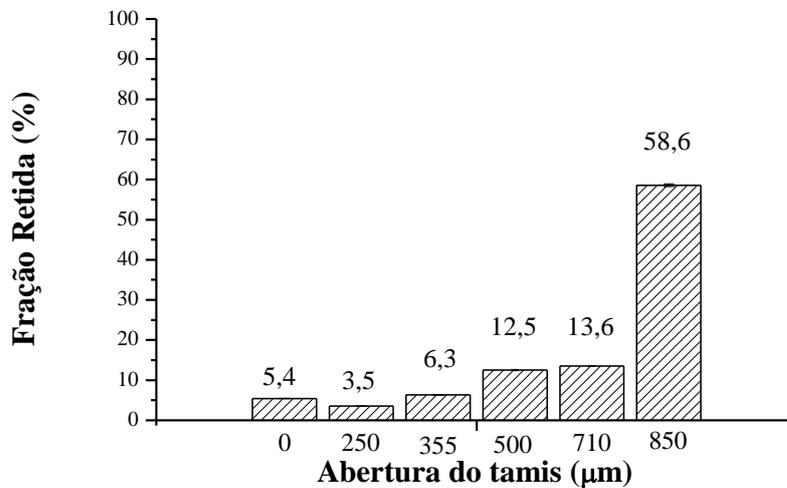
## 5.2. Análise Granulométrica

Os resultados do teste da determinação da granulometria dos pós de *Coffea arabica*L e o histograma de distribuição granulométrica realizados segundo a Farmacopéia Brasileira (2010), estão apresentados na tabela 2 e figura 1.

Tabela 2: Frequências percentuais e tamanho médio das partículas na análise granulométrica das folhas de *Coffea arabica*L.

Nº do Tamis (ABNT/ASTM)	Abertura de Malha (µm)	Massa de Pós Retido (g)	Fração Retida (%)
0	0	8,2± 0,11	5,4± 0,07
60	250	5,3± 0,04	3,5± 0,03
45	355	9,5± 0,09	6,3± 0,06
35	500	18,8± 0,24	12,5± 0,16
25	710	20,3± 0,25	13,6± 0,16
20	850	87,7± 0,47	58,6± 0,34
$d_{\text{médio}}(\mu\text{m})$			688,145 ± 1,48

Fonte: do autor

Gráfico 1 - Histograma de distribuição granulométrica das folhas de *Coffea arabica*L.

Fonte: do autor.

Os resultados mostram que as partículas do material vegetal encontram-se predominantemente distribuídas no tamis com abertura de malha de 850 µm, representando  $58,560 \pm 0,34$  % de todo material (Figura 1). O tamanho médio de partícula calculado conforme equação 1, do pó das folhas foi de  $688,145 \pm 1,48$  µm.

Desta forma, segundo Simões et al., (2007), classifica-se o corte das folhas de *Coffea arabica* L como sendo, corte semi fino, uma vez que o diâmetro médio de partícula encontra-se entre 0,5 e 5 mm de diâmetro.

A distribuição granulométrica das partículas de matérias primas vegetais pulverizadas constitui um fator determinante na homogeneidade e na reprodutibilidade dos processos extrativos. A homogeneidade do pulverizado pode interferir diretamente na qualidade e eficiência do processo extrativo, uma vez que interfere na superfície de contato da droga vegetal e o líquido extrator (ROLIM et al., 2012).

Desta forma os resultados demonstram que a granulometria não ficou totalmente uniforme, esta diferença pode ser atribuída aos fatores operacionais ligados ao tipo de moinho e às características originais da amostra, é provável que a eficiência quanto ao grau de redução do tamanho de partícula no processo de moagem seja mediado por mecanismos diferentes, podendo a energia da moagem ser dissipada em deformações elásticas e plásticas, que não a de fratura (PARROT, 1986).

### 5.3.Determinação do teor de fenóis

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupo hidroxila como substituinte. Nos vegetais, estes compostos constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos. Dentre estes, alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, enquanto outros como, por exemplo, ácidos carboxílicos e glicosídeos são solúveis em água (SU et al, 2007; ROCKENBACH et al, 2008). Estudos sobre os efeitos destes compostos sobre a saúde têm despertado o interesse do meio científico, uma vez que tem sido relatado que estes compostos podem atuar reduzindo os fatores de risco para o desenvolvimento de diversas patologias, tais como, câncer, doenças inflamatórias e cardiovasculares (LONN et al, 2012; BENNETT et al, 2012).

Sendo assim, no presente estudo foi determinada a concentração de fenóis totais no extrato seco utilizando do método de Folin & Ciocalteu (Tabela 3).O resultado obtido corrobora com dados da literatura, que têm demonstrado a presença de compostos fenólicos tais como ácidos clorogênico e caféico em folhas de cafeeiro (LEPELLEY, 2007; MAGALHÃES, 2008; OLIVEIRA, BASTOS, 2011). Além disso a concentração de fenóis totais observada neste estudo foi semelhante àquelas observadas em grãos de café. Fernandes et al. (2003), observaram resultados que variam na faixa de 4,3 a 6,18 g EAG/100 g de café verde e torrados, já Vilela (2002) valor superior 7,54 g EAG/100 g em cafés cerejas descascados, sendo a quantidade encontrada neste estudo de 6,8 g EAG/100 g de extrato.

Tabela 3 – Conteúdo de fenóis totais (FT) do extrato seco de folhas de *Coffea arabica*L.

Concentração Extrato Seco (% p/v)	FT (g EAG/100 g de Extrato)
0,05	6,8 ± 0,1

Os resultados representam a média ± erro padrão, realizadas em triplicata. FT = Fenóis Totais. Fonte: do autor

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos pode ser realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais extensivamente utilizadas (HOU et. al., 2003; NACZK et. al., 2004; VALKO et. al., 2004;ROGINSKY, LISSI, 2005). O reagente consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotunguístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6<sup>+</sup>. Porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados azul de molibdênio e azul de tungstênio, nos quais a média

do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6. Cujas colorações permitem a determinação da concentração das substâncias redutoras, que necessariamente não precisam ter natureza fenólica (VALKO et al., 2004; NACZK et al., 2004), o que torna-se uma desvantagem para o método. No entanto, por ser o método mais empregado, permite com maior facilidade comparações com outros trabalhos e pode ser usado para uma triagem.

#### 5.4. Avaliação da atividade sequestrante de radicais livres

Para fazer uma análise preliminar em relação a capacidade antioxidante do extrato estudado, a atividade sequestrante de radicais livres foi avaliada utilizando-se o método espectrofotométrico baseado na redução do radical estável DPPH.

Nos últimos anos, este método se tornou bastante popular no estudo de compostos com atividades antioxidantes oriundos de produtos naturais, sendo adotado em numerosos estudos sobre avaliação da atividade antioxidante em vegetais (ALVES et al, 2010; NIKI, 2010). O ensaio do DPPH é baseado em reação de transferência de átomos de hidrogênio ( $H^+$ ). A redução do radical DPPH ocorre através da abstração de um  $H^+$  do antioxidante em estudo. Assim, a capacidade sequestrante de radical livre é estimada através da avaliação da capacidade de doação de  $H^+$  do composto presente no extrato para o radical DPPH, estabilizando-o (NIKI, 2010).

No gráfico 1, estão representados os resultados da análise da atividade antioxidante do extrato seco das folhas do cafeeiro, utilizando o radical livre DPPH. Os compostos utilizados como padrão foram o butil-hidroxi-tolueno (BHT) e o ácido gálico os quais apresentaram atividade sequestrante de DPPH de 88,2% e 95,5% respectivamente, na concentração de 0,16 mg/ml. Os resultados permitem verificar que o extrato apresentou atividade sequestrante de radicais livres máxima de 90,1%, na concentração de 0,16 mg/ml.

De acordo com estes resultados podemos sugerir a presença de compostos capazes de atuar como doadores de  $H^+$  ao radical DPPH no extrato analisado.

A composição e estrutura química do(s) componente(s) ativo(s) presente(s) em um extrato são importantes, e podem influenciar a sua atividade antioxidante (ROCKENBACH et al, 2008). Estes resultados poderiam ser atribuídos à possível presença de compostos fenólicos no extrato de *C. arabica* L., conforme demonstrado através da determinação da concentração de fenóis totais.

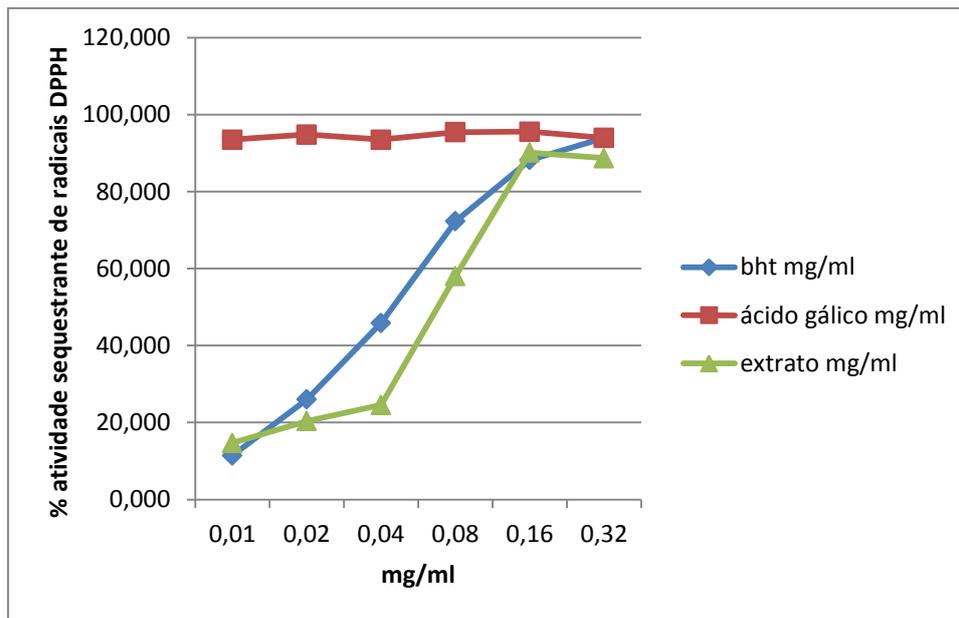
Segundo Bailey (1996) uma das propriedades desejáveis para um antioxidante é sua eficácia em baixas concentrações (0,01 a 0,1 mg/ml), enquanto que a indústria alimentícia preconiza uma concentração máxima de 0,2 mg/ml de antioxidantes, no entanto, devem-se considerar também outros fatores, tais como legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais (RAFECAS et al. 1988). O interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para o uso farmacêutico, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais tem sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pela comprovação de diversos outros males como: aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático (SIMÃO, 1985; ZHENG, MELO, GUERRA, 2002; YILDRIM et al., 2002; WANG, 2011).

O extrato demonstrou maior atividade antioxidante na concentração de 0,16 mg/ml, com IC50 igual a 0,06 mg/ml, e quando comparado com os padrões BHT e ácido gálico, este apresentou uma atividade sequestrante de DPPH semelhante aos padrões, sugerindo potencial no combate à ação de radicais livres. Segundo Milutinovic' et al. (2013) resultado inferior é encontrado para bebida café cerca de 0,02 mg/ml.

Não foram encontrados na literatura, resultados referentes a atividade sequestrante de radicais DPPH de extratos de folhas do cafeeiro, entretanto segundo Duarte et al. (2005) e Araújo (2007), que utilizaram a mesma metodologia para avaliar a atividade sequestrante de radicais livres em amostras da bebida de café, foram obtidos valores na faixa de 92,52 % e 82,00 %, respectivamente, para amostras na concentração de 0,2 mg/ml. Estes valores são próximos aos relatados neste trabalho. Abrahão et al. (2010) relataram resultados inferiores aos encontrados neste trabalho ao estudarem amostras de bebidas de café *in natura*. Os autores observaram que a atividade sequestrante de radicais livres foi igual a 69% em amostras de bebida de café 0,2mg/ml (p/v).

Embora estes resultados sejam preliminares, a determinação de fenóis totais e a avaliação preliminar da capacidade antioxidante realizadas neste estudo sugerem um possível potencial antioxidante para o extrato analisado.

Gráfico 2 – Atividade sequestrante do radical DPPH (%) do extrato seco das folhas de café



Fonte: do autor

## 5.5. Espectrometria de massas

Vários trabalhos vêm demonstrando que análises por espectrometria de massas (MS) usando o modo de inserção direta da amostra (FIA), sem a necessidade de complexas etapas de preparação e *clean-up* (resguardando apenas as etapas mais simples que envolvem: filtração, diluição e/ou adição de um modificador para auxiliar a ionização), tem se destacado como a forma mais representativa e rápida de estabelecer a composição química de uma determinada matriz. Esta abordagem tem sido empregada no controle de qualidade e na verificação da autenticidade de diversos tipos de amostras, incluindo bebidas, alimentos e até mesmo extratos de plantas (MAURI, PIETTA, 2000; GOODACRE et al., 2002; CATHARINO et al., 2006).

Diante desta observação e conhecendo, em parte, a composição química da planta, nesta etapa do estudo foi realizada a caracterização dos metabólitos secundários presentes no extrato seco das folhas de *Coffea arabica* com a técnica espectrometria de massas com analisador de íons do tipo *ion-trap* com interface de ionização por *Electrospray* (ESI-IT-MS/MS) empregando o modo de inserção direta.

A figura 1 mostra o espectro de massas em *full-scan* no modo de ionização negativo apresentando os íons precursores das moléculas desprotonadas  $[M-H]^-$  do extrato seco das folhas de café.

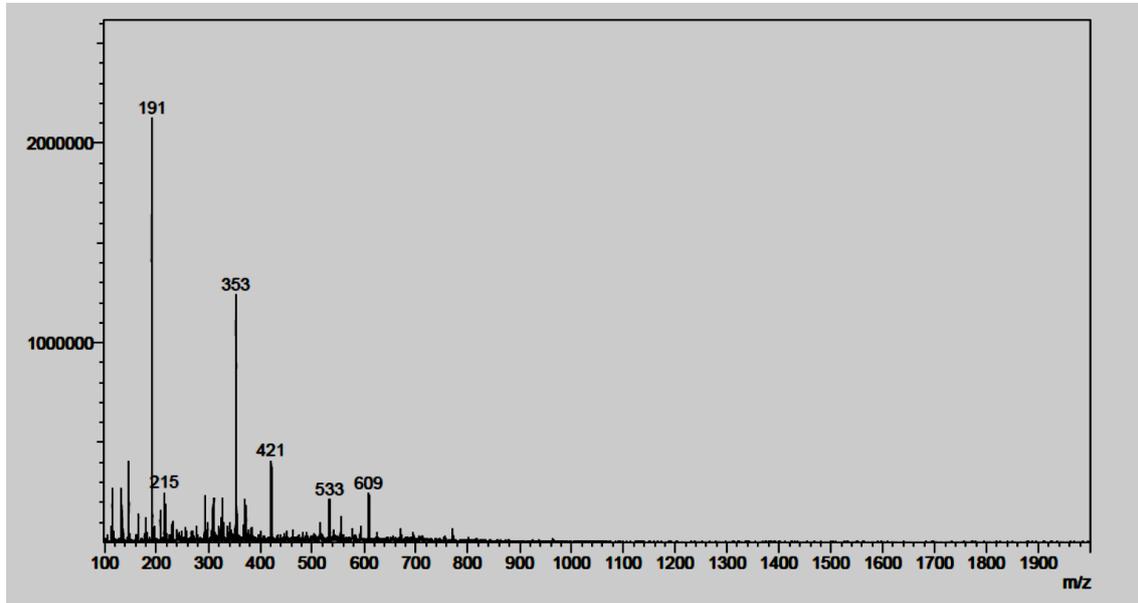


Figura 1. Espectro de massas *full-scan*, do extrato seco das folhas do cafeeiro avaliado em modo negativo, faixa de íons com  $m/z$  de 100-1900 Da. Fonte: do autor.

A fragmentação de segunda-ordem ( $MS^2$ ) para cada um desses íons levou à identificação de diversos metabólitos, conforme discutido a seguir.

O íon precursor de  $m/z$  191 corresponde a molécula desprotonada do ácido quínico. O espectro  $MS^2$  deste íon levou ao íon produto de  $m/z$  de 127 (Fig.2), referente à perda de quatro hidroxilas  $[M-64-H]^-$ , conforme apresentado por Michelin, (2008). O conjunto de dados fornecidos pelo espectro de massas da Figura 2 e a presença do íon precursor de  $m/z$  191 (Fig.1) são sugestivos da presença da molécula de ácido quínico na composição do extrato.

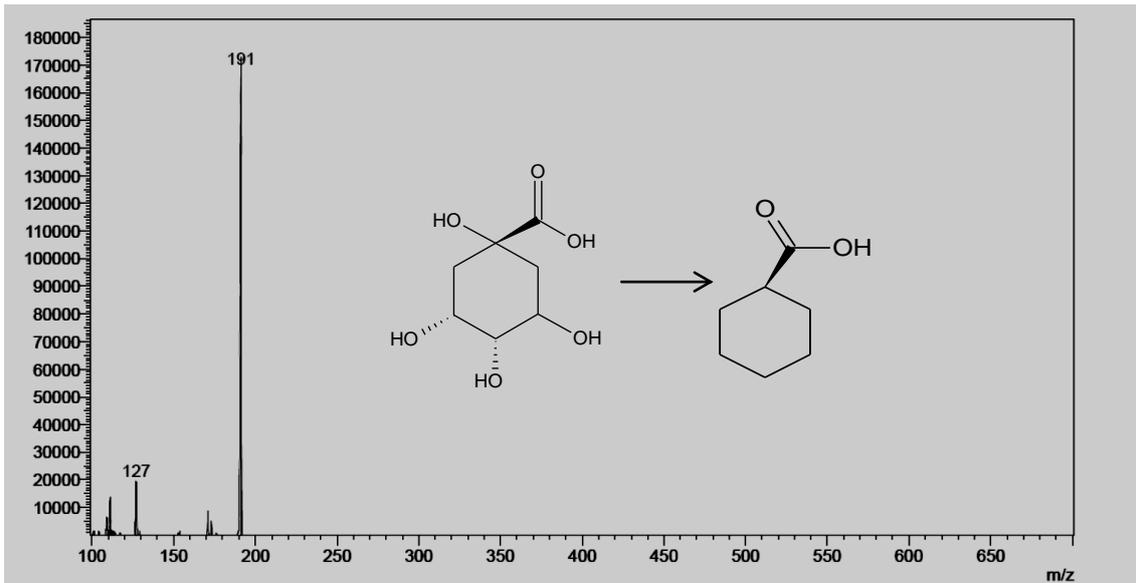


Figura 2. Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de  $m/z$  191, obtido em modo negativo com energia de colisão de 20 ev. Fonte: do autor.

A fragmentação em segunda-ordem do íon precursor  $m/z$  353 (Fig.3) levou à formação do íon produto de  $m/z$  191  $[M-162-H]^-$ . Esse resultado sugere a presença de uma estrutura que teve uma unidade de ácido caféico (162 Da) esterificada por uma unidade de ácido quínico (191 Da), o que é compatível com a estrutura do ácido clorogênico apresentada por Michelin, 2008. O conjunto de dados fornecidos pelo espectro de massas das Figuras 2 e 3, a presença do íon precursor de  $m/z$  191 (Figura 3) corroboram com a presença de ácido clorogênico devido um de seus precursores ser o ácido quínico.

Segundo Mendonça, 2008, observa-se que a intensidade deste composto ( $m/z = 353$ ) é maior nos grãos da espécie café robusta do que nos grãos da espécie café arábica.

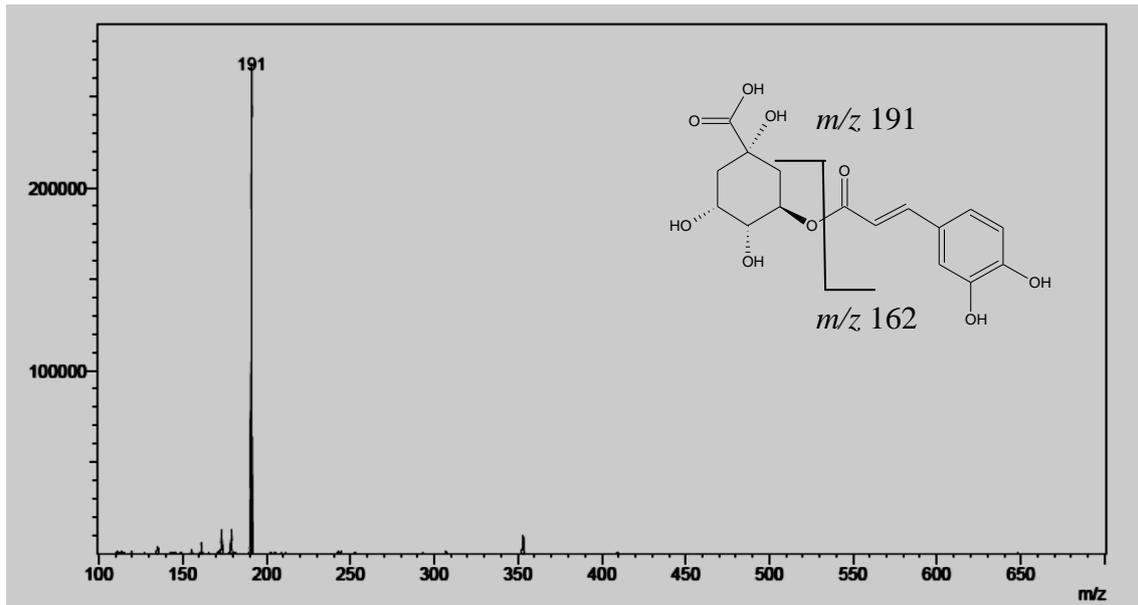


Figura 3. Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de  $m/z$  353, obtido no modo negativo com uma energia de colisão de 20 ev.

O íon precursor de  $m/z$  609 pode ser correspondente a molécula desprotonada rutina. O  $MS^2$  (Fig.4) levou ao íon produto de  $m/z$  301, referente à perda dos açúcares hexose (162 Da) e dexosi-hexose (146 Da), gerando a quercetina (301 Da). Santos et al., 2014, também relata que no espectro de massas no modo negativo o íon precursor de  $m/z$  609 é referente a rutina assim como o  $MS^2$  apresenta o íon produto de  $m/z$  301 referente a aglicona. É necessário, no entanto conhecer se os açúcares estão juntos ou separados para chegar o mais próximo da molécula e afirmar com clareza que se trata da rutina. Para melhor entendimento da estrutura é necessário um  $MS^2$  fazendo uma varredura da energia de colisão visto que a energia utilizada não possibilitou a verificação do desacoplamento dos açúcares isolados.

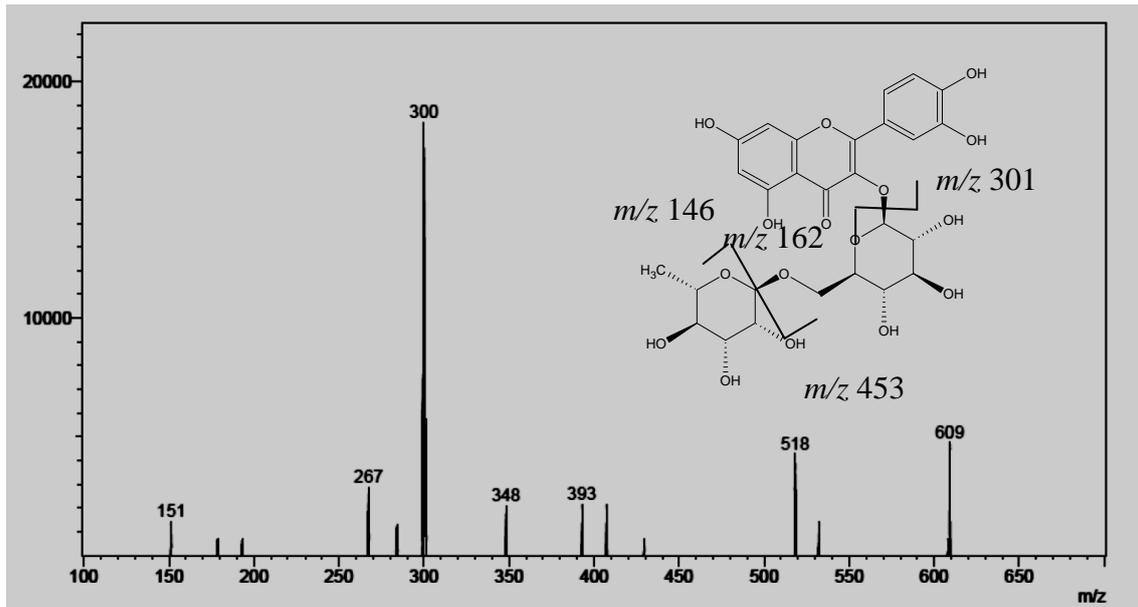


Fig. 4. Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de  $m/z$  609, obtido no modo negativo com energia de colisão de 35 ev. Fonte do autor.

Considerando a ocorrência natural de flavonóides, um subgrupo dentre os compostos fenólicos, em grãos de café (HERTOG et. al., 1993; FARAH, DONANGELO, 2006; RUSAK et. al., 2008). E que os compostos fenólicos geralmente ocorrem em formas glicosiladas em vegetais (HERTOG et. al., 1993), como apresentado na figura 4 onde temos a perda de uma dexosi-hexose (146 Da) e de uma hexose (162 Da) gerando uma aglicona quercetina, sugere-se que o espectro de segunda ordem para o íon precursor de  $m/z$  609 seja do flavonol aglicona-o-hexose-o-desoxi-hexose.

A figura 5 representa o *full-scan* no modo positivo de ionização, apresentando o íon mais abundante de  $m/z$  104. Os cátions de  $m/z$  176, 219, 381 foram detectados. Resultado similar foi encontrado por Mendonça, 2008, porém o íon mais abundante foi de  $m/z$  381.

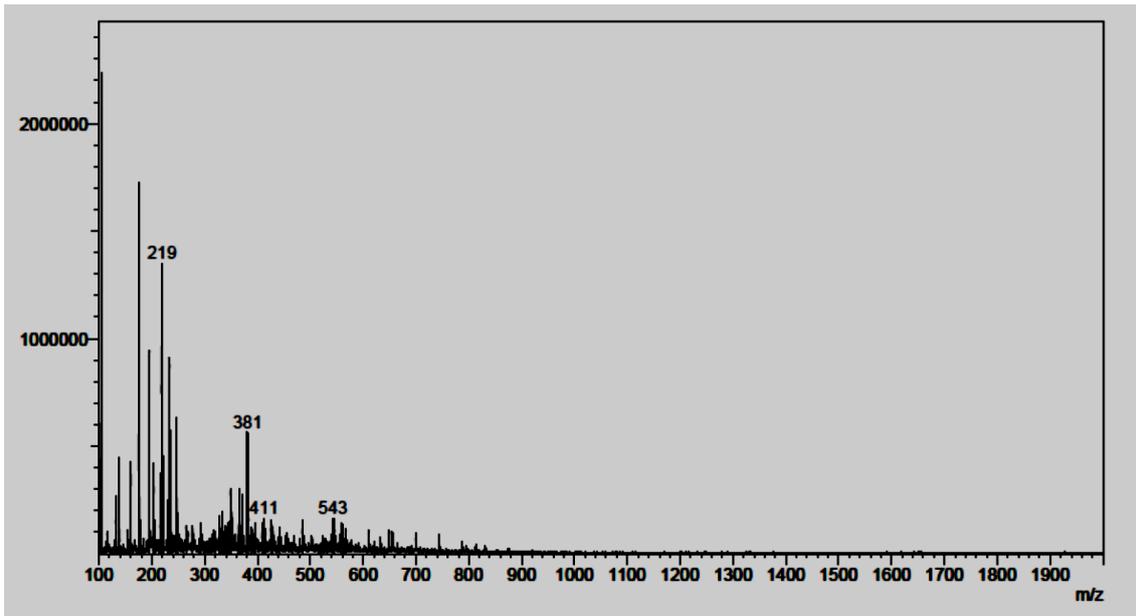


Figura 5. Espectro de massas *full-scan*, do extrato seco das folhas do cafeeiro avaliado em modo positivo, faixa de íons com  $m/z$  de 100-1900 Da. Fonte: do autor

Observa-se que os extratos aquosos dos grãos crus da espécie café robusta contêm menos compostos hidrofílicos ionizados positivamente quando comparado aos extratos aquosos dos grãos da espécie café arábica (MENDONÇA, 2008).

Mendonça (2008), indica a predominância de compostos solúveis em água que são preferencialmente carregados positivamente. Nunes et. al. (2005), trabalhando com amostras de grãos de café cru e torrado identificaram os compostos de  $m/z$  381 e 219 como aduto de um dissacarídeo com o potássio e seu fragmento, respectivamente. Sugere-se que o extrato analisado em questão é originário de *Coffea sp.*, que possui em sua composição compostos fenólicos de interesse como o ácido quínico, a rutina e o ácido clorogênico.

## 5.6. Ensaios biológicos

### 5.6.1. Perfil lipídico

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado uma relação positiva entre o consumo de produtos ricos em compostos fenólicos e a redução do risco cardiovascular (SATO, et. al., 1995; RIKSEN, et. al., 2009). A presença de compostos fenólicos tais como

ácido clorogênico, rutina e ácido quínico no extrato analisado, conforme sugerido pelo espectro de massas apresentado nas figuras 1,2,3,4 poderia ser benéfica à saúde, uma vez que alguns estudos têm relatado que estes compostos bem como alguns de seus derivados podem auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares (DCV) (RIKSEN, et. al., 2009; TODA, et. al., 2010). Sendo assim, no presente trabalho foram analisados os efeitos da ingestão do extrato seco de folhas de cafeeiro sobre o perfil lipídico, um importante fator de risco associado ao início e progressão da aterosclerose, que por sua vez é considerada como principal fator de risco para o desenvolvimento de DCV.

Na tabela 4 observa-se que o tratamento dos animais com Triton WR-1339 levou a uma dislipidemia mista, evidenciada pelo aumento dos níveis de colesterol total, triglicerídeos, HDL e colesterol não HDL no soro dos animais pertencentes aos grupos dislipidêmico e dislipidêmico extrato quando comparados ao grupo controle e ao grupo extrato.

É conhecido que a cinética de aumento dos níveis de colesterol total e de triglicerídeos após a administração de Triton WR-1339 pode variar consideravelmente em função da espécie animal assim como da dose e da via de administração adotadas (SOLER-ARGILAGA, et. al, 1977). No presente estudo foi observado um aumento de cerca de 3 e 25 vezes nos níveis séricos de colesterol total e de triglicerídeos, respectivamente (Tabela 4). O Triton WR-1339 é um detergente não iônico capaz de bloquear a captação de lipoproteínas ricas em triglicerídeos e inibir a lipase lipoproteica, levando a um aumento moderado na concentração de colesterol e intenso na concentração de triglicerídeos na corrente sanguínea (SOLER-ARGILAGA, et. al, 1977). Segundo Friedman;Byers (1952), o Triton WR-1339 pode levar a alterações das propriedades físico-químicas de lipoproteínas plasmáticas. Estas alterações poderiam diminuir a velocidade de depuração do colesterol plasmático, favorecendo assim a sua retenção na corrente sanguínea.

No presente estudo foi observado que a ingestão do extrato seco de folhas de *Coffea arabica* na dose de 300mg/Kg, durante 56 dias, não foi capaz de produzir modificação nos níveis de colesterol total, colesterol HDL, colesterol não HDL bem como de triglicerídeos no soro de animais normais e dislipidêmicos.

Embora o espectro de massas tenha sugerido a presença de compostos com estrutura química compatível com compostos tais como, ácido clorogênico, rutina e ácido quínico, que poderiam apresentar um potencial benéfico na prevenção de DCV, sabe-se que para um composto químico possa exercer atividade biológica, o mesmo deve atingir o seu alvo numa concentração mínima que determine tal efeito. Além disso, alguns compostos fenólicos

quando ingeridos podem ser reconhecidos pelo organismo como xenobióticos, estimulando os mecanismos de detoxificação, o que pode restringir a sua concentração no organismo.

Assim, os resultados obtidos poderiam ser atribuídos a fatores tais como concentração e biodisponibilidade dos compostos fenólicos presentes no extrato analisado.

Tabela 4: Efeito da ingestão do extrato seco de folhas de *Coffea arabica* L sobre o perfil lipídico de ratos normais e dislipidêmicos.

Grupo	Colesterol Total (mg/dl)	Colesterol HDL (mg/dl)	Colesterol não HDL (mg/dl)	Triglicerídeos (mg/dl)
Controle	86,7±5,3 <sup>a</sup>	33,3±3,1 <sup>a</sup>	53,1±5,2 <sup>a</sup>	95,6±26,4 <sup>a</sup>
Extrato	86,8±7,2 <sup>a</sup>	35,6±5,1 <sup>a</sup>	51,3±6,4 <sup>a</sup>	96,7±33,8 <sup>a</sup>
Dislipidêmico	296,2±11,4 <sup>b</sup>	33,6±2,1 <sup>b</sup>	284,7±14,3 <sup>b</sup>	2316,1±212,9 <sup>b</sup>
Dislipidêmico Extrato	302,1±13,3 <sup>b</sup>	31,5±1,7 <sup>b</sup>	281,1±16,1 <sup>b</sup>	2361,1±260,3 <sup>b</sup>

HDL: lipoproteínas de alta densidade. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância estatística, P<0,05. Fonte: do autor

### 5.6.2. Função hepática

Considerando que muitos flavonóides ingeridos podem ser metabolizados em glicuronidato ou sulfato conjugado no fígado, foram avaliadas as atividades das enzimas aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina no soro dos animais pertencentes aos diferentes grupos (Tabela 5).

Tabela 5: Efeito da ingestão do extrato seco de folhas de *Coffea arabica* L sobre a função hepática de ratos normais e dislipidêmicos

Grupo	AST (U/L)	ALT (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)
Controle	120,9 ± 5,4 <sup>a</sup>	38,5 ± 3,5 <sup>a</sup>	31,9 ± 1,1 <sup>a</sup>
Extrato	125,2 ± 4,3 <sup>a</sup>	39,2 ± 3,7 <sup>a</sup>	28,5 ± 3,4 <sup>a</sup>
Dislipidêmico	125,9 ± 4,4 <sup>a</sup>	38,5 ± 4,6 <sup>a</sup>	44,3 ± 3,3 <sup>b</sup>
Dislipidêmico + Extrato	134,7 ± 25,4 <sup>a</sup>	37,5 ± 7,3 <sup>a</sup>	47,6 ± 5,0 <sup>b</sup>

AST: aspartato amino transferase. ALT: alanina amino transferase. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância estatística, P<0,05. Fonte: do autor

É conhecido que a atividade sérica da ALT e da AST aumenta em resposta ao dano celular hepático, sendo estas enzimas consideradas como marcadores de lise celular. No fígado, a ALT está localizada exclusivamente no citosol, enquanto que a AST está distribuída

no citosol e nas mitocôndrias. Assim, a ocorrência de dano celular hepático leva ao aumento da atividade sérica destas enzimas e o aumento da atividade de ALT geralmente é detectado primeiro que o aumento da AST. À medida que os danos vão se agravando a atividade sérica de AST também aumenta gradativamente (BURTIS, ASHOWWOD, 1999). Nenhuma diferença significativa foi observada nas atividades de AST e de ALT entre os diferentes grupos quando comparados entre si sugerindo, portanto, ausência de lise celular induzida pelo tratamento com o extrato seco de folhas de *C. arabica*L, durante 56 dias consecutivos.

Por outro lado, foi observado um aumento da atividade de fosfatase alcalina nos animais tratados com Triton WR- 1339 em relação aos animais pertencentes aos demais grupos estudados. O tratamento com o extrato não foi capaz de impedir o aumento da atividade de fosfatase alcalina no soro destes animais (Tabela 5).

A fosfatase alcalina está amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada principalmente nos ossos, fígado e ductos biliares. Na avaliação da função hepato-biliar, o aumento de sua atividade pode ser indicativo de colestase, no entanto, analisando a atividade de fosfatase alcalina observada neste estudo, juntamente com os resultados obtidos para a atividade de ALT e de AST, não podemos sugerir que a atividade de fosfatase alcalina aumentada no soro de animais tratados com Triton WR-1339 esteja relacionada a um comprometimento hepático, uma vez que as atividades de AST e de ALT não alteraram nestes grupos. Porém, os resultados obtidos poderiam ser atribuídos a um possível efeito do tratamento com Triton WR- 1339 sobre o fluxo biliar (LARUSSO et al., 1982).

### **5.6.3. Função renal**

Tendo em vista que alguns produtos do metabolismo de flavonoides são excretados na urina e que a nefrotoxicidade é um efeito indesejável para qualquer produto que possa vir a ser utilizado por seres humanos, foram avaliados os efeitos do extrato seco de folhas de *Coffea arabica*L sobre os níveis séricos de marcadores da função renal. Contudo, nenhuma alteração significativa foi observada nas concentrações de ureia e de creatinina entre os diferentes grupos analisados (Tabela 6).

Tabela 6: Efeito da ingestão do extrato seco de folhas de *Coffea arabica*L sobre a função renal de ratos normais e dislipidêmicos

Grupo	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)
Controle	42,8 ± 4,7 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,06 <sup>a</sup>
Extrato	42,0 ± 3,5 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,04 <sup>a</sup>
Dislipidêmicos	44,7 ± 5,2 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,05 <sup>a</sup>
Dislipidêmicos Extrato	44,5 ± 3,5 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,05 <sup>a</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam significância estatística, P<0,05. Fonte: do autor

Embora a creatinina sérica seja considerada um parâmetro mais específico que a uréia para avaliação da função renal, esta última é mais sensível na detecção de lesões renais. Desta forma, estes dois parâmetros podem ser utilizados em conjunto, como testes de rastreio da função renal (BURTIS; ASHWOOD, 1999). Sendo assim, estes resultados sugerem que a função renal dos diferentes grupos de animais permaneceu inalterada após a administração do extrato, de acordo com o protocolo adotado neste estudo.

#### 5.6.4 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada no plasma e em aorta dos animais pertencentes aos diferentes grupos analisados por meio da determinação da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), estimadas como malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de peroxidação lipídica em sistemas biológicos. Os resultados apresentados na Tabela 7, demonstram que houve um aumento significativo nos níveis de MDA no plasma e na aorta de animais dos grupos dislipidêmico e dislipidêmico extrato quando estes foram comparados aos animais dos grupos controle e extrato. Foi observado também que todos os animais dislipidêmicos tratados com o extrato apresentaram uma redução significativa na concentração de MDA em relação ao grupo dislipidêmico, demonstrando que o extrato de folhas de *C. arabica*L apresentou potencial antioxidante *in vivo*. Estes resultados poderiam ser atribuídos à presença dos compostos fenólicos detectados neste estudo, uma vez que estes compostos podem ser transportados através da corrente sanguínea e exercer seu efeito antioxidante, como sequestradores de radicais livres, assim como também podem atuar ao nível celular, alterando a sinalização celular e/ou a expressão gênica, via elemento de resposta antioxidante (ARE) presente na região promotora de uma série de enzimas detoxificantes da fase 2. Além disso, deve-se considerar a biotransformação,

distribuição tissular e eliminação destes compostos após serem absorvidos. Assim, muitos compostos podem ter sua estrutura química modificada após serem metabolizados, formando metabólitos que também podem exercer efeitos importantes no organismo, atuando diretamente sobre as espécies oxidantes formadas ou então interferindo nas funções celulares (AZZI et al., 2004; OLIVEIRA,BASTOS, 2011; SATO et al., 2011; FERNANDES et al., 2012).

Dados da literatura têm demonstrado uma redução na peroxidação lipídica em diferentes tecidos após a ingestão de compostos fenólicos, inclusive de ácido clorogênico e rutina, que podem estar presentes neste extrato. Jurgonski et al. (2012) demonstraram que a administração de extratos de sementes de chicória enriquecidos com ácido cafeoilquínico, um derivado do ácido clorogênico, por via oral, foi capaz de reduzir os níveis de TBARS no coração e nos rins de ratos. Kamalakkannan and Mainzen (2006) observaram uma diminuição na concentração de TBARS em rins, fígado e pele de ratos diabéticos tratados com rutina. Além disso, estudos recentes demonstraram que a suplementação oral com tri-hidroxietilrutina (25mg/Kg de peso corporal), um derivado natural da rutina, foi capaz de reduzir significativamente a concentração de produtos de peroxidação lipídica no cólon de ratos submetidos ao tratamento com 1,2-dimetilhidrazina (VINOTHKUMAR et al., 2014).

Desta forma, considerando a forte associação entre a oxidação de lipoproteínas e o desenvolvimento da aterosclerose, evidenciada em diferentes estudos experimentais (CORRÊA-CAMACHO et al., 2007; STEINBERG, 2009; HAIDARI et al. 2010) e os resultados obtidos nesse estudo, podemos sugerir que o extrato seco de folhas de *Coffea arabica*L pode apresentar um efeito benéfico sobre a prevenção da aterosclerose, por reduzir a peroxidação lipídica no plasma e em aorta de ratos dislipidêmicos.

Tabela 7 Efeito da ingestão do extrato seco de folhas de *Coffea arabica*L sobre a peroxidação lipídica no plasma e aorta de ratos normais e dislipidêmicos

Grupos	MDA ( $\mu\text{mol/g}$ proteína)	
	Aorta	Plasma
Controle	2,24 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	4,16 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>
Extrato	2,15 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	4,32 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>
Dislipidêmico	9,36 $\pm$ 0,33 <sup>c</sup>	7,99 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>
Dislipidêmico extrato	4,85 $\pm$ 0,34 <sup>b</sup>	6,62 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam significância estatística,  $P < 0,05$ . Fonte: do autor.

### 5.6.5 Agregação Plaquetária

Tendo em vista o importante papel da ativação plaquetária no desenvolvimento da aterosclerose, foi avaliado neste estudo o efeito da ingestão do extrato de folhas de *Coffea arabica* sobre a agregação plaquetária induzida por ADP nos diferentes grupos de animais estudados.

Foi observado que a indução da dislipidemia com Triton WR-1339 aumentou significativamente a agregação plaquetária dos ratos pertencentes ao grupo dislipidêmico em comparação com os demais grupos (Tabela 8).

Tabela 8: Efeito da ingestão do extrato seco de folhas de *Coffea arabica* sobre a agregação plaquetária em ratos normais e dislipidêmicos.

Grupos	Agregação plaquetária (%)
Controle	58,8 ± 8,0 <sup>a</sup>
Extrato	55,2 ± 7,5 <sup>a</sup>
Dislipidêmico	68,7 ± 4,2 <sup>b</sup>
Dislipidêmico extrato	59,5 ± 8,6 <sup>a</sup>

MDA: malonaldeído. Letras diferentes na mesma coluna indicam significância estatística, P<0,05. Fonte: do autor.

Correlações positivas entre a agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas e níveis de CT e de TG têm sido observadas em estudos desenvolvidos com indivíduos saudáveis e portadores de dislipidemias (COLAS et al., 2011; LUZAK et al., 2011). O aumento da sensibilidade de plaquetas em resposta à hipercolesterolemia, pode ser atribuído a diversos mecanismos, como a alteração da composição lipídica da membrana plaquetária e ativação de diferentes vias de sinalização que levam ao aumento de tromboxano, à ativação de moléculas de adesão plaquetária à células endoteliais (PECAM-1), de proteína quinase e da integrina IIb-3 (AKKERMAN, 2008). Por outro lado, sabe-se que partículas de LDLox podem se ligar as plaquetas e induzir a sua ativação, levando a alterações morfológicas e aumento da agregação (BADIMÓN, 2009).

No presente trabalho foi observado que a administração do extrato de folhas de *Coffea arabica* impediu o aumento da agregação plaquetária, sem alterar os níveis de colesterol total e frações no soro de animais dislipidêmicos. Estes resultados sugerem que o efeito antiagregante do extrato em estudo, poderia estar associado à sua atividade antioxidante,

evidenciada neste estudo, pela diminuição da peroxidação lipídica no plasma e na aorta de ratos dislipidêmicos tratados com o extrato.

De fato, tem sido demonstrado que o tratamento de animais assim como de humanos com compostos fenólicos, pode influenciar a agregação plaquetária, sendo tais efeitos atribuídos à ação antioxidante destes compostos (ANTONOPOULOU et al., 2006; SHANMUGANAYAGAM, 2007). Mattiello et al (2009) demonstraram que o suco de romã foi capaz de inibir a agregação de plaquetas obtidas de indivíduos saudáveis frente ao colágeno e ao ácido araquidônico. Em outro estudo realizado com seres humanos, Natella et al (2009) observaram uma redução na agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno e ácido araquidônico, após a ingestão de bebida de café americano.

Sendo assim, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o extrato de folhas de *Coffea arabica* L apresentou uma ação moduladora sobre a peroxidação lipídica em plasma e aorta bem como sobre a agregação plaquetária em ratos dislipidêmicos, sem aparente comprometimento das funções hepática e renal. Estes resultados são relevantes para a segurança do consumo humano e podem oferecer informações importantes a respeito do uso racional deste extrato vegetal, abrindo uma perspectiva para investigações acerca dos possíveis mecanismos de ação deste extrato bem como de sua composição química e toxicidade.

## 6. Conclusão

- O extrato apresentou compostos com estrutura química compatível com ácido clorogênico, rutina, ácido quínico.
- O extrato seco das folhas de *Coffea arabica* L apresentou atividade antioxidante *in vitro*, demonstrada pela capacidade sequestrante de radicais DPPH.
- O tratamento dos animais com extrato seco de folhas de *Coffea arabica* L não induziu alterações significativas nas provas de avaliação das funções hepática e renal.
- O tratamento dos animais com Triton WR-1339 levou a um aumento nos níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos e colesterol não HDL bem como na peroxidação no plasma e na aorta e na agregação plaquetária.
- O tratamento dos animais dislipidêmicos com extrato seco de folhas de *Coffea arabica* L não foi capaz de alterar os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos e colesterol não HDL mas preveniu o aumento da peroxidação lipídica no plasma e na aorta assim como da agregação plaquetária.

## Referências

- ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. S.; LIMA, A. R.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Coffee (*Coffea arabica* L.) bioactive compounds and antioxidant activity. **Ciências agrotecnicas**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, mar./abr., 2010.
- AJJAN, R. A.; ARIËNS, R. A. S. Cardiovascular disease and heritability of the prothrombotic state. **Blood Reviews**, v.23, p.67–78, 2009.
- AKERELE, O. **Herbal Gram**,28, 13, 1993.
- AKKERMAN, J. W. N. From low-density lipoprotein to platelet activation.**The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** v. 40, p. 2374-2378, 2008.
- ALCAZAR, A., JURADO, J. M., MARTIN, M. J., PABLOS, F., GONZALEZ, A. G. Enzymatic-spectrophotometric determination of sucrose in coffee beans.**Talanta**, v. 67, p. 760-766, 2005
- ALVES, C. A. et al.Métodos para a determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos.**Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALONSOA, V. B.; CERVANTESB, C. E. Valor de la dislipemia en el conjunto de los factores de riesgo cardiovascular.**Rev Esp Cardiol Supl**, v.11(B), p.29-35, 2011.
- ANTONOPOULOU, S.; FRAGOPOULOU, E.; C. KARANTONIS, H. C.; MITSOU, E.; SITARA, M.; REMENTZIS, J.; MOURELATOS, A.; GINIS, A.; PHENEKOS, C. Effect of Traditional Greek Mediterranean Meals on Platelet Aggregation in Normal Subjects and in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. **J Med Food**v.9, p. 356–362, 2006.
- ARAÚJO, F.A. Café (*Coffea arabica* L.) submetido a diferentes condições de torrefação: caracterização química e avaliação da atividade antioxidante e sensorial. 2007. 130p. **Tese (Doutorado)-Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2007.
- AZZI, A.; DAVIES, K.; KELLY, F. Free radical biology – terminology and critical thinking.**FEBS letters**, v. 558, p. 3-6, 2004.
- BAILEY, A. E.; Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 5th ed., **John Wiley: New York**, vol. 3, 1996.
- BALDISSERA-JR, L.; MONTEIRO, P. F.; MELLO, G. C.; MORGANTI, R. P.; ANTUNES E.; Platelet adhesion and intracelular calcium levels in antigen-challenged rats.**PulmonaryPharmacol Therapeut**, v.23, p.327-333, 2010
- BARREIROS, L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BATTRAM, D.S.; ARTHUR, R.; WEEKES, A. et al. The glucose intolerance induced by caffeinated coffee ingestion is less pronounced than that due to alkaloid caffeine in men. **J Nutr**, v. 136, 1276-1280, 2006

BRADBURY, A. G. W. Carbohydrates-Chemistry I: Non-volatile compounds. In CLARKE, R. J.; VITZTHUM, O. G. (Ed.) **Coffe-Recent Developments**, p. 1-17, London, 2001.

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

BUEGES, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2008.

Bulletin of the world health organization, Regulatory situation of herbal medicines. **A worldwide review**, Geneva, 1998.

CAMACHO, C.R.C.; MELICIO, L.A.D.; SOARES, A.M.V.C. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. **Arq Ciênc Saúde**, v.14, n.1, p.41-48, 2007

CAMPA, C.; BALLESTER, J. F.; DOULBEAU, S.; DUSSERT, S.; HAMON, S.; NOIROT, M. Trigoneline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. **Food Chemistry**, v. 88, p. 39-43, 2004

CARDOSO, L. M.; OLIVEIRA, T. T.; PINTO, A. S.; CHAVES, A. R. M.; LEÃO, M. A.; COSTA, M.R.; FONSECA, M. K. A.; SANTOS, A.; ZATTI, R. A.; NAGEM, T. J. Efeito das tinturas de café torrado e moído nos níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e glicose em ratos diabéticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 77-81, 2011

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

CARVALHO, L. M. et. al. Aspectos morfológicos das cultivares de cafeeiro Catuaí-Vermelho e Conilon. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 36, n. 3, p. 411-416, 2001.

CATHARINO, R. R.; CUNHA, I. B. S.; FOGAÇA, A. O.; FACCO, E. M. P.; GODOY, H. T.; DAUDT, C. E.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F. Characterization of must and wine of six varieties of grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 41, n. 2, p. 185-190, 2006

CHU, Y.-F.; CHEN Y.; BROWN, P. H.; LYLE, B. J.; BLACK, R. M.; CHENG, I. H.; OU, B.; PRIOR, R. L. Bioactivities of crude caffeine: Antioxidant activity, cyclooxygenase-2 inhibition, and enhanced glucose uptake. **Food Chemistry**, 2011.

COLAS, R.; SASSOLAS, A.; GUICHARDANT, M.; CUGNET-ANCEAU, C.; MORET, M.; MOULIN, P.; LAGARDE, M.; CALZADA, C. Association of platelet aggregation with lipid levels in the Japanese population: The Suita study. **Journal of the Atherosclerosis and Thrombosis** v. 18, p. 560-567, 2011.

COSTA, A.F. Farmacognosia experimental. 3<sup>o</sup> ed. **Fundação Calouste Gulbenkian**, 2001.

DATTA, B. N.; COLE, D. S.; SHORTLAND, G. J. Hyperlipidaemia. **Paediatrics and Child Health**, v. 21, n.2, p. 94-98, 2011

DEGIROLAMO, C.; SHELNESS, G. S.; RUDELL, L. L. LDL cholesteryl oleate as a predictor for atherosclerosis: evidence from human and animal studies on dietary fat. **J. Lipid Res**, v.50, p.S434–S439, 2009.

DE MUTH, J. E. Basic Statistical and Pharmaceutical Statistical Applications. **New York: Dekker**, p. 169-191, 1999.

DEVASAGAYAM, T. P. A.; KAMAT, J. P.; MOHAN, H.; KESAVAN, P. C. Caffeine as an antioxidant: Inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1282, p. 63-70, 1996.

DUARTE, S.M.S.; ABREU, C.M.P.; MENEZES, H.C.; SANTOS, M.H.; GOUVÊA, C.M.C.P. Effect of processing and roasting of the antioxidant activity of coffee brews. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.2, p.387-393, abr./jun. 2005.

FARAH, A., DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 18, n.1, p. 23-26, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERNANDES, S. M.; PEREIRA, R. G. F. A.; PINTO, N. A. V. D.; NERY, F. C. Constituintes químicos e teor de extrato aquoso de cafés arábica (*Coffea arabica* L.) e conilon (*Coffea canephora* Pierre) torrados. **Ciências Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1076-1081, set/out, 2003.

FERNANDES, I.; NAVE, F.; GONÇALVES, R.; FREITAS, V.; MATEUS, N. On the bioavailability of flavanols and anthocyanins: Flavanol-anthocyanin dimers. **Food Chemistry**, v. 135, p. 812-818, 2012.

FORTUNATO, A. S.; LIDON, F. C.; BATISTA-SANTOS, P. et al. Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* sp. Under cold condition single no types with contrasting tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v.167, p. 333–342, 2010.

FÓRUM ECONÔMICO MUNDIAL. A Carga Econômica Global das Doenças não Transmissíveis. **Um relatório do Fórum Econômico Mundial e da Escola de Saúde Pública de Harvard. Genebra**, 2011.< [www.weforum.org](http://www.weforum.org)>. Acesso em 06 Nov. 2012.

GERMANO, A. A.; NETO, A. L. M.; LUCENTINI, D. F.; PEREZ, R. R. Levantamento do número de envenenamento por agrotóxicos nas áreas agrícolas de cinco municípios nas regiões de Ribeirão Preto e Sul de Minas. **Revista Ciências do Ambiente On-line**, v. 3, n. 2, 2007

GOODACRE, R.; VAIDYANATHAN, S.; BIANCHI, G.; KELL, D. B. Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of olive oils. **The Analyst**, v. 127, n. 11, p. 1457-1462, 2002

H Aidari, M. et al. Increased oxidative stress in atherosclerosis-predisposed regions of the mouse aorta. **Life Sciences**, v.87, p. 100–110, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4<sup>a</sup> ed. **Oxford: Oxford University Press**. 2008

HALLIWELL, B.; CHIRIC, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **Am. J Clin Nutr**, v. 57(suppl), p.715S-25S, 1993:

HERTOG, M. G. L., HOLLMAN, P. C. H., VAN DE PUTTE, B. Contento f potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusion, wines and fruit jueces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41 (8), 1141-1148, 2007

HOU, W.-C.; LIN, R.-D.; CHENG, K.-T.; HUNG, Y.-T.; CHO, C.-H.; CHEN, C.-H.; HWANG, S.-Y.; LEE, M. H.; **Phytomedicine**, 10, 170, 2003.

JIALAL, I; GRUNDY, S. D. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.669, p.239-248, 1992.

JONES, L. H.; ABDALLA, D. S. P.; FREITAS, J. C. Effects of indole-3-acetic on croton oil - and arachidonic acid-induced mouse ear edema. **Inflammation Research**, v. 44, p. 372-375, 1995.

KAMALAKKANNAN, N.; STANLEY, M. P. P. Antihyperglycaemic and Antioxidant Effects of Rutin, a Polyphenolic Flavonoid, in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology** v. 98, p. 97-103, 2006.

KAMALAKKANNAN, N.; STANLEY, M. P. P. Rutin improves the antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. **Mol Cell Biochem**, v. 9, p. 293-211, 2006.

KHERA, A. V.; CUCHEL, M.; MOYA, M. L.; Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis. **N Engl J Med**, v. 364, p.127-135, 2011

KRISCO, A.; KVEDER, M.; PIFAT G. Effect of caffeine on oxidation susceptibility of human plasma low density lipoproteins. **Clínica Chimica Acta**, 2005.

KUMARA, V. R.; KARTHIKKUMARA, V.; VISWANATHANB, P.; KABALIMOORTHYC, J.; NALINIA, N. Oral supplementation with troxerutin (trihydroxyethylrutin), modulates lipidperoxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat coloncarcinogenesis. **Environmental toxicology and pharmacology** v. 37, p.174-184, 2014.

KY, C. L.; LOUARN, J.; DUSSET, S.; GUYOT, B.; HAMON, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigoneline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea Arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. **Food Chemistry**, v. 75, p. 223-230, 2001

LARUSSO, N. F.; KOST, L. J.; CARTER, J. A.; BARHAM, S. S. Triton WR-1339, A Lysosomotropic Compound, Is Excreted into Bile and Alters the Biliary Excretion of Lysosomal Enzymes and Lipids. **Hepatology** v. 2, p. 209s-215s, march/april 1982.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Inflammation in Atherosclerosis. From Pathophysiology to Practice. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, n. 23, p.2129–2138, 2009

LIMA, F. A.; SANT'ANA, A. E. G.; ATAÍDE, T. R.; OMENA, C. M. B.; MENEZES, M. E. S.; VASCONSELOS, S. M. L. Café e saúde humana: um enfoque nas substâncias presentes na bebida relacionadas às doenças cardiovasculares. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 6, p. 1063-1073, 2010.

LIMA, F. A.; VASCONSELOS, S. M. L.; SANT'ANA, A. E. G.; ATAÍDE, T. R.; OMENA, C. M. B.; MENEZES, M. E. S.; CABRAL JÚNIOR, C. R. Consumo de café segundo métodos de preparo da bebida e associação com perfil lipídico sérico em hipertensos e diabéticos. **Revista Nutrição**, Campinas, 24(1), 109-119, jan/fev, 2011.

LEE, C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. **Clínica Chimica Acta**, 2000.

LUZAK, B.; BONCLER, M.; RYWANIAK J., WILK, R.; STANCZYK, L.; CZYZ, M.; RYSZ, J.; WATALA, C. The effect of a platelet cholesterol modulation on the acetylsalicylic acid-mediated blood platelet inhibition in hypercholesterolemic patients. **European Journal of Pharmacology** v. 658, p. 91–97, 2011.

MARTINEZ, T.L.R.; LOPES, A.C. **Dislipidemias. Da Teoria à Prática**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

MATTIELLO, T.; TRIFIRÒ, E.; JOTTI, G. S.; PULCINELLI, F. M. Effects of Pomegranate Juice and Extract Polyphenols on Platelet Function. **J Med Food** v. 12, p. 334–339, 2009.

MAURI, P.; PIETTA, P. Electrospray characterization of selected medical plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, n. 1, p. 61-68, 2000

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA**. Campinas: v.36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORVING, B. Cardiovascular disease. **Global atlas on cardiovascular disease prevention and control**. Genebra: World Health Organization, 2011. Disponível em

<[http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/publications/atlas\\_cvd/en/index.html](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/index.html)>. Acesso em 06 Nov. 2012

MENDONÇA, J. C. F. Caracterização física e química por espectrometria de massas com ionização por electrospray dos grãos defeituosos e sadios de cafés. **Faculdade de Farmácia da UFMG**, 2008.

MENNEN, L. I. et al. Risks and safety of polyphenol consumption. **Am J Clin Nutr**, v. 81, p.326S–329S, 2005

METZ, D.A. et al. Dietary compliance and cardiovascular risk reduction with a prepared meal plan compared with a self-selected diet. **American Journal Clinical of Nutrition**, v.66, p.373-385, 1997

MICHELIN, D. C. Estudo químico-farmacológico de *Operculina macrocarpa* L. Urb. (CONVOLVULACEAE). **Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus Araraquara**, 2008.

MILUTINOVIC´, M. D.; SILER-MARINKOVIC´, S. S.; ANTONOVIC´, D. G.; MIHAJLOVSKI, K. R.; PAVLOVIC´, M. D.; DIMITRIJEVIC´-BRANKOVIC´, S. I. D. Antioksidativna svojstva susenih ekstrakata iz otpadne espreso kafe. **Hem. Ind.** 67(2) 261-267, 2013

MONROY, G. M. E. R. Caracterización del aroma del café molido de Puerto Rico mediante la técnica de microextracción em fase sólida (spme) y cromatografía de gas acoplada a espectrometría de massas (gc/ms). **Dissertação (Mestrado em Ciencia y Tecnología de Alimentos) – Universidade de Puerto Rico, San José**. p. 156, 2005.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**. 2005, 28(4), 637-41.

MOOREL, K. J.; TABAS, I. Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Cell** v.145, p.341-355, 2011

MOREIRA, R. F. A.; TRUGO, L. C.; De MARIA CAB. Componentes voláteis do café torrado. Parte II: compostos alifáticos, alicíclicos e aromáticos. **Química Nova**. 2000; 23(2), 195-203.

NACZK, M.; SHAHIDI, F.; **J. Chromatogr.**, A, 1054, 95, 2004.

NATELLA, F.; NARDINI, M.; BELELLI, F.; PIGNATELLI, P.; Di SANTO, S.; GHISELLI, A.; VIOLI, F.; SCACCINI, C. Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols Incorporation. **British Journal of Nutrition** v. 100, p. 1276–1282, 2008.

NIGRIS, F. et al. Oxidation-sensitive mechanisms, vascular apoptosis and atherosclerosis. **Trends in Molecular Medicine**, v.9, p.351-359, 2003.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-515, 2010.

NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y. et al. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 668–676, 2005.

NSKI, A. J. R. D.; SKIEWICZ, J. J. D.; NCZYK, Z. Z.; KROL, D. L. Caffeoylquinic acid-rich extract from chicory seeds improves glycemia, atherogenic index, and antioxidant status in rats. **Nutrition** v. 28, p. 300-306, 2012.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011

OOSTERVELD, A., VORAGEN, A. G. J., SCHOLS, H. A. Effect of roasting on the carbohydrate composition of *Coffea Arabica* beans. **Carbohydrate Polymers**, v.54, p. 183-192, 2003.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals**. OECD/OCDE 423. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, 2001. Disponível em <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/assessmentofchemicals/1948370.pdf>>. Acesso em 05 nov. 2012.

OYANAGUI, Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. **Analytical Biochemistry**, v.142, p.290-296, 1984

PAMPLONA, R.; COSTANTINI D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.301, p.R843–R863, 2011.

PANDE, A. H.; TILLU, V. A. Membrane lipid composition differentially modulates the function of human plasma platelet activating factor-acetylhydrolase. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1811, p. 46–56, 2011.

PARROTT, E. Milling. In: Lachmann L, Lieberman HA, Kanig JL (Eds.) **The Theory and Practice of Industrial Pharmacy**. Philadelphia: Lea Febiger, p. 21, 1986.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Tecnologia Farmacêutica**. 6<sup>a</sup> ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002

RAFECAS, M.; GUARDIOLA, F.; ILLERA, M.; CODONY, R.; BOATELLA, J.; J. **Chromatogr.**, 822, 305, 1998.

RIKSEN NP, RONGEN GA, SMITS P: Acute and long-term cardiovascular effects of coffee: Implications for coronary heart disease. **Pharmacology & Therapeutics**, 121:185–191, 2009.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A.; **Food Chem.** 2005, 92, 235.

RUSAK, G.; KOMES, D.; LIKIC, S.; HORZIC, D.; KOVAC, M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 852-858, 2008

SANTOS, P. M.; DE ALMEIDA, P. D. O.; LIMA, E. S.; MORAES, M. O.; DA COSTA, P. M.; MEIRA, A. S.; DO Ó PESSOA, C.; VALENTE, L. M. M.; JUNIOR, V. F. V. Perfil de Flavonóides e Avaliação do Potencial Antioxidante e Citotóxico de *Bauhinia purpurea* (Fabaceae) da Região Amazônica. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 89-94, 2014.

SATO, Y.; ITAGAKI, S.; KUROKAWA, T.; OGURA, J.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, T.; SUGAWARA, M.; ISEKI, K. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics** v. 403, p. 136-138, 2011.

SATO K, AKIBA Y, KIMURA S, HORIGUCHI M. Species differences between chicks and rats in inhibition of lipoprotein hydrolysis by Triton WR-1339. **Camp. Biochem. Physiol**, 11X(3): 315-319, 1995.

SHANMUGANAYAGAM, D.; WARNER, T. F.; KRUEGER, C. G.; REEDB, J. D.; FOLTS, J. D. Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. **Atherosclerosis** v. 190, p. 135-142, 2007.

SHI, X.; DALAL, N. S.; JAIN, A. C. Antioxidant behavior of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. **Fd. Chem. Toxic**, v.29, n.1, p. 1-6, 1991.

SILVA, L. L.; AMICO, E. A. Estudo comparativo entre agregação plaquetária por turbidimetria e impedância elétrica em pacientes sob terapia antiplaquetária à base de ácido acetilsalicílico. **Revista Brasileira de hematologia e hemoterapia**. v. 32, n. 6, p. 463-468, 2010.

SILWAR, R.; LULLMAN, C. The determination of mono and disaccharides in green Arabica and Robusta coffees using high performance liquid chromatography. **Café Cacao The**, v. 32, 1998

SIMÃO, A.M. Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico. **São Paulo: Nobel**, 1985

SIMKIN, A.J.; MOREAU, H.; KUNTZB, M. et al. An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea Arabica*. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p. 1087-1106, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. Florianópolis; Porto Alegre: Ed. da UFSC: Ed. da UFRGS, 2007.

SINET, P.M. et al. Increase in glutathione peroxidase activity in erythrocytes from trisomy 21 subjects. **Biochemistry and Biophysical Research Communications** v.67, p.910-915, 1975.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras de Cardiol**, v. 77 (suplemento III), p 1-48, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, v.88, s1, 2007.

SOLER-ARGILAGA C, RUSSELL RL, HEIMBERG M: Effect of Triton WR 1339 on Lecithin-Cholesterol Acyltransferase in the Rat. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 178: 135-139, 1977.

STEINBERG, D.; WITZTUM, J. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**;30:2311e6, 2012.

STEINBERG, D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. **J. Lipid Res.**, v. 50, S376–S381, 2009.

SVIRIDOV D., MUKHMEDOVA N., REMALEY A.T, CHIN-DUSTING J., NESTEL P. Antiatherogenic functionality of high density lipoprotein: how much versus how good. **J. atheroscler Thromb.** 15:52-62. 2008.

THELLE, D. S. Coffee, tea and coronary heart disease. **Curr Opin Lipidol**, v. 6, 1995.

TEZOTTO, T.; FAVARIN, J.L.; AZEVEDO, R.A. et al. Coffee is highly tolerant to cadmium, nickel and zinc: Plant and soil nutritional status, metal distribution and bean yield. **Field Crops Research** v.125, p.25–34, 2012.

TODA E, ISHIDA H, TAKUYA AOKI T, URANO T, TAKAHARI Y, TAMURA N ET AL: Possible Mechanism of Preventive Effects of Coffee Intake on the Formation of Arterial Occlusive Thrombosis. **Tokai J Exp Clin Med**, 2010, 35 (4):133-136.

TOMKIN, G. H.; OWENS. D. LDL as a Cause of Atherosclerosis. **The Open Atherosclerosis & Thrombosis Journal**, 5, 13-21, 2012.

TRUGO, L. C. **Carbohydrates**. Coffe volume 1-Chemistry-(editores R. J. Clarke e R. Macrae), p. 83-114, Elsevier Applied Science, Londres, 1985.

TRUGO, L. C.; MORAES. R. C. P. Torrefação e granulometria na composição química. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2001, Vitória. **Anais Brasília**, v. 1, 2001.

VALARINI, V.; BATAGLIA, O.C; FAZUOLI, L.C. Macronutrientes em folhas e frutos de cultivares de café arábica de porte baixo. **Bragantia**, v.64, n.4, p.661-672, 2005.

VALENTINE, H. L.; VIQUEZ, O. M.; VALENTINE, W. M. Peripheral nerve and brain differ in their capacity to resolve N,N-diethyldithiocarbamate-mediated elevations in copper and oxidative injury. **Toxicology**, p. 10-17, 2010.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSAR, J.; **Mol. Cell. Biochem.** 2004, 266, 37.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO A. C.; MACIEL M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, vol. 28, n 3, 519-528, 2005.

VILELA, T. C. Qualidade de café despulpado, desmucilado, descascado e natural, durante o processo de secagem, 2002. 66p. **Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin-layer chromatography atlas**, 2nd ed., Springer, Berlin, p 384, 1996.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L.* extracts.**J. Agric. Food Chemistry. Chicago**: v.49, p. 4083-4089. 2001.

YOSHIDA, H.; KISUGI, R. Mechanisms of LDL oxidation.**Clinica Chimica Acta**, v. 411, p. 1875–1882, 2010.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs.**J. Agric. Food Chemistry. Chicago**: v.49, p. 5165-5170, 2002