



Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**ALINE RANGEL SILVA ARAUJO**

AVALIAÇÃO DE APROVEITAMENTO DE RESÍDUO FOLIAR DA CADEIA  
PRODUTIVA DO GRÃO DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

CAMPINAS

2021

**ALINE RANGEL SILVA ARAUJO**

**AVALIAÇÃO DE APROVEITAMENTO DE RESÍDUO FOLIAR DA CADEIA  
PRODUTIVA DO GRÃO DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de Ciências Farmacêuticas — Insumos Farmacêuticos Naturais, Biotecnológicos e Sintéticos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mary Ann Foglio

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ALINE RANGEL SILVA ARAUJO, E ORIENTADA PELA PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MARY ANN FOGLIO.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Ar15a Araujo, Aline Rangel Silva, 1993-  
Avaliação de aproveitamento de resíduo foliar da cadeia produtiva do grão de café (*Coffea arabica* L.) / Aline Rangel Silva Araújo. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Mary Ann Foglio.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Folhas. 2. *Coffea arabica* L.. 3. Atividade antioxidante. 4. Atividade antiproliferativa. 5. Cafeína. I. Foglio, Mary Ann, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of the use of foliar residue in the coffee bean production chain (*Coffea arabica* L.)

**Palavras-chave em inglês:**

Leaves

*Coffea arabica* L.

Antioxidant activity

Antiproliferative activity

Caffeine

**Área de concentração:** Ciências Farmacêuticas: insumos farmacêuticos naturais, biotecnológicos e sintéticos

**Titulação:** Mestra em Ciências

**Banca examinadora:**

Mary Ann Foglio [Orientador]

Catarina Raposo Dias Carneiro

Carmen Sílvia Passos Lima

**Data de defesa:** 25-11-2021

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Farmacêuticas

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5136-1063>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5580636168234634>



Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Autora** Aline Rangel Silva Araujo

**Orientadora** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mary Ann Foglio

Dissertação aprovada em 25 de novembro de 2021

**Comissão Examinadora**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mary Ann Foglio

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Catarina Raposo Dias Carneiro

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmen Silvia Passos Lima

**A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências de Farmacêuticas.**

Campinas, 25 de novembro de 2021.

## DEDICATÓRIA

À minha avó, Irary Maria Rangel (*in memoriam*), uma pessoa muito especial para mim, sendo influência de mulher forte, mãe, educadora e empreendedora, à frente do seu tempo. E a todas as mulheres que se desdobram para conquistar seu espaço e ser quem elas são, independente do que os outros digam que elas devem ser.

## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todos e todas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização desse trabalho, auxiliando-me, dando-me apoio, ouvindo ou dizendo uma palavra amiga.

Agradeço, em especial, à minha família: Minha mãe Waleska e meu pai Abdias por me darem a vida e por sempre me apoiarem em meus projetos, estando comigo em todas as etapas importantes da minha vida, me ajudando nas mudanças e me incentivando nos meus sonhos, vocês são muito importantes pra mim e sem o apoio e base que recebi de vocês nada disso seria concretizado!! Aos meus irmãos Matheus e Michele pelas trocas no dia a dia, à minha sobrinha Manuela por deixar meus dias mais alegres. Ao meu companheiro Lucas, pelo incentivo, desde o início, para que eu realizasse esse mestrado, e por todo o companheirismo e apoio no dia a dia.

À Luna, pela doçura e por ser minha companhia durante a escrita da dissertação (se deitando em cima da dissertação, inclusive rsrs).

Meus agradecimentos à minha orientadora, Mary Ann Foglio (Mari), por todo o acolhimento, e pela confiança de ter aceitado o convite de orientação quando a procurei sem ela nem me conhecer. Eu sou muito grata por todos os ensinamentos e orientação, você é uma pessoa muito especial com um coração grandioso.

Aos meus amigos e companheiros do grupo LAFTEX por todo companheirismo no laboratório, almoços especiais, conversas e dicas de apresentação.

À Universidade Estadual de Campinas e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas por permitirem a realização desse projeto, e à CAPES pelo financiamento da minha bolsa de estudo.

Agradeço ao professor João Ernesto de Carvalho pelos ensinamentos de fitoterapia e de vida durante esse período. Você é um exemplo de ser humano para mim!

À professora Ana Lúcia Ruiz, por toda ajuda, paciência e conhecimento compartilhado, sem você teria sido muito desafiador realizar esse projeto!

À Ilza Maria, pelo acolhimento e compartilhamento de conhecimentos logo que entrei no laboratório.

Aos agricultores Egon, José Maria e Luciano por cederem tão gentilmente as amostras para realização desse trabalho.

À professora Anita Marsioli e à Iramaia Angélica pelo auxílio nos testes desse trabalho.

Aos meus vizinhos e amigos Fabíola e Mário pela companhia, jantares e conversas, me fazendo sentir acolhida em Campinas.

À mãe natureza por permitir a vida nesse planeta, por todas as sincronias e pessoas maravilhosas que encontrei durante essa caminhada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001. Processos n°: 88882.435051/2019-01, 88887.480152/2020-00 e 88887.509578/2020-00.

## RESUMO

O *Coffea arabica* L. (Rubiaceae) é um arbusto adaptado a climas tropicais e subtropicais sendo o Brasil o maior produtor e exportador de grãos no mundo. Durante a colheita e beneficiamento do grão de café muitos subprodutos são gerados no processo. Nesse contexto, a busca por melhor utilização de resíduos de produção leva a sustentabilidade ambiental e econômica. O objetivo do trabalho foi avaliar a aplicabilidade farmacêutica do resíduo foliar da cadeia produtiva do grão de café arábica visando o aproveitamento. Os extratos e frações foram obtidos por 2 métodos distintos, turbólise e extração sucessiva com troca de solvente, os perfis químicos foram comparados por cromatografia em camada delgada, o teor de compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de *Folin-Ciocalteu*, o doseamento de cafeína através da cromatografia líquida de alta eficiência, avaliação da atividade antioxidante através do método de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), avaliação da atividade anticâncer segundo o modelo *in vitro* de avaliação do potencial antiproliferativo em linhagens celulares e avaliação da atividade de migração celular *in vitro* através o ensaio de *scratch assay*, utilizando queratinócitos não-tumorais imortalizados (HaCat) e fibroblastos gengivais (HGF). Os maiores doseamentos de compostos fenólicos totais foram determinados na fração acetato de etila (AC) (289,75±7,12 µg de ácido cafeico equivalente/mg de extrato) e no extrato das amostras coletadas na cidade de Ouro Fino (MG) (193,63±11,68 µg de ácido cafeico equivalente/mg de extrato). Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante, exceto a fração de diclorometano (DCM), os maiores resultados foram obtidos no extrato resultante da primeira coleta realizada na cidade de Toledo (PR1) (IC<sub>50</sub>=141,32±6,43 µg/mL) e AC (IC<sub>50</sub>=108,64±6,92 µg/mL). Nos doseamentos de cafeína obtivemos maior extração pela fração AC (11,77% m/m) e menor extração pela fração de água destilada (AG) (0,19% m/m). Os extratos possuem teor de cafeína entre PR1 (2,52% m/m) e amostra coletada em São Jerônimo da Serra (ES) (3,93% m/m). Os extratos MG (GI<sub>50</sub> = 24,4 ± 3,5 µg/mL), PR1 (GI<sub>50</sub> =26,6 ± 14,5 µg/mL), DCM (GI<sub>50</sub> estimada de 15 µg/mL) e o extrato obtido de amostras coletadas na cidade de Jaboticabal (SP) (GI<sub>50</sub> =22,9 ± 10,8 µg/mL), demonstraram atividade citostática seletiva frente a linhagem tumoral de glioblastoma (U251), também o extrato DCM (GI<sub>50</sub> =26,9 ± 19,5 µg/mL) demonstrou atividade citostática frente a linhagem HaCat. Os demais extratos não apresentaram efeitos citotóxicos ou proliferativos sobre as linhagens celulares testadas. Os extratos não apresentaram efeito significativo sobre a atividade de migração celular em células HaCat e HGF. Conclui-se que as folhas de café arábica constituem em um resíduo de colheita rico em compostos fenólicos, são fonte de cafeína e demonstram atividade antioxidante, e citostática seletiva frente a linhagem U251, podendo seu potencial ser melhor explorado na fabricação de medicamentos, cosméticos e alimentos com alegações funcionais.

## ABSTRACT

*Coffea arabica* L. (Rubiaceae) is a perennial shrub adapted to tropical and subtropical climates. Brazil is the largest producer and exporter of coffee beans worldwide. Many by-products are generated throughout the coffee bean production process. Therefore, research for the better use of production residues is fundamental for improvements in environmental and economic sustainability. The aim of this study was to evaluate the leaves pharmaceutical applicability, that is among waste products of *Coffea arabica* L. bean production chain. The chemical profiles were compared by thin-layer chromatography, the content of total phenolic compounds was determined by the Folin-Ciocalteu reagent, and the content of caffeine was measurement by high-performance liquid chromatography. The antioxidant activity was estimated with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, evaluation of the anticancer activity according to the *in vitro* model for evaluation of antiproliferative potential in cell lines, and evaluation of the cell migration activity *in vitro* by the scratch assay, using immortalized non-tumoral keratinocytes (HaCat) and fibroblasts (HGF). The highest amounts of total phenolic compounds were determined in the ethyl acetate fraction (AC) ( $289.75 \pm 7.12$   $\mu\text{g}$  of caffeic acid equivalent/mg of extract) and the extract of samples collected in Ouro Fino (MG) ( $193.63 \pm 11.68$   $\mu\text{g}$  of caffeic acid equivalent/mg of extract). All samples showed antioxidant activity, except the dichloromethane fraction (DCM). The highest results were obtained in the extract resulting from the first collection performed in Toledo (PR1) ( $\text{IC}_{50} = 141.32 \pm 6.43$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and AC ( $\text{IC}_{50} = 108.64 \pm 6.92$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). In the caffeine assays, we obtained higher extraction by the AC fraction (11.77% m/m) and lower extraction by the distilled water (AG) fraction (0.19% m/m). The caffeine content varied from 2.52% m/m (PR1) to 3.93% m/m determined for the sample collected in São Jerônimo da Serra (ES). The extracts from MG ( $\text{GI}_{50} = 24.4 \pm 3.5$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), PR1 ( $\text{GI}_{50} = 26.6 \pm 14.5$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), DCM (estimated  $\text{GI}_{50}$  of 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and the extract obtained from samples collected in Jaboticabal (SP) ( $\text{GI}_{50} = 22.9 \pm 10.8$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) showed selective cytostatic activity against glioblastoma tumor cell line (U251), furthermore DCM extract ( $\text{GI}_{50} = 26.9 \pm 19.5$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) showed cytostatic activity against HaCat cell line. The other extracts did not show cytotoxic and/or proliferative effects on the tested cell lines. The extracts had no significant effects on cell migration activity in HaCat and HGF cells. Therefore *Coffea arabica* leaves constitute a harvest residue rich in phenolic compounds, a source of caffeine which demonstrated antioxidant activity and selective cytostatic activity against U251 cell line. Further studies will highlight opportunities for pharmaceutical, cosmetics, and foods with functional claims products manufacture.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Resíduos gerados na colheita e processamento dos grãos de café .....	22
Figura 2: Delineamento da placa P0 utilizada na avaliação sobre a proliferação <i>in vitro</i> . .....	42
Figura 3: Delineamento da placa P1 utilizada na avaliação sobre a proliferação celular <i>in vitro</i> . .....	42
Figura 4: Coleta e extração de folhas de <i>coffea arabica</i> L. ....	45
Figura 5: Placas de cromatografia de camada delgada (CCD) após aplicação dos extratos, tratamento com o reagente NP/PEG, revelação com luz ultravioleta ( $\lambda = 365$ nm) e luz visível, respectivamente. ....	46
Figura 6: Regressão linear do padrão de ácido cafeico segundo método de Folin-Ciocalteu .....	48
Figura 7: Conteúdo de fenóis totais segundo o método de Folin-Ciocalteu (Método 1 de extração). ....	49
Figura 8: Conteúdo de fenóis totais segundo o método de Folin-Ciocalteu (Método 2 de extração). ....	50
Figura 9: Teste de <i>Tukey</i> assumindo intervalo de 95% de confiança para o ensaio fenólicos totais segundo método 1 de extração .....	50
Figura 10: Teste de <i>Tukey</i> assumindo intervalo de 95% de confiança para o ensaio fenólicos totais segundo método 2 de extração .....	51
Figura 11: Curva de calibração do padrão de cafeína segundo método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	52
Figura 12: Conteúdo de cafeína segundo o método de cromatografia líquida de alta eficiência (Método 1 de extração). ....	53
Figura 13: Conteúdo de cafeína segundo o método de cromatografia líquida de alta eficiência (Método 2 de extração). ....	54
Figura 14: Cromatogramas dos extratos de folhas de café arábica pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência. ....	54
Figura 15: Gráfico de atividade antirradicalar segundo método DPPH para extratos obtidos pelo método 1 de extração .....	58
Figura 16: Gráfico de atividade antirradicalar segundo método DPPH para extratos obtidos pelo método 2 de extração .....	58
Figura 17: Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> de extratos de folha de café arábica em painel de linhagens celulares, tumorais e não-tumoral, após 48 horas de tratamento. ....	60
Figura 18: Avaliação da influência de extratos de café arábica sobre a migração celular de queratinócitos imortalizados (HaCat), fotografias nos tempos 0, 12 e 24 horas, respectivamente, após a exposição. ....	62
Figura 19: Valores médios de porcentagem de migração celular relativa (MCR) após 24h de exposição de queratinócitos imortalizados (HaCat) a extratos de café arábica, segundo o ensaio de scratch assay, método 1 de extração.....	65
Figura 20: Teste de <i>Tukey</i> assumindo intervalo de 95% de confiança para o ensaio <i>Scratch assay</i> segundo método 1 de extração.....	66
Figura 21: Valores médios de porcentagem de migração celular relativa (MCR) após 24h de exposição de queratinócitos imortalizados (HaCat) a extratos de café arábica, segundo o ensaio de scratch assay, método 2 de extração.....	66
Figura 22: Teste de <i>Tukey</i> assumindo intervalo de 95% de confiança para o ensaio <i>scratch assay</i> segundo método 2 de extração. ....	67

Figura 23: Avaliação da influência de extratos de café arábica sobre a migração celular de fibroblastos gengivais (HGF), fotografias nos tempos 0 e 17 horas, respectivamente, após a exposição. ....	68
Figura 24: Estrutura de alguns compostos fenólicos presentes no café arábica.....	76
Figura 25: Estruturas químicas de alguns dos alcaloides encontrados no café. ....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química do café verde. ....	25
Tabela 2: Condições cromatográficas para análise de cafeína em extratos de folhas de café, conforme De Andrade (1995). ....	36
Tabela 3: Linhagens celulares utilizadas na avaliação sobre a proliferação <i>in vitro</i> ..	39
Tabela 4: Dados das coletas das amostras de folhas de <i>Coffea arabica</i> L.....	44
Tabela 5: Definições das siglas para referência das amostras obtidas segundo os métodos de extração. ....	45
Tabela 6: Fator de retenção das bandas e correlações com os extratos, tratamento com o reagente PN/PEG e revelação com luz ultravioleta ( $\lambda = 365$ nm). ....	47
Tabela 7: Fator de retenção das bandas cromatográficas correlacionadas ao extrato, obtidas pelo tratamento com o reagente PN/PEG e revelação com luz branca visível. ....	47
Tabela 8: Conteúdo de compostos fenólicos totais nos extratos de folhas de café arábica, obtidos através do método de Folin-Ciocalteu.....	48
Tabela 9: Parâmetros avaliados segundo a linearidade do método de Folin-Ciocalteu. ....	49
Tabela 10: Tempo de retenção do pico de interesse nas amostras avaliadas pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência. ....	52
Tabela 11: Conteúdo de cafeína nos extratos de folha de café arábica, doseamento segundo método de cromatografia líquida de alta eficiência.....	53
Tabela 12: Porcentagem média de inibição do radical DPPH pelas amostras de extratos de café arábica e respectivo $IC_{50}$ , segundo método 1 de extração. ....	57
Tabela 13: Porcentagem média de inibição do radical DPPH pelas amostras de extratos de café arábica e respectivo $IC_{50}$ , segundo método 2 de extração. ....	57
Tabela 14: Resultados de $GI_{50}$ após 48 h de exposição de linhagens celulares a extratos de café arábica, segundo método de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> . ....	60
Tabela 15: Valores médios de porcentagem de migração celular relativa (MCR) após 24h de exposição de queratinócitos imortalizados (HaCat) a extratos de café arábica, segundo o ensaio de <i>scratch assay</i> . ....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% m/m:	porcentagem massa/massa
786-0	linhagem tumoral de rim
B16F10	linhagem tumoral murina (melanoma).
AC	fração acetato de etila
ACE	ácido cafeico equivalente
AG	fração água destilada
ANOVA	análise de variância
CCD	cromatografia em camada delgada
CO <sub>2</sub>	gás carbônico
CONAB	companhia nacional de abastecimento
DCM	fração diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
ES	extrato Espírito Santo
ET	fração etanol 70%
Fox01	<i>the forkhead box class O</i>
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
GI <sub>50</sub>	<i>growth inhibition 50</i>
HaCat	queratinócito imortalizado não-tumoral
HeLa	linhagem celular imortal derivada de células de câncer cervical
HGF-1	fibroblastos humanos
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
IC <sub>50</sub>	<i>inhibition concentration 50</i>
MCF-7	linhagem celular de mama responsiva a hormônios
MCR	migração celular relativa
MG	extrato Minas Gerais
NCI-H460	células de pulmão, tipo não pequenas células.
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
NP-PEG.	<i>natural products – polyethylene glycol</i>
PI3K/PKB-mTOR	<i>phosphoinositide 3-kinases/ protein kinase B - mechanistic target of rapamycin</i>
PR1	extrato Paraná coleta dia 23/03
PR2	extrato Paraná coleta dia 06/04
Rf	<i>ratio to front</i>
ROCK	<i>rho-associated protein kinase</i>
RPMI	<i>Roswell park memorial institute</i>
SBF	soro bovino fetal
SisGen	sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado
SP	extrato São Paulo
SRB	sulforrodamina B
TCA	<i>trichloroacetic acid</i>
Trolox	<i>6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman- 2-carboxylic acid</i>
U251	linhagem celular de glioma
UV	Ultravioleta

## LISTA DE SÍMBOLOS

p	nível de significância
r	coeficiente de correlação de Pearson
R <sup>2</sup>	coeficiente de determinação
λ	comprimento de onda
μ	unidade micro
•	representa o elétron desemparelhado
®	marca registrada
°C	unidade de temperatura
%	Porcentagem

# SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>17</b>
2.1.	HISTÓRICO DO CAFÉ	17
2.2.	BIENALIDADE DO CAFÉ	18
2.3.	CUSTOS DE PRODUÇÃO	19
2.4.	GERAÇÃO DE RESÍDUOS E IMPORTÂNCIA DO APROVEITAMENTO	21
2.5.	O GRÃO E SEUS RESÍDUOS	24
2.5.1.	<i>Composição química e substâncias bioativas do café verde</i>	24
2.5.2.	<i>Atividades farmacológicas</i>	25
2.6.	A FOLHA DO CAFÉ	27
2.6.1.	<i>Composição química e usos industriais</i>	27
2.6.2.	<i>Usos tradicionais e atividades farmacológicas</i>	29
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
3.1.	OBJETIVO GERAL	31
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
4.1.	COLETA DE INSUMOS VEGETAIS E PRODUÇÃO DE EXTRATOS	31
4.2.	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	33
4.3.	AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS	35
4.4.	DOSEAMENTO DE CAFEÍNA	36
4.5.	ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH	37
4.6.	AVALIAÇÃO SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR <i>IN VITRO</i>	39
4.7.	AVALIAÇÃO SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR <i>IN VITRO</i>	42
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>43</b>
5.1.	COLETA DE INSUMOS VEGETAIS E PRODUÇÃO DE EXTRATOS	43
5.2.	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	46
5.3.	AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS	47
5.4.	DOSEAMENTO DE CAFEÍNA	51
5.5.	ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH	57
5.6.	AVALIAÇÃO SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR <i>IN VITRO</i>	59
5.7.	AVALIAÇÃO SOBRE A MIGRAÇÃO CELULAR <i>IN VITRO</i>	62
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>85</b>

## 1. Introdução

O café é uma planta pertencente ao gênero *Coffea* da família *Rubiaceae*, e segundo os registros teve origem na Etiópia (MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012). Adaptado a climas tropicais e subtropicais sendo cultivado em diversos países, o Brasil é o maior produtor e exportador do grão de café do mundo. (EMBRAPA CAFÉ, 2021; MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012). Em janeiro de 2021, a estimativa de área plantada era de 2,19 milhões de hectares, sendo que aproximadamente 1,76 milhões de hectares possuem plantas em fase de frutificação (ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA, 2021). Dentre as espécies cultivadas no Brasil o café arábica tem maior expressão, representando 80% dos hectares plantados (ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA, 2021).

A produção do café fora de seu *habitat* natural tem uma característica de bienalidade, que consiste em uma alternância de produtividade, ou seja, um ano a planta apresenta alta produtividade seguido de baixa produtividade, no ano seguinte. A bienalidade ocorre por causa da competição entre funções vegetativas e reprodutivas da planta, devido a alteração dos fatores ambientais a que está submetida (DAMATTA *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2011).

Os custos de manutenção da lavoura em relação ao preço da saca de café, em 2017, eram de aproximadamente 22% para café orgânico e 38% para café convencional, no ano de bienalidade positiva (MATIELLO; DIAS; FRANCO, 2017). No período de bienalidade negativa, esses custos podem aumentar significativamente, gerando impactos para o pequeno e médio produtor rural, e para os trabalhadores rurais envolvidos no cultivo da planta (ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA, 2021; MARTINS *et al.*, 2019). Alternativas que gerem aumento da renda dos produtores rurais nos anos de bienalidade negativa, podem contribuir para a geração de empregos nesse período, e conseqüente melhoria da economia local, contornando os desafios enfrentados pela diminuição da produção do grão.

O aproveitamento dos resíduos gerados no processo constitui uma importante alternativa, tanto para o aumento da renda local, como para o desenvolvimento de sustentabilidade ambiental, já que muitos desses resíduos são descartados na natureza (DURÁN *et al.*, 2017). Durante a colheita e beneficiamento do grão, vários tipos de resíduos são gerados, contabilizando dez milhões de toneladas de resíduos, exceto folhas e galhos (DURÁN *et al.*, 2017; ECHEVERRIA;

NUTI, 2017). Em relação as folhas, 33 a 60% das folhas do pé são perdidas entre os meses de maio e setembro (SILVEIRA; CARVALHO, 1996) Na colheita, elas são arrancadas do pé pelo chacoalhamento da planta.

Os resíduos do fruto do café vêm sendo amplamente estudados, e apresentam atividades farmacológicas importantes. Os compostos já identificados, como flavonoides, alcaloides, ácidos fenólicos e terpenos (AFFONSO *et al.*, 2016; DUANGJAI *et al.*, 2016; DURÁN *et al.*, 2017; PATAY *et al.*, 2018; ZUHAIR MOHD ZAIN, 2018) são responsáveis por atividades biológicas, como atividade antioxidante, cicatrizante, estimulante, anticâncer, antienvhecimento, proteção solar, antibacteriano, combate a celulite, tratamento de hiperpigmentação, entre outros (AFFONSO *et al.*, 2016; BOWE; PUGLIESE, 2014; CHOI; KOH, 2017; DAI; MUMPER, 2010; DUANGJAI *et al.*, 2016; DURÁN *et al.*, 2017; FARRIS, 2007; FISK *et al.*, 2014; IRIONDO-DEHOND *et al.*, 2016; MOREIRA *et al.*, 2018; ONTAWONG *et al.*, 2019; PATAY; BENCSIK; PAPP, 2016; SCHMID *et al.*, 2012). Alguns usos na indústria alimentícia, farmacêutica, e para geração de energia, entre outros, têm sido implementados (ECHEVERRIA; NUTI, 2017; MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012)

Outro resíduo de produção de cultura do café, são as folhas que recentemente vêm ganhando atenção de parte da comunidade científica. Possuem em sua composição, os ácidos fenólicos, ácidos clorogênicos, flavonoides, xantonas e alcaloides (CHEN; MA; KITTS, 2018; DE ALMEIDA *et al.*, 2019; PATAY; BENCSIK; PAPP, 2016) com descrição na literatura de atividades antioxidante, anti-inflamatória e prevenção do envelhecimento causado por radiações UV, anti-hipertensiva, antibacteriana e antifúngica (MARCHEFAVE *et al.*, 2019; SEGHETO *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2017). Não foram encontrados na literatura estudos de avaliação da atividade anticâncer e cicatrizante. Apesar das atividades farmacológicas descritas e do potencial dos compostos químicos, atualmente as folhas vêm sendo empregadas principalmente como cobertura morta da plantação, e uma pequena parte para preparação de chás com alegações funcionais, e como matéria-prima para extração de compostos químicos (DE ALMEIDA *et al.*, 2019; KLINGEL *et al.*, 2020; SITE DO CAFÉ, [s. d.]

Dessa forma, devido a necessidade de implementação de alternativas para geração de renda no período de bienalidade negativa, o aproveitamento do resíduo foliar da planta representa uma alternativa a ser explorada. Esse trabalho, é um estudo preliminar, que pretende contribuir para um maior conhecimento do potencial

farmacológico deste insumo foliar renovável das plantações de café, visando agregar valor comercial a este resíduo de cultura e possibilitando novas formas de aproveitamento. Nesse estudo foi realizada avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH, e verificação das atividades antiproliferativa *in vitro* e de migração celular *in vitro*, ainda não descritas na literatura científica para os extratos das folhas de café arábica.

## 2. Revisão da literatura

### 2.1. Histórico do café

O café é uma planta pertencente ao gênero *Coffea* da família *Rubiaceae* que segundo os registros teve origem nas florestas subtropicais na Etiópia, no continente africano (MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012a). O primeiro relato sobre a descoberta do café, foi registrado num manuscrito do lêmên, no ano de 575. Nesse relato, um pastor da Etiópia observou que cabras quando comiam folhas e frutos de um arbusto ficavam mais ágeis, e com maior resistência para subir montanhas íngremes e percorrer longos trajetos, observando um efeito estimulante. Mais tarde, o pastor experimentou os frutos e confirmou o efeito estimulante do café (MARTINS, A. L., 2008).

Os relatos mostram que naquela época o fruto do café era misturado as refeições ou consumido sozinho. As folhas também eram consumidas, maceradas para o preparo de chás. Entretanto, a técnica inicial do plantio e preparação do produto foi realizada inicialmente pelos árabes. De acordo com o manuscrito do ano de 575, as primeiras sementes foram plantadas no sudoeste da Ásia, no lêmên. A infusão das frutas em água fervente foi feita somente no ano 1000, iniciando o uso para fins medicinais e para vigílias noturnas e reza de monges (MARTINS, A. L., 2008).

No Brasil, segundo os relatos, a introdução do café foi realizada pelo Francisco de Melo Palheta, agente do rei de Portugal, com mediações de Madame D'Orvilliers. Francisco de Melo, introduziu as sementes inicialmente no estado do Pará, sendo que as cultivou como agricultor, e o café, com o passar do tempo, foi difundido pela ideia de máxima exploração das terras do Brasil, regido pela política mercantilista (MARTINS, A. L., 2008). Botanicamente, a primeira classificação o incluiu como pertencente à família dos evônimos, arbusto com propriedades medicinais e ornamentais. Porém entrou oficialmente nos compêndios de botânica

pelo Lineus, no *Sistema Naturae*, publicado em 1735. Existem pelo menos 25 espécies utilizadas, originadas na África e em algumas ilhas do oceano Índico. Comercialmente, são utilizadas duas espécies: o *Coffea arabica*, que fornece o café arábica, bebida de gosto suave, aromático, redondo a achocolatado e o *Coffea canephora* variedade *robusta*, que fornece o café conillon, que é mais resistente a pragas e condições adversas, porém oferece uma bebida mais amarga e adstringente, não tão apreciada pelo sistema de qualificação da bebida (CARVALHO, 2007; MARTINS, A. L., 2008). No Brasil, 77% da produção nacional corresponde ao café arábica (ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA, 2021)

Os grãos de café, atualmente, são uma das *commodities* de exportação brasileira, sendo o Brasil a maior potência desse segmento, destacando-se como o maior produtor e exportador mundial. A exportação dos grãos movimenta anualmente aproximadamente 963 milhões de dólares (EMBRAPA CAFÉ, 2021), e atualmente estima-se que existam 2,19 mil hectares destinados a agricultura e 8 milhões de empregos para trabalhadores envolvidos na cadeia produtiva, beneficiamento e comercialização do grão. Os três estados brasileiros de maior produção no ano de 2020 foram, Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo, sendo que o estado de Minas Gerais é o atual maior produtor, com 55% da produção nacional (ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA, 2021; CECAFÉ, 2021)

## 2.2. Bienalidade do café

As populações naturais de café arábica são restritas às florestas das terras altas do sudoeste da Etiópia (MISHRA, 2019) em regiões de altitudes entre 1600 e 2800 metros. A faixa pluviométrica anual ideal é de 1200-1800 milímetros, porém essa faixa ideal também depende das propriedades de retenção do solo, umidade atmosférica e cobertura de nuvens. É característica da planta necessitar de um curto período de seca, com duração de dois a quatro meses, correspondendo à fase de crescimento quiescente, para estimular a floração. Locais onde ocorrem chuvas abundantes o ano todo resultam em colheitas dispersas e de baixos rendimentos (CANNELL, 1985; DAMATTA *et al.*, 2007).

A faixa ideal de temperatura média anual é de 18 a 21 °C. Quando a temperatura ultrapassa os 23°C, o desenvolvimento e o amadurecimento dos frutos são acelerados. As faixas de temperatura alta durante a floração, especialmente se

associada a um período prolongado de seca, podem ocasionar no aborto das flores (CAVATTE *et al.*, 2012; DAMATTA *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2014). Entretanto, a seleção de cultivares permitiu que as plantações de café arábica se propagassem para regiões com temperaturas médias de até 25°C, com rendimentos satisfatórios, como ocorreu em algumas regiões do Brasil (DAMATTA *et al.*, 2006). O café arábica não é tolerante a ventos fortes de cisalhamento e a geadas, o que acarretaria em dano nas plantas e no rendimento de produção (DAMATTA *et al.*, 2007, 2006). Independentemente do momento da formação, a queda de folhas nos cafeeiros aumenta no final da estação seca, que coincide com os períodos de colheita e pós-colheita (SILVEIRA; CARVALHO, 1996).

A floração do café envolve uma sequência complexa de eventos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos que são afetados por vários fatores, como temperatura, luz, disponibilidade de água no solo e no ar, relação carbono-nitrogênio e genótipo (DAMATTA *et al.*, 2007; IVAMOTO *et al.*, 2017; MISHRA, 2019; MARTINS *et al.*, 2014). O crescimento vegetativo e o desenvolvimento do fruto parecem ocorrer em momentos distintos, sugerindo uma incompatibilidade ou competição entre os processos, que são modulados por fatores ambientais (DAMATTA *et al.*, 2007). Nas terras nativas e em regiões não equatoriais o desenvolvimento das flores e frutos é dividido de modo a maximizar a probabilidade de que os frutos cresçam durante o período chuvoso, e após um fluxo de folhas novas (CANNELL, 1985). Isso permite o desenvolvimento de uma área foliar suficiente para suportar a expansão subsequente dos frutos. Porém, quando o café é cultivado em regiões onde não existe sombra, como exemplo do que ocorre no Brasil, o cafeeiro tende a florescer intensamente, produzindo uma alta safra sem um equilíbrio com a formação de área foliar. Isso gera estresse na planta, acarretando diversas alterações e também na característica de bienalidade, pois no ano seguinte à intensa produção, a planta irá se recuperar do desgaste do ano anterior dando prioridade ao crescimento vegetativo. Os frutos, também podem restringir o fornecimento de nutrientes às raízes. Resultando em morte precoce de partes da planta ou da planta inteira (DAMATTA *et al.*, 2007).

### 2.3. Custos de produção

A classificação de uma lavoura em rentável ou não-rentável depende de diversas análises de custos e de lucros, relacionados à produção. Em relação ao lucro,

uma característica importante é que, por se tratar de uma *commodity* agrícola, os produtores rurais não conseguem participar da decisão do preço final da saca dos grãos de café (CUNHA, 2020).

Em relação aos custos, a Conab (Companhia nacional de abastecimento) estabelece orientações dispostas na forma de guia sobre o gerenciamento e controle de custos e despesas da lavoura (CONAB, 2010). Nesses cálculos, são incluídos custos fixos e variáveis. Considera-se como custo variável as despesas operacionais, mão de obra e administrativas, de armazenagem e beneficiamento, impostos, seguros, juros, entre outros. Os custos fixos abrangem as depreciações das instalações e equipamentos, a manutenção periódica, os encargos sociais, remuneração esperada sobre o capital fixo e sobre o cultivo. A soma resulta nos custos totais da produção (CONAB, 2010; CONAB, 2021).

Cunha (2020), demonstrou que a rentabilidade da produção de café arábica pode variar de região para região produtora, dependendo da gestão dos custos realizada no local. As avaliações realizadas demonstraram que das regiões produtoras avaliadas, 47% estão operando abaixo da escala ótima de eficiência, sendo necessária realização de ajustes nos custos de produção, com o objetivo de minimizar os desperdícios (CUNHA, 2020).

Além da região produtora, o ano avaliado também influencia na análise de custos de produção, decorrente das variações por inflações, ajustes anuais e bienalidade do café. No ciclo de 2016/2017, estimou-se que a cada hectare, produtores da região do Sul de Minas Gerais (Botelho-MG) gastaram R\$8.120,00 em lavoura convencional e R\$10.145,00 em lavoura orgânica durante o ano. A porcentagem de custo em relação ao preço do produto representou 38% para agricultura convencional e 22% para agricultura orgânica (MATTIELO, DIAS E FRANCO, 2017)

A sustentabilidade econômica é mantida quando diversos fatores componentes são atingidos, por exemplo, os gastos devem representar menos que 30% considerando o valor comercializado. Uma porcentagem maior que 50% gera um indicador de não sustentabilidade. Outros indicadores utilizados para classificação como lavoura sustentável, são a presença de certificação orgânica, realização do controle de gastos, diversidade de fontes de renda dentro da propriedade agrícola, como a presença de outras culturas e formas de lucros alternativos a produção do

grão de café, como o reaproveitamento dos resíduos de lavoura, entre outros (DOURADO, 2021).

#### 2.4. Geração de resíduos e importância do aproveitamento

Após a floração da planta, o fruto passa pelos estágios de formação dos chumbinhos (ou *pinhead stage*); expansão dos frutos através da divisão celular do endosperma e do perisperma; crescimento do endosperma e enchimento do espaço entre endosperma e perisperma (conhecido também como fase de granação); e maturação (CONAB, 2021; DAMATTA *et al.*, 2017). A colheita do café é realizada uma vez por ano principalmente entre os meses de março e outubro, podendo estender até dezembro dependendo das condições ambientais do local de plantio (CONAB, 2021).

O processo de colheita e beneficiamento dos grãos é um processo com várias etapas que geram diferentes tipos de resíduos (DÚRAN *et al.*, 2017). Por ser a produção cafeeira uma das maiores agroindústrias brasileiras, é responsável por uma grande geração de resíduos, que muitas vezes são descartados na natureza, sem tratamento prévio. A partir da geração de resíduos etapas que aproveitem melhor o potencial dos mesmos, geram sustentabilidade ambiental e econômica ao processo (ECHEVERRIA; NUTI, 2017; FRANCA; OLIVEIRA, 2009; MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012).

A primeira etapa do processo consiste na colheita, podendo ser manual ou mecanizada, tendo folhas e galhos arrancados do pé pelo chacoalhamento da planta. Estima-se que 33% a 60% das folhas são perdidas anualmente, independente da colheita (DAMATTA *et al.*, 2007). Atualmente, as folhas e galhos são utilizadas principalmente como cobertura morta da plantação, compostagem, para uso em lenha, e uma pequena parcela das folhas é destinada a preparação de chás, e extração de compostos químicos (KLINGEL *et al.*, 2020; MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012). Após a colheita, a próxima etapa corresponde a secagem do fruto.

Existem dois processos principais de secagem aos quais os frutos são submetidos, o processo por via úmida e por via seca. O processo por via úmida é menos utilizado pelos agricultores, e nele ocorre primeiramente a lavagem e despulpamento dos frutos, nessa etapa são gerados resíduos de poupa e água de lavagem. Existem estudos de aproveitamento da água de lavagem na fabricação de biogás, fertirrigação, extração de compostos químicos. A poupa gerada pelo processo

pode ser utilizada também na produção de biogás, nos processos de combustão e geração de energia, na produção de bioetanol, e na fertirrigação (DÚRAN *et al* 2017; ECHEVERRIA; NUTI, 2017). Também existem estudos para emprego na fabricação de ração animal, fertilizante orgânico, alimentos e para fermentação de bebidas (ECHEVERRIA; NUTI, 2017; KLINGEL *et al*, 2020). Além disso, uma parte é destinada para extração de pectina e compostos de interesse farmacêutico, como os taninos e a cafeína (ECHEVERRIA; NUTI, 2017).

A partir do despulpamento, os grãos são expostos ao sol em terreirões para secagem, onde é retirado o último resíduo que envolve o grão, o pergaminho. O pergaminho pode ser utilizado para produção de energia, em processos de combustão e gaseificação, na composição de *pellets*, fabricação de papel e polímeros e fibras dietéticas (ECHEVERRIA; NUTI, 2017; KLINGEL *et al*, 2020). Os grãos secos passam por processo de torrefação e moagem. Após o uso é obtido o último resíduo do processo, o café torrado gasto, que atualmente tem estudos para uso em biodiesel e cosméticos (ECHEVERRIA; NUTI, 2017).

No segundo tipo de processo de secagem, por via seca, o grão do café é colocado direto ao sol para secagem sem despulpamento inicial. Essa via é a mais utilizada atualmente por possuir menos etapas e envolver menos custos de produção. Após a secagem dos grãos eles são descascados, acarretando na geração de resíduos, como cascas, películas prateadas e pergaminhos. A película prateada é utilizada em cosméticos antienvhecimento e produtos farmacêuticos, devido a sua atividade antioxidante. Após serem descascados os grãos estão prontos para torrefação e moagem (ECHEVERRIA; NUTI, 2017; MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012).

**Figura 1:** Resíduos gerados na colheita e processamento dos grãos de café



Fonte: Google imagens

A partir da geração dos resíduos, as etapas de valorização dos mesmos levam notáveis melhorias na sustentabilidade ambiental e econômica (MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012). Em relação à sustentabilidade ambiental de lavouras de café, alguns dos parâmetros utilizados como componentes de sustentabilidade são o reaproveitamento dos resíduos orgânicos gerados, a porcentagem de adubos orgânicos utilizados na plantação, e a realização da cobertura do solo. Quanto maior a quantidade de resíduos reaproveitados, aliado aos demais fatores, maior a indicação de sustentabilidade ambiental naquele local (DOURADO, 2021).

Em relação aos parâmetros de sustentabilidade econômica é interessante citar que o preço do produto em relação aos custos de produção e o grau de endividamento em relação ao valor do patrimônio, aliado a outros parâmetros, podem estimar a sustentabilidade econômica da propriedade rural (DOURADO, 2021). O reaproveitamento de resíduos produzidos, pode auxiliar tanto na complementação da renda do produtor, evitando o endividamento, quanto na busca de melhores relações com o meio ambiente, visando sustentabilidade ambiental.

## 2.5. O grão e seus resíduos

### 2.5.1. Composição química e substâncias bioativas do café verde

O fruto do café é composto por uma mistura complexa que inclui diversos carboidratos, proteínas, lipídios, minerais, lignina, compostos nitrogenados, ácidos clorogênicos, óleos e ceras (PATAY *et al.*, 2018; ZUHAIR MOHD ZAIN, 2018). Os principais constituintes do fruto do café verde são polissacarídeos insolúveis (~ 50%), como celulosas e hemicelulosas. Além de carboidratos complexos, contém mono e oligossacarídeos, proteínas (9-12%) e aminoácidos (~1%). Dos compostos nitrogenados não proteicos, o mais estudado no café verde é a cafeína (~1,4%), cuja concentração depende fortemente da variedade e das condições de cultivo, seguido pela trigonelina (~ 1,2%) e traços de teofilina e teobromina (DURÁN *et al.*, 2017; GUPTA; SAINI; SINGH, 2020; PATAY; BENCSIK; PAPP, 2016; PATAY *et al.*, 2018; VALARINI; BATAGLIA; FAZUOLI, 2005; ZUHAIR MOHD ZAIN, 2018).

Também estão presentes elementos minerais (3-4,5%) como cálcio, potássio, magnésio, cobre, ferro e manganês. Os ácidos voláteis (0,1%) incluem ácido acético, propanoico, e ácidos não voláteis (2-3%), como o ácido cítrico, málico e quínico. A fração lipídica (8-16%) da composição química do grão de café cru, é composta principalmente por triacilgliceróis, esteróis e tocoferóis. Adicionalmente, o óleo de café possui uma fração insaponificável que contém cafestol e caveol, dois furanoditerpenos da família dos cauranos, de grande importância medicinal (DURÁN *et al.*, 2017; GUPTA; SAINI; SINGH, 2020; PATAY; BENCSIK; PAPP, 2016; PATAY *et al.*, 2018; VALARINI; BATAGLIA; FAZUOLI, 2005; ZUHAIR MOHD ZAIN, 2018).

Os ácidos clorogênicos (3,5-7%) são abundantes no café verde. Já foram identificados mais de 30 ácidos clorogênicos, com maior quantidade do ácido 3-O-cafeoilquínico (3-CQA) e seus isômeros ácido 4-O-cafeoilquínico (4-CQA) e ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA), e os derivados 3-4-, 3-5, 4-5-O-dicafeoilquínicos. Existem outros compostos fenólicos, flavonoides como o campeferol, quercetina, rutina, catequina e epicatequina; os ácidos fenólicos como o ácido cafeico, ácido quínico, ácido ferúlico, ácido hidróxi-benzoico, ácido p-cumarínico, ácido protocatéquico, ácido siríngico, ácido gálico, entre outros (AFFONSO *et al.*, 2016; DUANGJAI *et al.*, 2016; GUPTA; SAINI; SINGH, 2020; PATAY *et al.*, 2018; ZUHAIR MOHD ZAIN, 2018). Os dados estão resumidos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Composição química do café verde.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade em % (dados da literatura)</b>
Polissacarídeos insolúveis	~50%
Carboidratos solúveis	9-12%
Ácidos voláteis	0,1%
Ácidos alifáticos não voláteis	2 - 3%
Ácidos clorogênicos totais	3 - 7,5%
Óleos e ceras	8-16%
Aminoácidos livres	~1%
Proteínas	9-12%
Lignina	1-3%
Minerais	3-4,5%
Cafeína	~1,4%
Trigonelina	~1,2%

### 2.5.2. Atividades farmacológicas

Na literatura existem diversos relatos sobre atividades biológicas dos componentes do grão do café, pois estes possuem uma composição química complexa que permite sua utilização em diferentes áreas (DURÁN *et al.*, 2017). Em um estudo com bezerros recém-nascidos, a injeção subcutânea de uma preparação produzida a partir dos grãos de café acelerou a recuperação de diarreia em 30% dos bezerros (SCHMID *et al.*, 2012). Outro estudo, utilizando os grãos verdes demonstrou que eles possuem atividade de bloqueio dos raios ultravioletas (UV), evidenciando um efeito de proteção solar. A atividade do extrato de frutos do café arábica contra o câncer também já foi evidenciada (PATAY; BENCSIK; PAPP, 2016). Um estudo realizado no sudoeste da Alemanha, área com deficiência de iodo, demonstrou que o consumo do café auxilia na redução de casos de carcinomas na tireoide em ambos os sexos. O extrato aquoso quente da casca e pouca do café cereja, na concentração de 0,5%, foi colocado na água de animais e demonstrou diminuição na progressão e no tamanho de tumores mamários (ROSS, 2005).

Já é conhecido que os compostos fenólicos também presentes no fruto do café possuem atividade antioxidante (DAI; MUMPER, 2010). Experimento *in vitro* para avaliação da atividade antioxidante do extrato oriundo dos frutos de café, demonstrou

melhor atividade frente a outros compostos avaliados, sendo eles vitamina C, extrato de romã, chá verde e vitamina E (FARRIS, 2007). Um estudo foi executado em fibroblastos humanos cultivados, e o extrato do fruto do café apresentou regulação positiva para a expressão gênica de vários colágenos e do fator de crescimento do tecido conjuntivo, como também, apresentou regulação negativa para metaloproteinases (enzimas envolvidas no processo de envelhecimento). Também foi evidenciado que o extrato dos frutos possui ação frente a hiperpigmentação em razão da supressão de espécies reativas de oxigênio (FISK *et al.*, 2014). Adicionalmente, outros pesquisadores constataram atividade antioxidante *in vitro* dos extratos dos grãos, após torrefação (CHOI; KOH, 2017) da película prateada (IRIONDO-DEHOND *et al.*, 2016) e da borra do café (CHOI; KOH, 2017).

O extrato da poupa do café apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante (AFFONSO *et al.*, 2016; BOWE; PUGLIESE, 2014), e quando incorporado em preparação para aplicação tópica reduziu significativamente as linhas finas, rugas e pigmentação do rosto (BOWE; PUGLIESE, 2014). Sugere-se que essa ação é devido ao sinergismo entre os componentes presentes na matriz (AFFONSO *et al.*, 2016). A atividade antimicrobiana contra os microrganismos *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* também foram descritas para o extrato da poupa do café, nesse mesmo estudo verificaram também a atividade antioxidante dessas amostras (DUANGJAI *et al.*, 2016).

Os resíduos do café também podem ser utilizados como alimentos com alegação de propriedade funcional ou como substrato para preparação deles. Em experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a poupa possui ação redutora do colesterol (ONTAWONG *et al.*, 2019). Essa atividade foi atribuída a inibição da absorção intestinal de colesterol e da interferência na formação do complexo micelar. A poupa e a casca do café também foram utilizadas como substrato para produção de carotenoides a partir de bactérias (MOREIRA *et al.*, 2018).

Em relação aos compostos isolados, já foi evidenciado o efeito de ativação da termogênese pela cafeína (KOGURE *et al.*, 2002). Um estudo para avaliação do efeito da associação entre os compostos ácido clorogênico e ácido ferúlico e os medicamentos metformina e 2,4-tiazolodinediona (THZ), demonstrou efeito sinérgico entre os mesmos, causando diminuição da concentração de glicose no sangue (PRABHAKAR; DOBLE, 2009). Também, os diterpenos apresentam atividade

hepatoprotetora, atividade antioxidante, e anticâncer (CAVIN *et al.*, 2002; GUPTA; SAINI; SINGH, 2020; LEE; CHOI; JEONG, 2007). A trigonelina e a cafeína possuem atividade antiproliferativa (HIRAKAWA *et al.*, 2005; MAUGERI *et al.*, 2018). Outras atividades demonstradas por compostos isolados foram, atividade de proteção solar pelo ácido linoleico, atividade anti-hipertensiva pelo ácido ferúlico (GUPTA; SAINI; SINGH, 2020) e atividade antifúngica contra diversas espécies de *Aspergillus* pelo 5-CQA (SUÁREZ-QUIROZ *et al.*, 2013).

## 2.6. A folha do café

### 2.6.1. Composição química e usos industriais

As folhas do *Coffea arabica* possuem vida útil de 8 meses e coloração que varia de verde-claro a verde-escuro, podendo apresentar pontas bronzeadas dependendo da variedade (CARVALHO, 2007). As folhas de *C. arabica* maduras de diferentes regiões da Etiópia possuem composição aproximada de 5,5–7,8% de umidade, 8,8–12,4% de cinzas, 14,4–19,0% de proteínas, 4,5–12,5% de gorduras, 17,1–20,0% fibras e 51,0-63,9% de carboidratos. O conteúdo mineral da folha de café da Etiópia (8,8–12,4% de cinzas) é maior quando comparado ao grão de café da mesma planta (3,9–4,4%), os minerais mais abundantes são cálcio, magnésio e ferro (WOLDESENEBET, 2015).

Os carboidratos identificados nas folhas do café incluem monossacarídeos, oligossacarídeos, polialcoois e amido. A composição de carboidratos aumenta quando as folhas são expostas a uma maior quantidade de luz solar, com exceção da sacarose (MARTINS *et al.*, 2014). Aminoácidos como  $\beta$ -alanina, homoserina, 4-OH-prolina, cistina e ácido c-aminobutírico (GABA) foram detectados nas folhas do café (MARTINS *et al.*, 2014). O GABA, é um dos principais neurotransmissores inibitórios do sistema nervoso simpático e demonstrou potencial uso na terapia da encefalopatia diabética, através da redução da ativação da apoptose e autofagia induzida pelo diabetes (HUANG *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2015). Demonstrou também inibição de metástase de células tumorais (JOSEPH *et al.*, 2002), e ser promotor do sono (ZHAO *et al.*, 2015), entre outros.

Estudos de proteômica, identificaram 116 proteínas em folhas de *C. arabica* com infecção de *Hemileia vastatrix*, organismo que causa ferrugem do cafeeiro. Enzimas antioxidantes incluindo superóxido dismutase, peroxidase, catalase e

glutathione redutase também estão presentes (GUERRA-GUIMARÃES *et al.*, 2015). Mais de 20 ácidos orgânicos, incluindo ácido láctico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido pirúvico foram encontrados em folhas de café. Os ácidos diidroxihexadecanoicos representam mais de 60% dos ácidos totais (CHEN, 2019).

Alcaloides como a cafeína, trigonelina, teobromina e teofilina são detectados nas folhas do café, sendo os dois primeiros mais predominantes. As folhas de *C. arabica* contêm cerca de 3,9-6,8 mg/g de trigonelina (CHEN; MA; KITTS, 2018) e a composição de cafeína pode variar entre as variedades de *C. arabica* sendo maior na *C. arabica* var. Laurina (DADO; ASRESAHEGN; GOROYA, 2019; OESTREICH-JANZEN, 2010). Estima-se que folhas frescas jovens e maduras possuam 1,8 e 3,2 mg/g de cafeína, respectivamente. (RATANAMARNO; SURBKAR, 2017)

A folha do café arábica possui diversos compostos fenólicos, como ácidos fenólicos: ácido cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, sinápico (MARTINS *et al.*, 2014; PATAY; BENCSIK; PAPP, 2016). Os ácidos cafeoilquínicos (ACQs), ésteres de ácido hidroxicinâmico, como o 3-ácido cafeoilquínico, 4- ácido cafeoilquínico, 5- ácido cafeoilquínico, 3,4- ácido dicafeoilquínico, 3,5- ácido dicafeoilquínico, 4,5- ácido dicafeoilquínico, estão acumulados em maior quantidade em folhas de café, com 5-ácido cafeoilquínico representando 80-94% dos ACQs na maioria das espécies de *Coffea* (CAMPA *et al.*, 2012; CHEN; MA; KITTS, 2018). E ácidos clorogênicos, como ácido neoclorogênico, ácido criptoclorogênico, 3-CQA, 4-CQA e 5-CQA os derivados 3-4-, 3-5, 4-5-O-dicafeoilquínicos também são encontrados (CAMPA *et al.*, 2012; CHEN; MA; KITTS, 2018; CHEN, 2019).

Alguns flavonoides incluindo catequina (0,05-0,18mg/g de folha fresca), epicatequina (0,27-0,40 mg/g de folha fresca), galato de epigalocatequina (5-16 mg/g de folha fresca), galato de epicatequina (0,27-0,48 mg/g de folha fresca) já foram dosadas em folhas de café arábica (RATANAMARNO; SURBKAR, 2017); antocianinas (delfinidina 3,5-diglicosídeo e delfinidina 3- (6"-malonil-glicosídeo), miricetina, fisetina, patuletina, luteolina, apigenina, quercetina e seus glicosídeos (quercitrina, isoquercitrina, hiperosídeo, rutina), campeferol e seus glicosídeos são encontrados em folhas de café (DE ALMEIDA *et al.*, 2019; KLINGEL *et al.*, 2020; MARTINS *et al.*, 2014; PATAY; BENCSIK; PAPP, 2016)

A mangiferina é um tipo de xantona presente em diversas concentrações nas espécies de *Coffea*, sendo bioacumulada principalmente na espécie *Coffea eugenioides* (6,43-11,39% por peso seco). As folhas do *C. arabica* possuem entre

1,11-0,89% por peso seco (CAMPA *et al.*, 2012). A mangiferina e seu isômero isomangiferina são encontradas em maior quantidade nas folhas que nas sementes. (PATAY; BENCSIK; PAPP, 2016). Os diterpenos cafestol, kahweol e 16-O-metilcaestol também foram detectados nas folhas do café (CHEN, 2019) E os trimeros de procianidina estão presentes exclusivamente nas folhas (PATAY *et al.*, 2018). Pigmentos carotenoides e xantofilas incluindo neoxantina, luteína, violaxantina, zeaxantina, clorofila b, crocetina e  $\beta$ -caroteno foram encontrados em folhas maduras de *C. arabica* (MARCHEAFAVE *et al.*, 2019).

Os sitosteróis são fitosteróis solúveis em álcool presentes nas folhas do café (NAGASAMPAGI *et al.*, 1971). Diversos compostos voláteis foram identificados no óleo essencial das folhas, podendo citar linalol, safrol,  $\beta$ -cariofileno,  $\gamma$ -curcumeno,  $\beta$ -farneseno,  $\alpha$ -pineno, mirceno,  $\alpha$ -Terpineno, limoneno, 1,8-cineol, entre outros. O óleo essencial tem composição de compostos alifáticos (83,5%), compostos aromáticos (5,9%), hidrocarbonetos monoterpênicos (2,4%), monoterpênicos oxigenados (1,3%), hidrocarbonetos sesquiterpênicos (3,2%), sesquiterpênicos oxigenados (0,5%) e outros (2,6%) (QUIJANO-CÉLIS; PIEDRAHITA; PINO, 2015).

#### 2.6.2. Usos tradicionais e atividades farmacológicas

Existem diversos relatos sobre o uso tradicional das folhas do café. O extrato de folhas é usado para tratamento de diarreia e dor intestinal por populações do continente africano. Na Nicarágua, infusões das folhas de café são utilizadas para tratar dores de cabeça, estômago e como supressor de tosse (PATAY; BENCSIK; PAPP, 2016; ROSS, 2005). Na Uganda, as folhas são usadas no manejo do HIV (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*) (LAMORDE *et al.*, 2010). Como bebida, as folhas do café arábica são utilizadas tradicionalmente por infusão na Etiópia, bebida conhecida como "*kuti*".(KLINGEL *et al.*, 2020; PATAY; BENCSIK; PAPP, 2016) Em Cuba, uma infusão das folhas é usada para tratar enxaqueca ou dores no corpo, consumida via oral ou aplicada de forma tópica. Já no Peru, a infusão é usada para tratamento de febre e pra estimular a produção de prolactina, hormônio envolvido na produção do leite (ROSS, 2005). Em algumas cidades na Suíça, os fazendeiros utilizam partes do café, folhas, frutos e seus resíduos no tratamento de distúrbios gastrointestinais, disfunções metabólicas, infertilidade e doenças na genitália feminina dos animais (SCHMID *et al.*, 2012).

Em relação às atividades biológicas documentadas em literatura científica temos que o extrato demonstra atividade antibacteriana, frente a *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophilla*, e *Streptococcus agalactiae*, bactérias comuns em infecção em peixes cultivados (KENCONOJATI *et al.*, 2019). O extrato também demonstra atividade antioxidante *in vitro* (MARCHEAFAVE *et al.*, 2019; SEGHETO *et al.*, 2018), com potencial redutor, quelante de íons ferrosos e na eliminação de radicais hidroxila (WU *et al.*, 2017) e atividade anti-inflamatória *in vivo* (SEGHETO *et al.*, 2018). É eficaz na inibição de geração de radicais livres induzidos por radiação UV-B em fibroblastos, na restauração do colágeno, na redução de mediadores pró-inflamatórios e na inibição da expressão de metaloproteinase-1. Esses resultados indicam o potencial uso na redução do fotodano, inflamação e estresse oxidativo, induzidos por UV-B (WU *et al.*, 2017). Não foi encontrado na literatura científica estudo sobre a atividade de cicatrização e atividade anticâncer das folhas de café.

Apesar de poucos estudos em relação as atividades biológicas das folhas, muitas patentes encontram-se depositadas. Considerando as bases *google patent*, *web of science* e *PubMed* por volta de 50 patentes possuem folhas de café aplicadas em diversos segmentos, como antifúngico de plantas, agentes terapêuticos, agente de crescimento de lactobacilos, insumo para chás, materiais para embalagem, substituto do tabaco, desodorizador, entre outros. Os países com maior número de patentes depositadas são Japão (46%) e China (26%) (CHEN, 2019).

Uma composição contendo extrato de folha de café enriquecido com mangiferina foi utilizada para facilitar a manutenção da vigília, da atenção, concentração e memória (DEL RIO *et al.*, 2020). Devido a presença de sitosterol livre foi utilizado em uma composição com diglicerídeo para tratamento e prevenção da hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e diabetes (MAUREL *et al.*, 1996). Uma composição que incluía óleo de hortelã pimenta, óleo de hortelã, extrato de folhas de café, açafraão, entre outros, foi utilizada com o objetivo de inibir a inflamação gastrointestinal, incluindo gastrite e úlcera gástrica e duodenal e como antibacteriano contra a *Helicobacter pylori* (MURATA; YASUDA, 1997).

Em relação aos compostos isolados, a mangiferina e isomangiferina possuem diversas propriedades descritas, como uso no tratamento de doenças degenerativas, tais como aterosclerose, câncer (mama, cólon, neural, pele e cervical), diabetes e obesidade. Também protegem o corpo contra danos associados ao estresse oxidativo (DE ALMEIDA *et al.*, 2019; IMRAN *et al.*, 2017; MALHERBE *et al.*,

2014; WANG *et al.*, 2018). E metilxantinas, como a trigonelina, envolvidas em atividade de neuroproteção, anticâncer, e antibacteriana (FREDHOLM, 2011).

Entretanto, as folhas são utilizadas principalmente na fabricação de chás, extração de compostos funcionais ou deixadas *in situ*, como cobertura morta da plantação e, menos frequente, como insumo pra compostagem (ECHEVERRIA; NUTI, 2017). Dessa forma, esse trabalho pretende contribuir para o melhor entendimento sobre as atividades farmacológicas das folhas de café, realizando doseamento de compostos fenólicos totais, de cafeína e realizando testes para verificação da atividade antioxidante, avaliação sobre a migração celular *in vitro* e atividade antiproliferativa *in vitro* em linhagens tumorais.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi avaliar a aplicabilidade farmacêutica do resíduo foliar da cadeia produtiva do grão de café arábica visando o aproveitamento.

#### 3.2. Objetivos específicos

- ✚ Avaliar a variabilidade do perfil químico de extratos de folhas de *Coffea arabica* L. coletadas de quatro regiões distintas;
- ✚ Avaliar a atividade antioxidante dos extratos das folhas de *Coffea arabica* L.;
- ✚ Avaliar o potencial sobre a proliferação em linhagens celulares dos extratos das folhas de *Coffea arabica* L.;
- ✚ Avaliar a atividade de migração celular dos extratos das folhas de *Coffea arabica* L.;

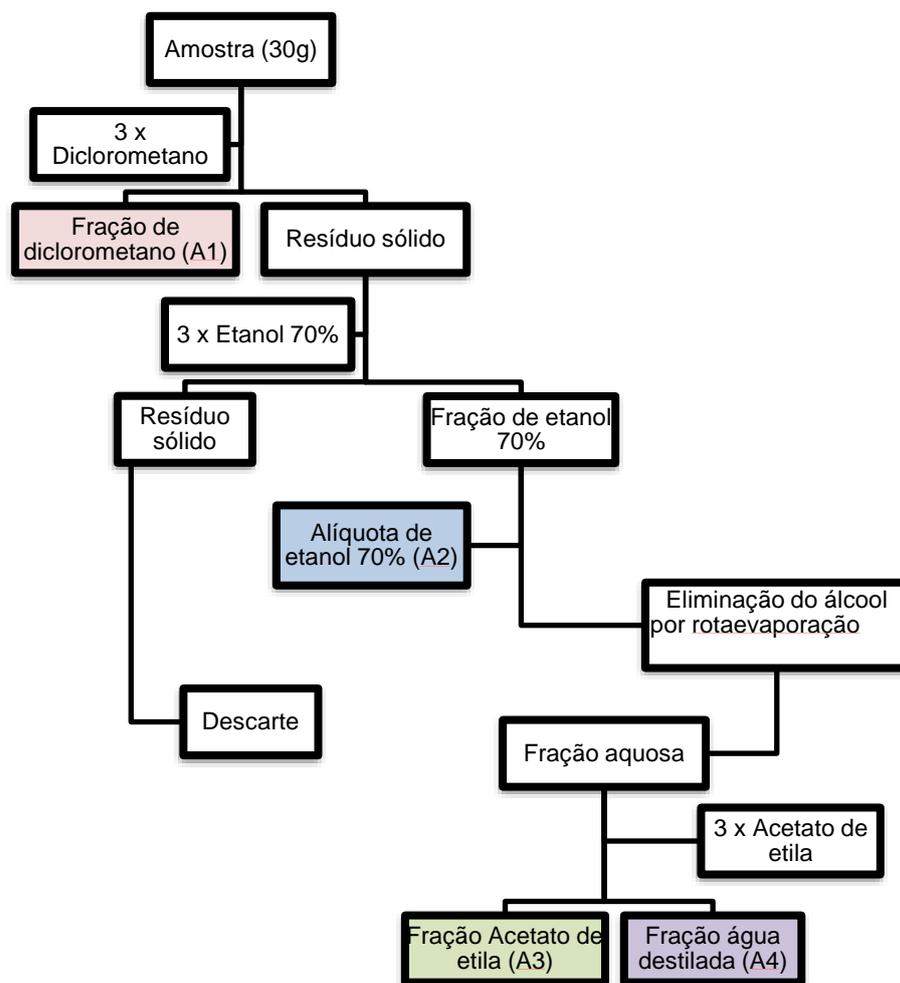
### 4. Material e Métodos

#### 4.1. Coleta de insumos vegetais e produção de extratos

Em março de 2019, foi realizado um contato por telefone ou e-mail com cada um dos responsáveis pelas plantações de café, que prontamente se disponibilizaram a ajudar na concretização da pesquisa, através da coleta aleatória das folhas, secagem, envio das amostras, bem como custeio das despesas de envio.

O registro das atividades de acesso ao patrimônio genético foi realizado através do cadastro eletrônico no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético – SISGen (número A7FCAC1). As folhas de *Coffea arabica* L. foram coletadas em quatro locais diferentes; Fazenda Santa Maria, Ouro Fino (MG), Sítio Morro Alto, São José do Calçado (Espírito Santo), Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal (São Paulo) e Fazenda Terra Nova, Londrina (Paraná). Durante a fase de enchimento do endosperma, foi realizada uma coleta em cada um dos quatro locais escolhidos. E durante a colheita do fruto maduro, uma coleta na Fazenda Terra Nova, Londrina (Paraná) foi realizada. Logo após cada coleta, as folhas foram secadas em local arejado na sombra, no local da colheita, por até sete dias, as amostras foram então enviadas por correios e posteriormente, quando chegaram em Campinas (São Paulo), foram colocadas em estufa à 40°C sob ventilação (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Os extratos foram produzidos através de dois métodos distintos. O primeiro método foi o método de extração sucessiva até o esgotamento da planta. Inicialmente 30 gramas de folhas secas e moídas da amostra foram pesadas e submetidas a extração com diclorometano na proporção de 1:50 de folhas para solvente, durante 90 minutos sob agitação e temperatura ambiente. A troca do solvente foi realizada por duas vezes, ou seja, a etapa de extração foi realizada por três vezes. Posteriormente, o líquido extraído (A1) foi reservado e o material vegetal resultante foi submetido à extração com o solvente etanol (70%) sob as mesmas condições e repetições realizadas para o primeiro solvente (diclorometano). Após as duas trocas do solvente etanol 70%, uma alíquota do extrato obtido (A2) foi reservada e o material vegetal restante foi descartado. O restante do líquido (etanol 70% e constituintes extraídos) foi eliminado sob vácuo em evaporador rotatório sob temperatura de aproximadamente 40°C, resultando em água e constituintes fitoquímicos das folhas. A água residual foi extraída com acetato de etila, em funil de separação através de partição líquido-líquido. A fase de acetato de etila foi reservada, sendo realizada a troca do solvente por 2 vezes, conforme as demais etapas. Ao final das trocas de solventes, a fração orgânica (A3) e a fração aquosa (A4) foram separadas. Para eliminação do solvente orgânico, os extratos A1, A2, A3 foram submetidos ao evaporador rotatório, sob vácuo, a temperatura de aproximadamente 40°C (SEGHE TO *et al.*, 2018) e as frações A2 e A4 foram submetidas ao liofilizador para sublimação da água. O esquema da extração se encontra no Fluxograma 1.

**Fluxograma 1:** Extração sucessiva até o esgotamento da planta

No segundo método de extração (turbólise) utilizou-se o equipamento Ultra Turrax® modelo IKA T10 Basic na velocidade 5, os solventes etanol: água foram adicionados na proporção de 70:30 e a proporção entre folhas secas e solvente utilizada foi de 1:50, sendo 2 gramas de folhas submetidas ao processo de extração. Cada extração teve duração de 5 minutos sob temperatura ambiente, sendo efetuadas duas trocas de solventes. Os extratos produzidos foram submetidos ao evaporador rotatório a aproximadamente 40°C para eliminação do etanol, (SEGHE TO, 2017 adaptado) e em seguida foram submetidos ao liofilizador para sublimação da água.

#### 4.2. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma ferramenta simples e de baixo custo que permite a identificação e visualização de compostos ou classes de compostos presentes nas amostras em estudo. Nessa análise, a CCD foi empregada com objetivo de comparação dos perfis químicos entre os extratos produzidos. Foram

pesados aproximadamente 5mg de extrato seco e solubilizados em etanol 70% de modo a obter uma concentração de 1mg/mL. Foram submetidos ao banho de ultrassom Ultra Cleaner® 1400A durante 10 minutos para solubilização completa das amostras (LEDERER, 1985).

Na corrida cromatográfica, como fase móvel, foi utilizada uma solução de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água ultrapura na proporção de 100:11:11:27, e como fase estacionária a placa de sílica gel 60F marca Merck® (artigo 7743). As amostras foram dispostas em linha com ajuda de um capilar, distanciadas por 1cm entre as aplicações, e a corrida cromatográfica foi realizada em uma cuba de vidro saturada com papel filtro. Após a eluição da fase móvel sobre a fase estacionária, a placa foi retirada da cuba cromatográfica e deixada ao ar ambiente para secagem, foi realizado um tratamento da placa com Reagente de Produtos Naturais (PN/PEG) para visualização das bandas sob luz UV-Visível nos comprimentos de onda de 254nm e 365nm e sob luz ambiente (LEDERER, 1985).

A partir das placas cromatográficas resultantes foram determinadas as distâncias percorridas pelas amostras em relação a distância total percorrida pelo solvente, que define o Rf do inglês "*ratio to front*" através da fórmula abaixo:

$$R_f = \frac{\text{Distância da amostra (Da)}}{\text{Distância do Solvente (Ds)}}$$

Modo de preparo:

**Reagente de produtos naturais (NP-PEG):** Foi realizada a pulverização da placa com 1% de ácido difenilbórico metanólico-β-etilaminoéster (difenilboriloxietilamina), seguido por pulverização de polietilenoglicol 4000 (PEG) diluído em etanol a uma concentração de 5%.

A fluorescência intensa é produzida imediatamente ou após 15 min sob luz UV 365 nm. O reagente aumenta a sensibilidade (de 10 µg para 2,5 µg), sendo o comportamento da fluorescência dependente da estrutura de cada composto químico (LEDERER, 1985).

### 4.3. Avaliação do conteúdo de fenólicos totais

O método de Folin-Ciocalteu vem sendo utilizado há muito tempo na área de produtos naturais para quantificação de polifenóis. Para obtenção de resultados confiáveis é necessário o estabelecimento de algumas condições, como tempo de reação ideal, temperatura controlada para a mudança da cor, e uso de um padrão de referência (ANJALI; SETH, 2015).

O mecanismo de ação do teste Folin-Ciocalteu consiste na reação de oxido-redução com o grupo fenol, sendo este oxidado e o íon metálico reduzido. Todo o experimento foi realizado com as luzes do laboratório apagadas, na penumbra, protegido da luz direta (COSTA *et al.*, 2014).

Em microplaca, foram adicionados 20µL dos extratos de folhas de café nas concentrações de 31,25, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL diluídos em etanol 70%; 100 µL da solução de Folin-Ciocalteu a 10% e 80 µL de carbonato de sódio a 7,5%. Para realização do branco e do padrão, os extratos foram substituídos por etanol 70% (amostra branco) e ácido cafeico (padrão Sigma Aldrich® ≥ 98% de pureza), os demais reagentes Folin-Ciocalteu e Carbonato de sódio permaneceram nas condições descritas acima. Uma curva de calibração do padrão de ácido cafeico foi construída nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L diluído em etanol 70% (modificado de COSTA *et al.*, 2014).

A microplaca foi incubada no leitor de microplaca a 45°C durante 15 minutos e depois, arrefecida ao abrigo de luz durante 30 minutos. Após o arrefecimento, a leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 765 nm, em um espectrofotômetro leitor de placa VersaMax™ (modificado de COSTA *et al.*, 2014).

Através dos valores de absorbância obtidos para o padrão de ácido cafeico, uma curva de calibração, equação da reta e o valor de correlação de Pearson foram gerados através do emprego do software Excel® versão 2102. Os valores das amostras foram substituídos na equação da reta, onde calculou-se a quantidade de fenólicos totais equivalente nos extratos de folhas de café.

A linearidade do método foi avaliada utilizando o teste ANOVA, pelo método dos Mínimos Quadrados Ordinários. A independência, linearidade e homoscedasticidade dos dados analíticos foram avaliadas. Os testes de linearidade foram realizados empregando o software Action Stat® versão 3.6. Os gráficos foram

construídos através do software GraphPad Prism® versão 9.0.0 e a avaliação da diferença estatística entre as amostras com intervalo de confiança de 95%, através do emprego do teste de *Tukey*. Todo o teste foi realizado em triplicata, sendo realizadas duas repetições do teste em dias distintos.

Modo de preparo:

**Solução Folin-Ciocalteu 10%:** Foram pipetados 2,5 ml do reagente Folin-Ciocalteu e adicionados 25 mL de água destilada em um tubo Falcon. A solução foi preparada no dia do teste e perto do momento de uso. O reagente foi preparado ao abrigo de luz direta, na penumbra.

**Solução carbonato de sódio 7,5%:** Foram pesados 1,50 g de carbonato de sódio em um tubo Falcon e dissolvidos em 20 mL de água destilada. A solução foi preparada no dia do teste.

#### 4.4. Doseamento de cafeína

Para realização do doseamento, foi utilizado equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da Shimadzu modelo prominence – I LC2030 com detector UV-Visível. Foi utilizada uma coluna cromatográfica C18 110A, Gemini (250 x 4,6mm). A fase móvel utilizada foi metanol e água ultrapura na proporção de 40:60 com eluição de forma isocrática. Um volume de injeção de 10 µl foi utilizado para todas as amostras, com velocidade de fluxo de 0,7ml/min, mantendo a temperatura do forno a 25°C. A corrida teve duração de 10 minutos e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 273 nanômetros (DE ANDRADE *et al.*, 1995). Os parâmetros estão representados na tabela 3.

**Tabela 2:** Condições cromatográficas para análise de cafeína em extratos de folhas de café, conforme De Andrade (1995).

Parâmetros	Condições utilizadas
Equipamento	Equipamento Shimadzu modelo prominence – I LC2030.
Tipo de detector	UV-visível
Fase estacionária	Coluna C18 110A, Gemini (250 x 4,6mm),
Fase móvel	Metanol/água ultrapura (40/60)
Tipo de eluição	Isocrática
Volume de injeção	10µl
Velocidade do fluxo	0,7ml/min

Temperatura do forno	25°C
Comprimento de onda	273 nanômetros
Tempo de corrida	10 minutos

Uma curva de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação de Pearson foram determinados através do emprego do software Excel® versão 2102. Após a obtenção das áreas do padrão de cafeína, os valores das amostras foram substituídos na equação da reta. Os gráficos foram construídos através do software GraphPad Prism® versão 9.0.0.

Foram realizadas duas repetições em dias distintos, sendo em cada teste uma replicata para cada uma das amostras.

Modo de preparo:

**Amostras de folhas de café:** sem tratamento prévio, os extratos foram diluídos em metanol e água ultrapura na proporção de 1:1, na concentração de 2mg/mL, as amostras foram colocadas no ultrassom por 10 minutos e filtradas por membrana de 0,45µm.

**Padrão cafeína:** A cafeína (Sigma Aldrich® lote: BCBW9292, pureza 100%) foi diluída em água ultrapura e metanol na proporção de 99:1, a solução mãe foi levada ao ultrassom por 10 minutos e diluída nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL, foi realizada a filtração por membrana de 0,45µm.

#### 4.5. Atividade de inibição do radical DPPH

O ensaio do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) tem como princípio a transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante ou espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente diminuição da absorbância (modificado de ALVES *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2014). A reação pode ser monitorada pelo decréscimo da absorbância, e nesse caso não segue uma resposta linear, podendo ser mais lenta ou mais rápida dependendo do composto estudado (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Ao abrigo de luz direta, uma solução de DPPH a  $6 \times 10^5$  em etanol absoluto foi preparada. Posteriormente, a absorbância foi medida a 525 nm, e uma quantidade adicional de reagente foi colocada de modo a ajustar a absorbância na faixa de 0,650-

0,660. A solução foi armazenada em geladeira enquanto os demais reagentes estavam sendo preparados (modificado de ALVES *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2014).

As amostras foram preparadas nas concentrações de 31,25, 62,5, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL diluídas em etanol 70%. Uma solução padrão de Trolox® 400 mg/L em etanol 70% foi preparada e posteriormente diluída nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 80, 160 e 200 mg/L para realização da curva de calibração. As soluções-mãe (padrão Trolox® e amostras) foram submetidas ao ultrassom por 10 minutos para completa solubilização (modificado de ALVES *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2014).

Em microplaca foram pipetados 20µL das diluições das amostras de folhas de café e 180 µL de DPPH. Nas amostras branco e padrão, a amostra de café foi substituída por etanol 70% (amostra branco) e diluições do Trolox® (padrão). As absorbâncias foram lidas a 525 nm, a cada 5 minutos durante 45 minutos em espectrofotômetro leitor de microplaca *Molecular Devices®* modelo VersaMax™ (modificado de ALVES *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2014). As absorbâncias obtidas no tempo de 45 minutos foram utilizadas no cálculo. A porcentagem de inibição e Concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) foram calculadas através do *software Excel®* versão 2102.

$$\text{(Equação 1) \% de Inibição} = \frac{\text{Abs. Branco} - \text{Abs. Amostra}}{\text{Abs. Branco}} \times 100$$

Onde, Abs. Branco = Absorbância do DPPH na ausência de amostra;

Abs. Amostra = Absorbância do DPPH na presença de amostra.

$$\text{(Equação 2) IC}_{50} = \frac{C_M - C_m}{\% \text{ IM} - \% \text{ Im}} \times (50 - \% \text{ Im}) + C_m$$

Onde, C<sub>M</sub> = maior concentração C<sub>m</sub> = menor concentração % Im = porcentagem de inibição de C<sub>m</sub>; % IM = porcentagem de inibição de C<sub>M</sub>.

Os gráficos foram construídos através do *software GraphPad Prism®* versão 9.0.0 e a avaliação da diferença estatística entre as amostras com intervalo de confiança de 95%, através do emprego do teste de *Tukey*. Foram realizados dois ensaios em dias distintos sendo em cada um deles três replicatas de cada uma das amostras.

Modo de preparo:

**Solução DPPH 6 x 10<sup>5</sup>:** Foram pesados 2,37 mg de DPPH e dissolvidos lentamente em etanol absoluto. Ao abrigo de luz, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico âmbar de 100 mL e o volume foi completado com etanol absoluto. Esta solução foi preparada no dia da execução do teste, perto do momento do uso. Submeteu-se ao ultrassom por 10 minutos, sendo armazenada em geladeira.

**Solução Trolox 400 mg/L:** 4 mg de Trolox® foram dissolvidos em 10 ml de etanol 70% em um tubo Falcon de 15mL. Esta solução foi preparada no dia da execução do teste, perto do momento do uso. Submeteu-se ao ultrassom por 10 minutos sendo armazenada em geladeira.

#### 4.6. Avaliação sobre a proliferação celular *in vitro*

O modelo de ensaio de avaliação do potencial antiproliferativo visa avaliar o efeito da amostra sobre a proliferação de células tumorais evidenciando o potencial uso no tratamento do câncer. Além disso, permite a determinação da maior concentração não citostática sobre a linhagem não tumoral HaCat que foi utilizada para delineamento de concentrações no teste de migração celular. As linhagens celulares utilizadas (Tabela 4) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell park memorial institute*) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF) (MONKS *et al.*, 1991).

**Tabela 3:** Linhagens celulares utilizadas na avaliação sobre a proliferação *in vitro*.

Organismo	Linhagem	Órgão/Doença	Densidade de inoculação (x 10 <sup>4</sup> cel/mL)
Humano	U251	SNC; glioblastoma	4,0
Humano	786-0	Rim; adenocarcinoma	5,0
Humano	NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	4,0

<b>Humano</b>	<b>HT29</b>	Cólon; adenocarcinoma	5,0
<b>Humano</b>	<b>HaCaT</b>	Pele (queratinócito); Não tumoral	4,0
<b>Murino</b>	<b>B16F10</b>	Pele; Melanoma	5,0

As linhagens celulares foram dispostas em placas de 96 compartimentos e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Nesse ensaio, utilizamos uma placa nomeada de P0, que corresponde a um controle de células, sem tratamento de amostras, para determinação da quantidade de células no momento de início do experimento (Figura 2), e uma placa, nomeada de P1, mantida durante toda a execução do teste, onde foram inseridos os controles de células sem tratamento com amostras, as células tratadas com amostras, e os brancos das amostras (Figura 3) (MONKS *et al.*, 1991).

Após 24 horas do plaqueamento, as células da placa P1 foram expostas à quatro concentrações 0,15; 1,5; 15 e 150 µg/mL das amostras em teste, em meio de cultura completo (meio RPMI, suplementado com Soro Bovino Fetal 5%), e incubadas por 48h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. No momento da adição das amostras, as células da placa P0 foram fixadas com 50 µL/compartimento de TCA (ácido tricloroacético) a 50% e incubadas por 1 hora em geladeira, para determinação da quantidade de células presente no início do experimento. Em seguida, a placa P0 foi lavada em água corrente quatro vezes consecutivas para remoção de resíduos de TCA, meio, soro fetal bovino e metabólitos secundários (MONKS *et al.*, 1991).

Após 48 horas de incubação, as etapas de fixação e lavagem foram realizadas novamente, agora para as células da placa P1. Após serem secadas à temperatura ambiente, as células fixadas nas placas P0 e P1 foram coradas com 50 µL/compartimento de sulforrodamina B 0,4% (p/v) dissolvida em ácido acético 1%; e mantidas por 20 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as placas (P1 e P0) foram lavadas com solução de ácido acético a 1% e secadas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL/compartimento de Trizma Base (10 µM, pH 10,5) (MONKS *et al.*, 1991).

O ensaio sobre a proliferação celular é utilizado para triagem de amostras, e para cada amostra testada obtêm-se um perfil concentração-resposta distinto. Os

parâmetros de viabilidade celular e de efeito sobre a proliferação celular são realizados pela fixação *in situ* das células, utilizando o agente fixador TCA, que atua precipitando proteínas, permitindo que células viáveis se mantenham fixas na placa, enquanto os resíduos se desprendem com a lavagem em água corrente. E, posteriormente, pela coloração com a SRB, um corante de ligação às proteínas. A SRB se liga aos aminoácidos básicos das macromoléculas celulares; então a mancha é solubilizada com Trizma Base e medida espectrofotometricamente para determinar o crescimento ou viabilidade celular relativo nas células tratadas e não tratadas (MONKS *et al.*, 1991).

A análise dos resultados foi realizada por leitura espectrofotométrica da absorbância a 540 nm em leitor de microplacas (*Molecular Devices*®, modelo VersaMax™). As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e, a proliferação celular (%) foi calculada da seguinte forma:

✚ Se  $A_m > C_1$ , a amostra foi proliferativa e a fórmula utilizada foi  $100 \times [(A_m - C_0)/(C_1 - C_0)]$ .

✚ Se  $C_0 \leq A_m < C_1$ , a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi  $100 \times [(A_m - C_0)/(C_1 - C_0)]$ .

✚ Se  $A_m < C_0$ , a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi  $100 \times [(A_m - C_0)/(C_0)]$ .

Onde:

$A_m$  = absorbância das células tratadas com a amostra;

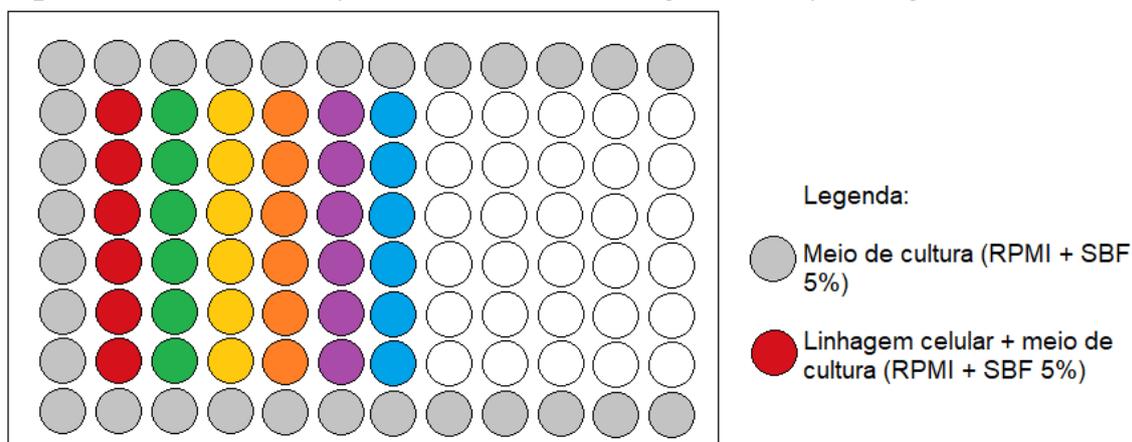
$C_1$  = absorbância das células não tratadas, na placa P1 (ao final da incubação);

$C_0$  = absorbância das células não tratadas, na placa P0 (fixadas no dia do tratamento).

A partir dos dados gerados, foram construídos gráficos correlacionando os resultados de proliferação celular (%) das linhagens com a respectiva concentração, empregando-se o software Origin® Pro 8.0. Foi calculada ainda, através de regressão sigmoide, a concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular denominada  $GI_{50}$  (do inglês *growth inhibition 50*).

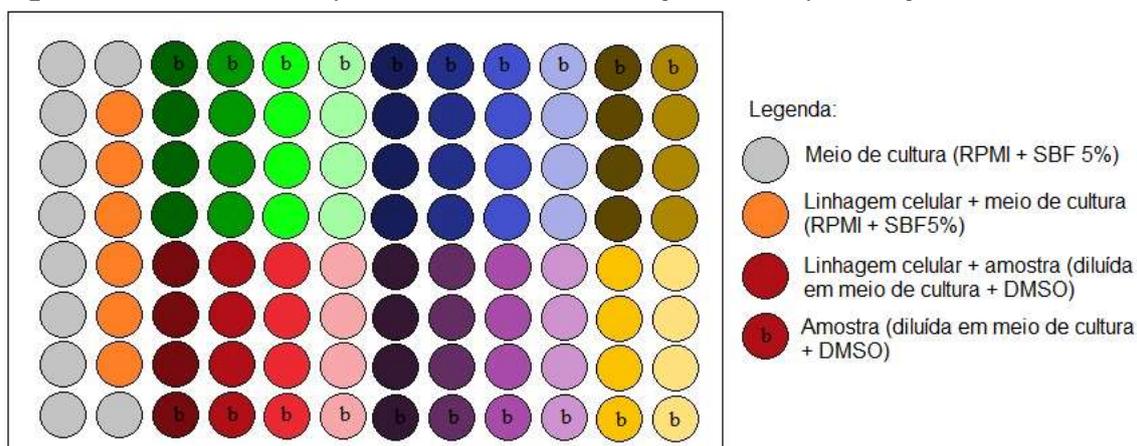
O experimento foi realizado duas vezes em duas datas distintas, sendo todas as amostras testadas em triplicata.

**Figura 2:** Delineamento da placa P0 utilizada na avaliação sobre a proliferação *in vitro*.



As cores diferentes (vermelho, verde, amarelo, laranja, lilás e azul) representam as seis linhagens celulares distintas utilizadas nesse presente trabalho.

**Figura 3:** Delineamento da placa P1 utilizada na avaliação sobre a proliferação celular *in vitro*.



As cores diferentes (verde, vermelho, azul, roxo e amarelo) representam amostras diferentes e as tonalidades significam diluições das amostras;

#### 4.7. Avaliação sobre a migração celular *in vitro*

Em dias distintos, fibroblastos HGF-1 e queratinócitos HaCat foram plaqueados a uma densidade de  $2,5 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$ , respectivamente (densidade suficiente para confluência  $\geq 85\%$ , placas de 24 compartimentos) em meio RPMI, suplementado com Soro Bovino Fetal 5% e penicilina/estreptomicina 1%.

Após 24 horas, as células estavam aderidas e havia se formado uma monocamada celular, o meio foi retirado com auxílio da pipeta de Pasteur de vidro, foi realizada uma lavagem com PBS (pH 7) com subsequente adição de meio suplementado com SBF 0,2%, para diminuição do crescimento celular. Após 24 horas, a monocamada celular foi ferida com auxílio de uma ponteira de 200  $\mu\text{L}$  estéril, a troca

da ponteira foi realizada a cada dois poços de células. Retirou-se o meio de cultivo e lavou-se com PBS (pH 7). As células foram tratadas com as amostras na concentração de 15 µg/mL (diluídas previamente em DMSO e posteriormente em meio RPMI suplementado com 0,2% de SBF) maior concentração não citostática determinada através do ensaio sobre a proliferação celular.

Microfotografias foram adquiridas através do monitoramento durante 24 horas pelo Microscópio Invertido de Fluorescência *Time Lapse* com controle de temperatura e CO<sub>2</sub> para avaliação da migração celular. Como controle negativo foi utilizado meio suplementado com SBF 0,2% e como controle positivo meio suplementado com SBF 5%.

As imagens foram analisadas através do *software* ImageJ®, e as percentagens de área migrada relativa nos tempos 12 e 24 horas, após o tratamento com amostras, foram calculadas com auxílio do Excel®.

$$\% Am = (Ai - Af) / Ai \times 100$$

Onde, %Am = Porcentagem de Área migrada; Ai = Área no início do experimento; Af = Área final depois de 24h de experimento

$$Amr = 100 * \frac{\%Am - \%Acn}{\%Acp - \%Acn}$$

Onde, %Am = Porcentagem de Área migrada; %Acn = Porcentagem de Área migrada do controle negativo; %Acp = Porcentagem de Área migrada do controle positivo.

Os gráficos foram construídos através do *software* GraphPad Prism® versão 9.0.0. Foi realizado um ensaio com a linhagem HGF-01 com 6 replicatas de cada amostra, e três ensaios em dias distintos com a linhagem celular HaCat com 6 replicatas para cada uma das amostras em cada um dos ensaios.

## 5. Resultados

### 5.1. Coleta de insumos vegetais e produção de extratos

As coletas foram realizadas entre os dias 18 de março e 06 de abril de 2019 nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Espírito Santo, suas respectivas

coordenadas geográficas e faixas de altitude constam na Tabela 4. As atividades de acesso ao patrimônio genético foram cadastradas no SISGen e podem ser consultadas pelo código A7FCAC1.

**Tabela 4:** Dados das coletas das amostras de folhas de *Coffea arabica* L.

Número da Amostra	Data da coleta (Ano 2019)	Local da coleta	Coordenadas Geográficas	Altitude (metros)
1	24/03	Faculdade de Agronomia Unesp, Jaboticabal (SP)	21°14'29.45"S 48°17'24.03"W	575
2	20/03	Fazenda Santa Isabel, Ouro Fino (MG)	22°16'37.9"S 46°22'49.8"W	900-1250
3	23/03	Fazenda Terra Nova, Londrina (PR)	23°43'55.8"S 50°41'57.8"W	820-835
4	18/03	Sítio Morro Alto, São José do Calçado (ES)	20°57'23.0"S 41°40'60.0"W	810-960
5	06/04	Fazenda Terra Nova, Londrina (PR)	23°43'55.8"S 50°41'57.8"W	820-835

Todas as quatro culturas escolhidas não utilizam contaminantes químicos intencionais para o controle de pragas ou manutenção da lavoura, e três das localidades possuem certificado para cultura orgânica (Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo). Um dos locais de coleta se tratava da Faculdade de Agronomia – UNESP, a plantação é submetida a estudos de controle de pragas por meio do uso de produtos biológicos.

As amostras apresentavam cor verde, variando do tom claro a escuro dependendo da sua maturação (Figura 4a). As amostras coletadas pertencem a espécie *Coffea arabica* L., e a variedade de cada planta não foi considerada nesse estudo. As culturas estavam submetidas à faixas de altitudes distintas (Tabela 4), com valores entre 575 metros e 1250 metros. A exsicata da amostra obtida em São Paulo, foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás (UFG) registro número 71104, as demais amostras se tratavam de cultura orgânica com registro da espécie pelo agricultor de cada local.

Para realização do método 1, extração sucessiva, foi empregada somente a amostra coletada em Jaboticabal (SP), por ser a primeira amostra a chegar em Campinas (SP). Todas as cinco amostras coletadas foram submetidas ao método 2 (Figura 4b), extração por turbólise, utilizando etanol: água (70:30).

Foram obtidos ao todo nove extratos, e estes serão referenciados a partir desse momento segundo a sigla implementada para cada um deles (Tabela 5).

**Tabela 5:** Definições das siglas para referenciação das amostras obtidas segundo os métodos de extração.

<b>Sigla</b>	<b>Descrição do extrato</b>	<b>Local de coleta da amostra</b>	<b>Método de obtenção</b>
AC	Fração de acetato de Etila	Unesp, Jaboticabal (SP)	1
AG	Fração de água destilada	Unesp, Jaboticabal (SP)	1
DCM	Extrato de diclorometano	Unesp, Jaboticabal (SP)	1
ET	Fração de etanol 70%	Unesp, Jaboticabal (SP)	1
SP	Extrato São Paulo	Unesp, Jaboticabal (SP)	2
MG	Extrato Minas Gerais	Fazenda Santa Isabel, Ouro Fino (MG)	2
PR1	Extrato Paraná coleta dia 23/03	Fazenda Terra Nova, Londrina (PR)	2
PR2	Extrato Paraná coleta dia 06/04	Fazenda Terra Nova, Londrina (PR)	2
ES	Extrato Espírito Santo	Sítio Morro Alto, São José do Calçado (ES)	2

**Figura 4:** Coleta e extração de folhas de *coffea arabica* L.



continuação Fig. 4



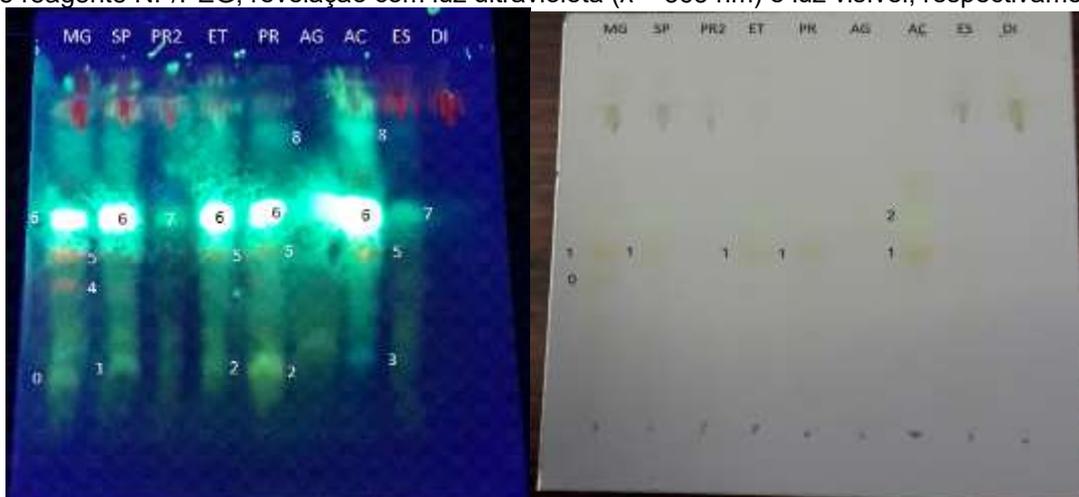
a) folhas coletadas de *Coffea arabica* L. b) extração por turbólise c) amostras obtidas pelo método 2 de extração, da esquerda para direita: extrato Paraná coleta dia 23/03, extrato Minas Gerais, extrato Espírito Santo, extrato São Paulo e extrato Paraná coleta dia 06/04.

Os rendimentos dos métodos de extração não puderam ser calculados devido a impossibilidade de ida ao laboratório para repetição dos processos de extração e realização das pesagens necessárias devido a pandemia da COVID-19.

## 5.2. Cromatografia em camada delgada

Após a eluição da fase móvel sobre a cromatoplaça as bandas foram visualizadas no comprimento de onda de 365 nm (Foto 5a), e em luz visível (Figura 5b). Nenhuma banda foi visualizada no comprimento de onda de 254 nm. As distâncias percorridas e os fatores de retenção para cada uma das bandas foram calculados sob comprimento de onda de 365 nm (Tabela 6) e sob luz visível (Tabela 7). A distância percorrida pelo solvente foi de 10 cm.

**Figura 5:** Placas de cromatografia de camada delgada (CCD) após aplicação dos extratos, tratamento com o reagente NP/PEG, revelação com luz ultravioleta ( $\lambda = 365$  nm) e luz visível, respectivamente.



Da esquerda para direita: extrato Minas Gerais (MG), extrato São Paulo (SP), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2), fração de etanol 70% (ET), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR), fração de água destilada (AG), fração de acetato de etila (AC), extrato Espírito Santo (ES), extrato de diclorometano (DI). Os números diferentes representam bandas com cores e/ou tempo de retenção diferentes.

**Tabela 6:** Fator de retenção das bandas e correlações com os extratos, tratamento com o reagente PN/PEG e revelação com luz ultravioleta ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ).

Número	Distância da amostra	Rf calculado	Amostras
0	1,9	0,19	MG
1	2,1	0,21	SP
2	2,1	0,21	PR1; ET
3	2,2	0,22	AC
4	4,0	0,40	MG
5	5,1	0,51	MG; ET; PR1; AC
6	5,8	0,58	MG; SP; ET; PR1; AC
7	5,8	0,58	ES; PR2

Extrato Minas Gerais (MG), extrato São Paulo (SP), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), fração de etanol 70% (ET), fração de acetato de etila (AC), extrato Espírito Santo (ES) e extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2).

**Tabela 7:** Fator de retenção das bandas cromatográficas correlacionadas ao extrato, obtidas pelo tratamento com o reagente PN/PEG e revelação com luz branca visível.

Número	Distância da amostra	Rf calculado	Amostras
0	0,42	0,42	MG
1	0,51	0,51	MG; SP; ET; PR1; AC
2	0,62	0,62	AC

Extrato Minas Gerais (MG), extrato São Paulo (SP), fração de etanol 70% (ET), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1) e fração de acetato de etila (AC).

Em relação ao método 1, a fração diclorometano não apresentou bandas cromatográficas segundo a metodologia utilizada. As frações produzidas por meio dos solventes etanol 70%, água e acetato de etila apresentaram bandas cromatográficas, sendo que a fração de acetato de etila apresentou o maior número de bandas e de maior intensidade.

Em relação ao método 2 de extração, foi verificado que um maior número de bandas foi apresentado pelas amostras MG, PR1 e SP. As amostras ES e PR2 apresentaram menor número de bandas ou de menor intensidade de cor.

Segundo a revelação com ultravioleta a um comprimento de onda de 365nm (Tabela 6) e sob luz visível (Tabela 7) as amostras apresentaram bandas distintas e com diferentes intensidades.

### 5.3. Avaliação do conteúdo de fenólicos totais

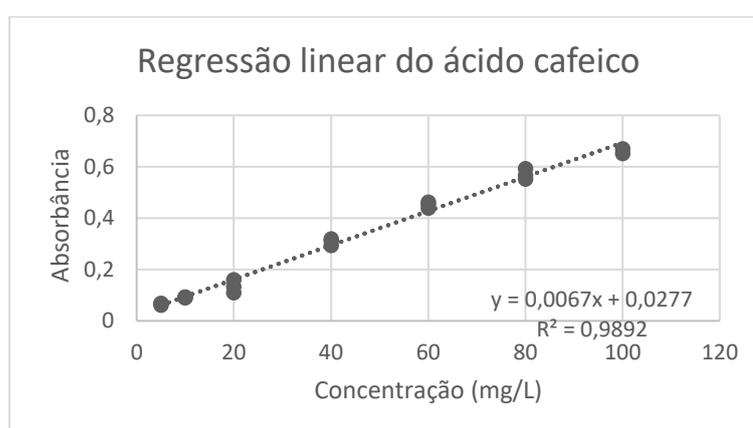
A partir dos dados gerados, foi construída uma curva empregando o método de regressão linear (Figura 6), como também foram avaliados os demais

parâmetros de linearidade (Tabela 9). Na análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a equação da reta foi determinada, sendo  $y = 0,0067x + 0,0277$  com coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9892$  (Figura 6). A partir da equação da reta foi realizada a substituição dos valores de absorbâncias das amostras, e calculou-se a quantidade de compostos fenólicos totais (Tabela 8).

Considerando as diferentes solventes de extração (Figura 7), método 1 de extração, o maior teor observado nesse doseamento foi o da fração de acetato de etila com  $289,75 \pm 7,12 \mu\text{g}$  de ácido cafeico equivalente (ACE)/mg de extrato seco e o menor teor avaliado foi do extrato de diclorometano com  $5,07 \pm 0,83 \mu\text{g}$  de ACE/mg de extrato seco. Todas as amostras foram estatisticamente diferentes entre si (Figura 9).

Considerando as amostras em estudo, segundo as diferentes condições na coleta das amostras (Figura 8), método 2 de extração, o maior teor observado nesse doseamento foi o do extrato MG ( $193,63 \pm 11,68 \mu\text{g}$  de ACE/mg de extrato seco), não diferindo estatisticamente da amostra SP ( $136,15 \pm 5,47$  ACE/mg de extrato seco). O menor teor avaliado foi do extrato PR2 ( $101,27 \pm 2,36 \mu\text{g}$  de ACE/mg de extrato seco) que não apresentou diferença significativa em relação a amostra ES ( $110,82 \pm 3,36 \mu\text{g}$  de ACE/mg de extrato seco). Comparando as amostras coletadas no Paraná em condições diferentes (PR1 e PR2) foi observado que o conteúdo de componentes fenólicos foi influenciado de forma estatisticamente significativa (Figura 10).

**Figura 6:** Regressão linear do padrão de ácido cafeico segundo método de Folin-Ciocalteu



**Tabela 8:** Conteúdo de compostos fenólicos totais nos extratos de folhas de café arábica, obtidos através do método de Folin-Ciocalteu.

Identificação da Amostra	Conteúdo de fenólicos ( $\mu\text{g}$ de ACE*/mg de extrato seco)
<b>Método 1 de extração</b>	

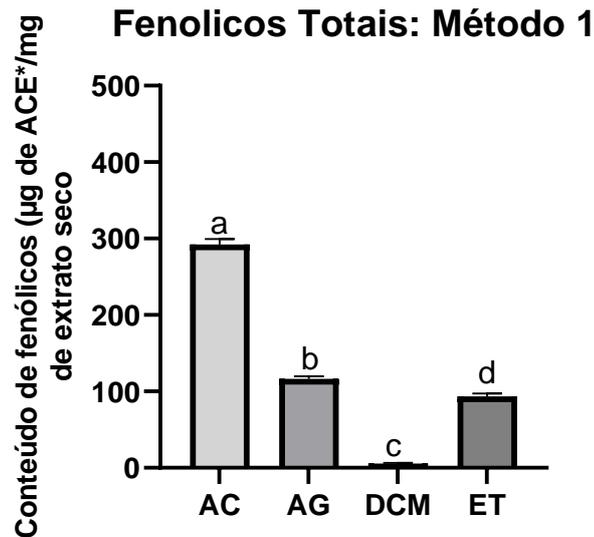
AC	289,75±7,12 <sup>b</sup>
AG	116,02±3,52 <sup>a</sup>
DCM	5,07±0,83 <sup>c</sup>
ET	94,05±4,04 <sup>d</sup>
<b>Método 2 de extração</b>	
SP	136,15±5,47 <sup>ab</sup>
MG	193,63±11,68 <sup>a</sup>
PR1	137,87±4,68 <sup>b</sup>
PR2	101,27±2,36 <sup>c</sup>
ES	110,82±3,36 <sup>c</sup>

\* ACE: Ácido cafeico equivalente. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si. Avaliação pelo método *Tukey* com 95% confiança. Avaliação da diferença estatística do método 1 e método 2 foram feitas de forma independente. fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM), fração de etanol 70% (ET), extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

**Tabela 9:** Parâmetros avaliados segundo a linearidade do método de Folin-Ciocalteu.

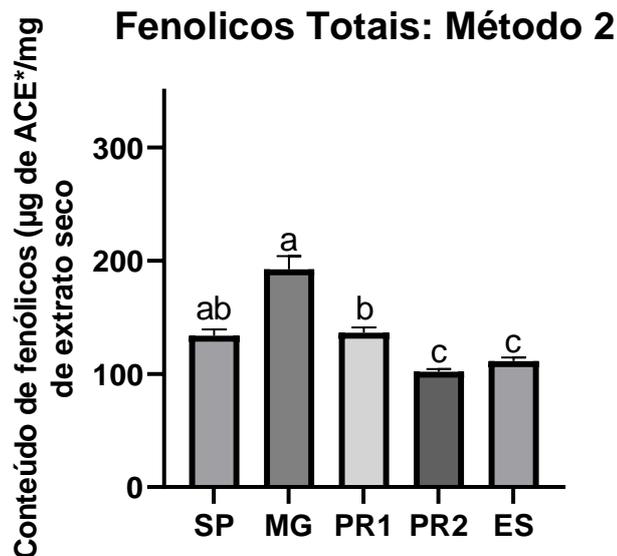
<b>Teste</b>	<b>Conclusão</b>
Teste F da ANOVA	Não se rejeita a significância do modelo linear
Teste do Intercepto	Intercepto significativo
Coefficiente de Correlação de Pearson	R = 0.9946 que é maior que o proposto (0,99)
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não se rejeita a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não se rejeita a homocedasticidade da variância
Valores extremos na resposta	Não foi detectado pontos extremos
Teste de independência das observações	Não foi detectado dependência das observações

**Figura 7:** Conteúdo de fenóis totais segundo o método de Folin-Ciocalteu (Método 1 de extração).



\* ACE: Ácido cafeico equivalente. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si. Avaliação pelo método *Tukey* com 95% confiança. Da esquerda para direita: fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM), fração de etanol 70% (ET),

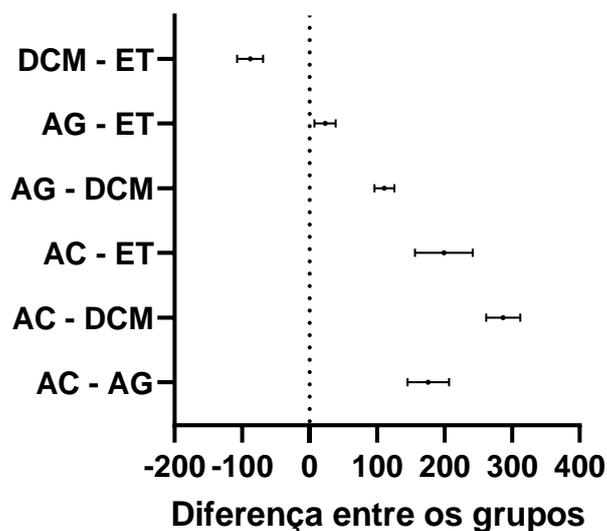
**Figura 8:** Conteúdo de fenóis totais segundo o método de Folin-Ciocalteu (Método 2 de extração).



\* ACE: Ácido cafeico equivalente. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si. Avaliação pelo método *Tukey* com 95% confiança. Da esquerda para direita: extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

**Figura 9:** Teste de *Tukey* assumindo intervalo de 95% de confiança para o ensaio fenólicos totais segundo método 1 de extração

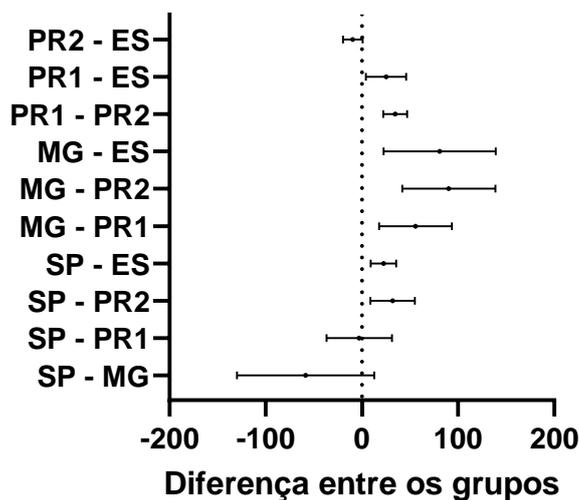
### Intervalo de confiança 95% (Tukey)



Intervalos que contém o zero possuem grupos com diferença estatística não significativa. Amostras: fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM), fração de etanol 70% (ET),

**Figura 10:** Teste de *Tukey* assumindo intervalo de 95% de confiança para o ensaio fenólicos totais segundo método 2 de extração

### Intervalo de confiança 95% (Tukey)



Intervalos que contém o zero possuem grupos com diferença estatística não significativa. Amostras: extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

#### 5.4. Doseamento de cafeína

No doseamento de cafeína, os tempos de retenção obtidos nas injeções do padrão de cafeína deram-se entre 7,535 e 7,542 minutos, e os valores obtidos nas injeções das amostras (Tabela 11) entre 7,556 e 7,562.

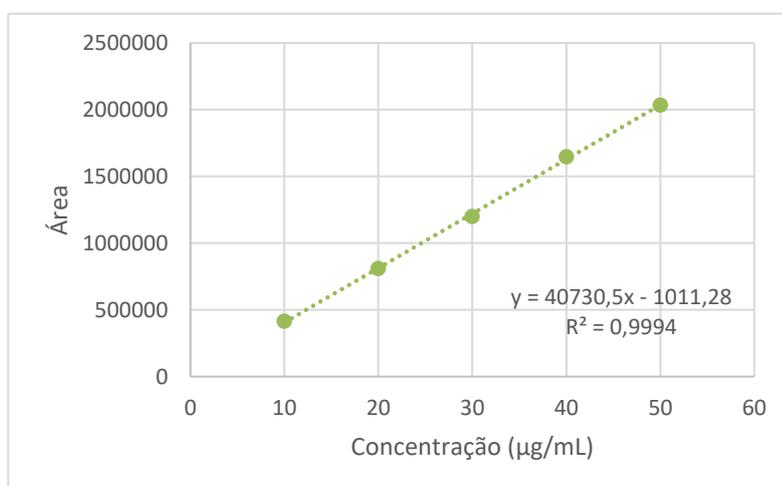
**Tabela 10:** Tempo de retenção do pico de interesse nas amostras avaliadas pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.

Sigla da Amostra	Tempo de retenção
AC	7,556
AG	7,562
DCM	7,557
ES	7,559
ET	7,556
MG	7,558
PR1	7,556
SP	7,558
PR2	7,560

Amostras: fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM), fração de etanol 70% (ET), extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

Após a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a equação da reta foi obtida, sendo  $y = 40730,5x - 1011,28$  com coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9994$  (Figura 11). Após a obtenção dos cromatogramas das amostras (Figura 14), os teores de cafeína foram quantificados a partir da curva de calibração do padrão.

**Figura 11:** Curva de calibração do padrão de cafeína segundo método de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência.



Os resultados (Tabela 11) foram dispostos na forma de gráfico segundo método 1 (Figura 12) e método 2 (Figura 13) de extração. Considerando os diferentes tipos de solventes utilizados nesse estudo (método 1 de extração), foi verificado que a fração acetato de etila extraiu a cafeína em maior quantidade (11,77%). A menor quantidade de cafeína foi extraída pelo solvente água, em temperatura ambiente (0,19%) (Tabela 11; Figura 12).

Considerando os diferentes locais e condições de coleta (método 2 de extração) foi verificado que o extrato ES nessas condições do estudo apresentou maior teor de cafeína (3,93%) e o menor teor de cafeína foi observado no extrato PR1 (2,52%). As diferentes condições de coleta de amostras do mesmo local influenciaram no conteúdo de cafeína obtida, pela comparação do conteúdo nas amostras PR1 (2,52%) e em PR2 (3,30%) (Tabela 11; Figura 13).

Não foi possível avaliar a diferença estatística entre as amostras devido ao número de replicatas realizadas.

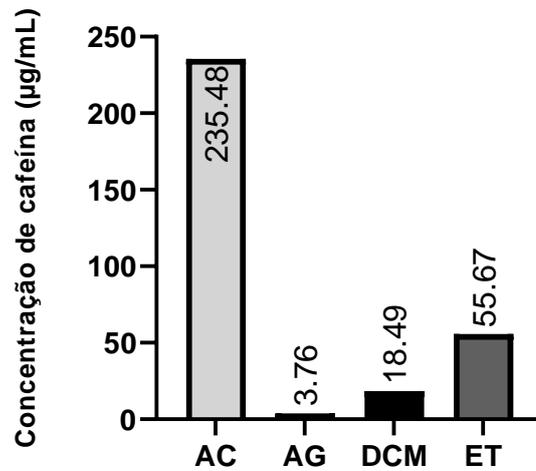
**Tabela 11:** Conteúdo de cafeína nos extratos de folha de café arábica, doseamento segundo método de cromatografia líquida de alta eficiência.

Sigla da Amostra	Concentração de cafeína ( $\mu\text{g/mL}$ )	Porcentagem de cafeína m/m %
Método 1 de extração		
AC	235,48	11,77
AG	3,76	0,19
DCM	18,49	0,92
ET	55,67	2,78
Método 2 de extração		
SP	58,34	2,92
MG	58,77	2,94
PR1	50,48	2,52
PR2	65,98	3,30
ES	78,57	3,93

Amostras: fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM), fração de etanol 70% (ET), extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

**Figura 12:** Conteúdo de cafeína segundo o método de cromatografia líquida de alta eficiência (Método 1 de extração).

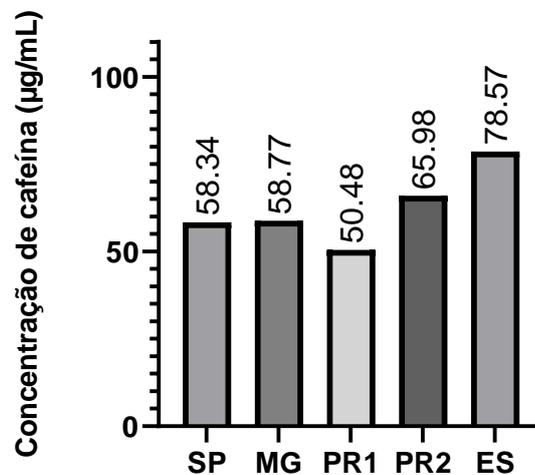
### Doseamento de Cafeína: Método 1



Amostras: fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM) e fração de etanol 70% (ET).

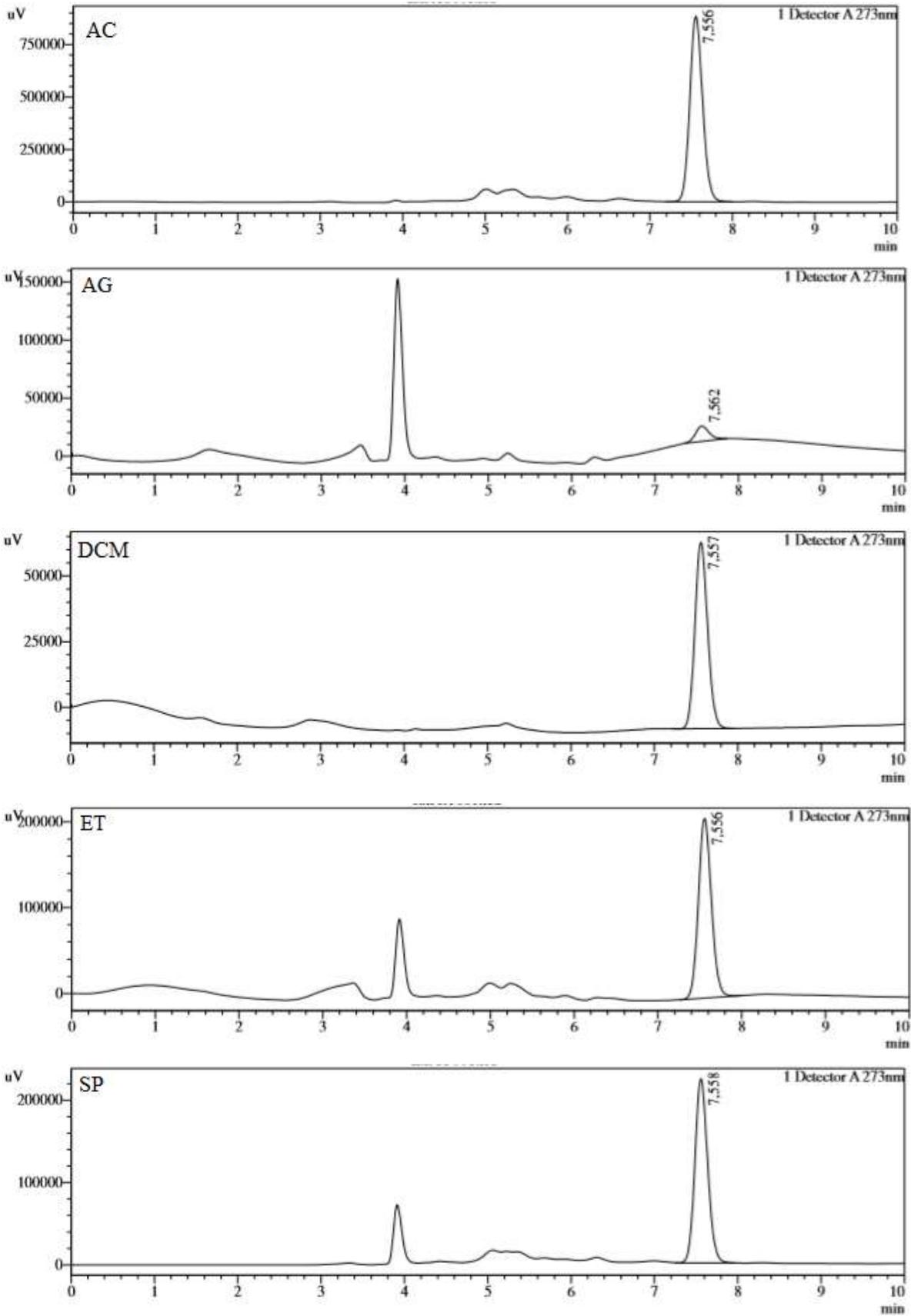
**Figura 13:** Conteúdo de cafeína segundo o método de cromatografia líquida de alta eficiência (Método 2 de extração).

### Doseamento de Cafeína: Método 2

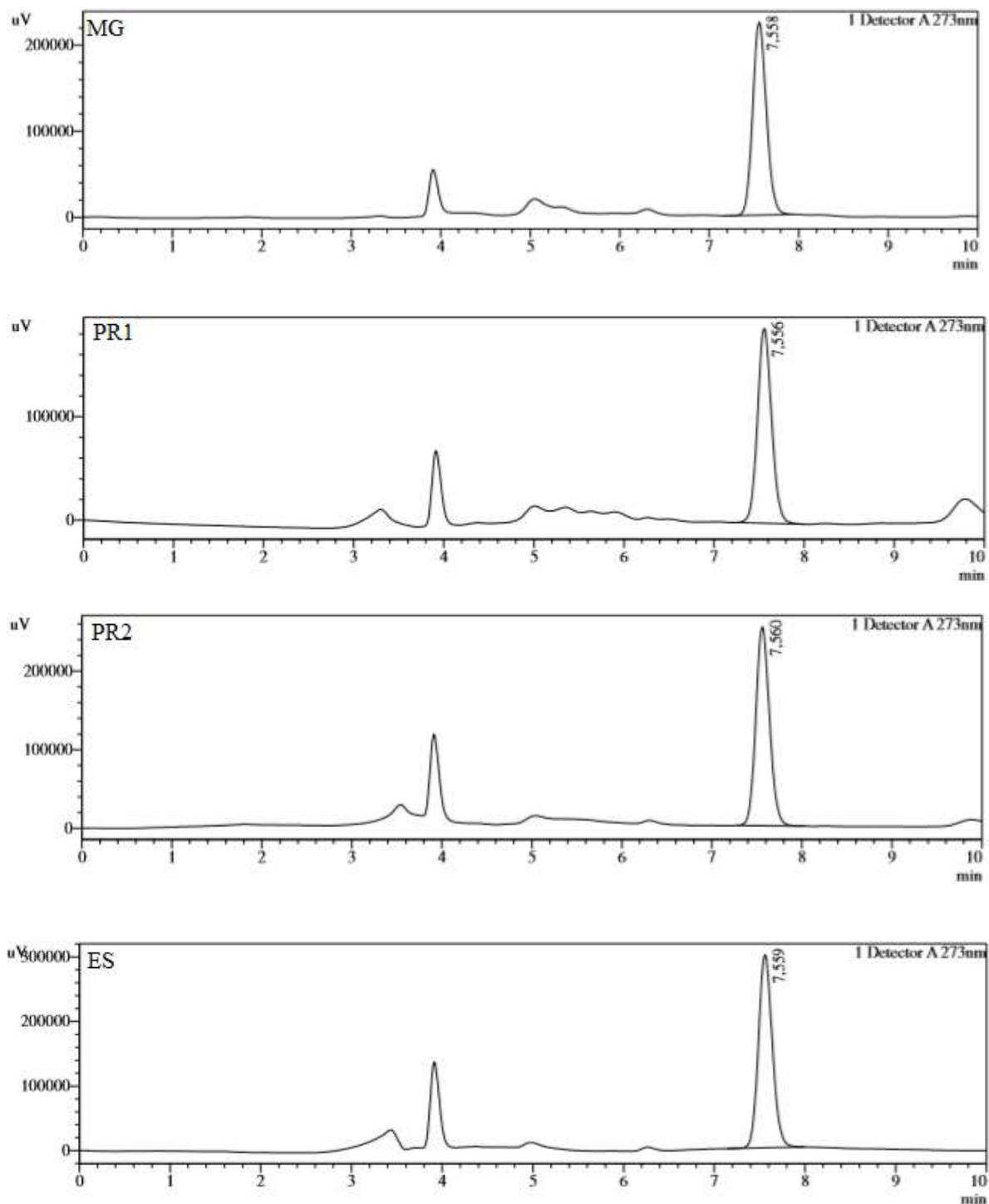


Amostras: extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

**Figura 14:** Cromatogramas dos extratos de folhas de café arábica pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência.



Continuação da fig.14



Equipamento modelo Shimadzu com detector na região UV-Visível e leitura no comprimento de onda de 273 nm. Amostras: fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM), fração de etanol 70% (ET), extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

### 5.5. Atividade de inibição do radical DPPH

Os valores de  $IC_{50}$  (Tabelas 12 e 13) foram determinados e foi obtido um valor de  $IC_{50}=64,18\pm 1,86 \mu\text{g/mL}$  para o padrão Trolox®.

**Tabela 12:** Porcentagem média de inibição do radical DPPH pelas amostras de extratos de café arábica e respectivo  $IC_{50}$ , segundo método 1 de extração.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Porcentagem Média (%) $\pm$ Desvio Padrão			
	AC	AG	DCM	ET
31,25	15,90 $\pm$ 1,48	2,88 $\pm$ 3,39	7,99 $\pm$ 0,94	11,81 $\pm$ 1,77
62,5	28,35 $\pm$ 7,69	5,60 $\pm$ 2,51	6,31 $\pm$ 5,35	20,47 $\pm$ 0,65
125	57,11 $\pm$ 2,02	10,67 $\pm$ 3,63	3,69 $\pm$ 7,75	36,38 $\pm$ 3,97
250	81,41 $\pm$ 1,21	30,91 $\pm$ 3,07	2,74 $\pm$ 1,10	57,46 $\pm$ 4,20
500	83,59 $\pm$ 1,89	55,34 $\pm$ 5,74	7,32 $\pm$ 2,84	80,89 $\pm$ 1,56
1000	88,82 $\pm$ 1,09	81,86 $\pm$ 0,79	7,41 $\pm$ 7,90	81,37 $\pm$ 0,66
$IC_{50}$ #	108,64 $\pm$ 6,9	418,28 $\pm$ 20,5	*	205,96 $\pm$ 23,2
	2	0		

# apresentado em  $\mu\text{g/mL} \pm$  Desvio Padrão; \* Não foi possível calcular a  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  inhibition concentration 50 – concentração necessária para inibir 50% do radical DPPH. Amostras: fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM) e fração de etanol 70% (ET).

**Tabela 13:** Porcentagem média de inibição do radical DPPH pelas amostras de extratos de café arábica e respectivo  $IC_{50}$ , segundo método 2 de extração.

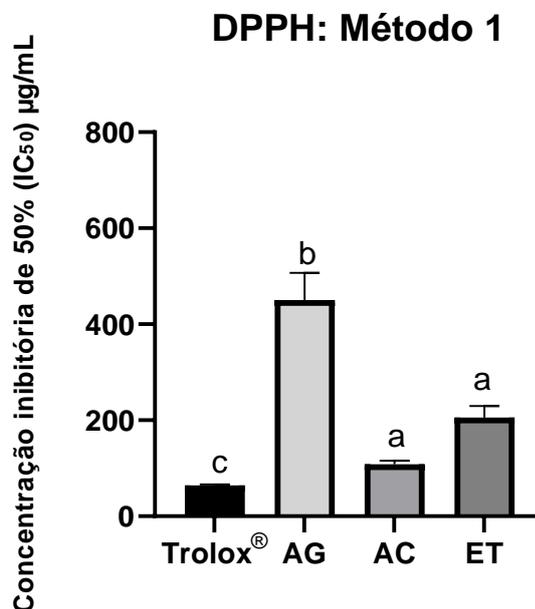
Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Porcentagem Média (%) $\pm$ Desvio Padrão				
	SP	MG	PR1	PR2	ES
31,25	12,33 $\pm$ 1,68	11,59 $\pm$ 1,31	15,16 $\pm$ 1,31	8,49 $\pm$ 2,21	10,29 $\pm$ 4,76
62,5	19,85 $\pm$ 2,47	17,37 $\pm$ 1,87	22,66 $\pm$ 1,87	11,63 $\pm$ 4,07	12,35 $\pm$ 4,74
125	35,29 $\pm$ 2,30	32,49 $\pm$ 1,80	45,68 $\pm$ 1,80	20,89 $\pm$ 4,16	18,97 $\pm$ 7,70
250	67,37 $\pm$ 1,69	63,10 $\pm$ 1,06	78,49 $\pm$ 1,06	38,28 $\pm$ 3,29	27,18 $\pm$ 1,36
500	81,77 $\pm$ 2,13	79,80 $\pm$ 0,30	80,29 $\pm$ 0,30	67,60 $\pm$ 4,23	51,53 $\pm$ 2,20
1000	79,80 $\pm$ 0,36	80,39 $\pm$ 0,87	80,67 $\pm$ 0,87	83,09 $\pm$ 0,25	79,33 $\pm$ 0,35
$IC_{50}$ *	182,22 $\pm$ 7,94	196,35 $\pm$ 8,65	141,32 $\pm$ 6,43	350,60 $\pm$ 30,70	486,31 $\pm$ 21,06

# apresentado em  $\mu\text{g/mL} \pm$  Desvio Padrão.  $IC_{50}$  inhibition concentration 50 – concentração necessária para inibir 50% do radical DPPH. Amostras: extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

Em relação ao método 1 de extração (Tabela 12; Figura 14), os extratos AC ( $IC_{50} = 108,64 \pm 6,92 \mu\text{g/mL}$ ) e ET ( $IC_{50} = 205,96 \pm 23,2 \mu\text{g/mL}$ ) apresentaram as menores concentrações necessárias para inibição de 50% do radical DPPH, ou seja, maior atividade antirradicalar, não havendo diferença estatística significativa entre as duas amostras. A fração AG ( $IC_{50} = 418,28 \pm 20,50 \mu\text{g/mL}$ ) apresentou a menor atividade antirradicalar calculada. Não foi possível obter  $IC_{50}$  para o extrato DCM, pois

o extrato não apresentou atividade antirradicalar significativa nas concentrações analisadas (máximo 1000µg/mL).

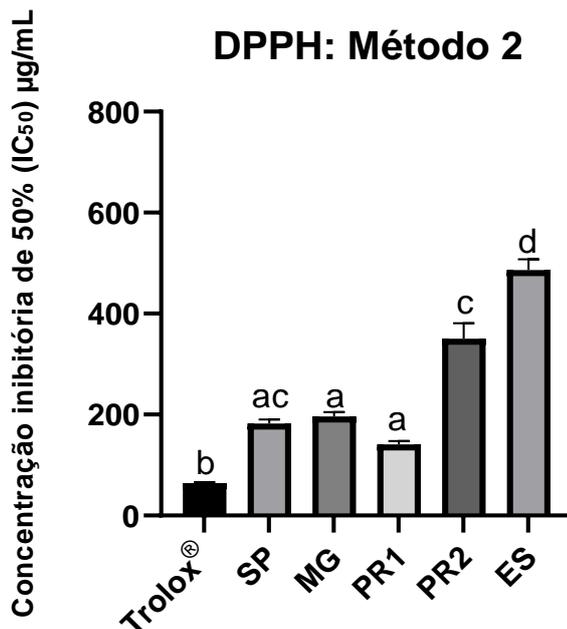
**Figura 15:** Gráfico de atividade antirradicalar segundo método DPPH para extratos obtidos pelo método 1 de extração



Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si. IC<sub>50</sub> *inhibition concentration 50* – concentração necessária para inibir 50% do radical DPPH. Amostras: fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM) e fração de etanol 70% (ET).

Em relação ao método 2 de extração (Tabela 13; Figura 15), os extratos PR1 (IC<sub>50</sub>=141,32±6,43 µg/mL), SP (IC<sub>50</sub>=182,22±7,94 µg/mL) e MG (IC<sub>50</sub>=196,35±8,65 µg/mL) apresentaram maior atividade antirradicalar, e quando analisados pelo teste de *Tukey* não apresentaram diferença estatística significativa. Nenhum dos extratos apresentou atividade inibitória semelhante estatisticamente ao controle Trolox®. As amostras PR1 (IC<sub>50</sub>=141,32±6,43 µg/mL) e PR2 (IC<sub>50</sub>=350,60±30,70 µg/mL) apresentaram diferença estatística significativa.

**Figura 16:** Gráfico de atividade antirradicalar segundo método DPPH para extratos obtidos pelo método 2 de extração



Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si. IC<sub>50</sub> *inhibition concentration 50* – concentração necessária para inibir 50% do radical DPPH. Amostras: extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

### 5.6. Avaliação sobre a proliferação celular *in vitro*

Os resultados obtidos foram dispostos no gráfico (Figura 17), nele os valores entre 100% e 0 significam que houve proliferação celular (efeito proliferativo), sendo que 50% de crescimento é o parâmetro GI<sub>50</sub>. O valor 0 representa que a quantidade de células é a mesma no momento de adição das amostras (efeito citostático). E os valores negativos representam morte celular (efeito citocida) (MONKS *et al.*, 1991).

Nenhum dos extratos apresentou atividade antiproliferativa comparável ao controle doxorrubicina (Tabela 14). Segundo o método 1 de extração, o extrato DCM, apresentou efeito citostático frente a linhagem tumoral humana U251 (GI<sub>50</sub> estimada de 15 µg/mL) e citostático frente a linhagem não-tumoral humana HaCat (GI<sub>50</sub> = 26,9 ± 19,5 µg/mL).

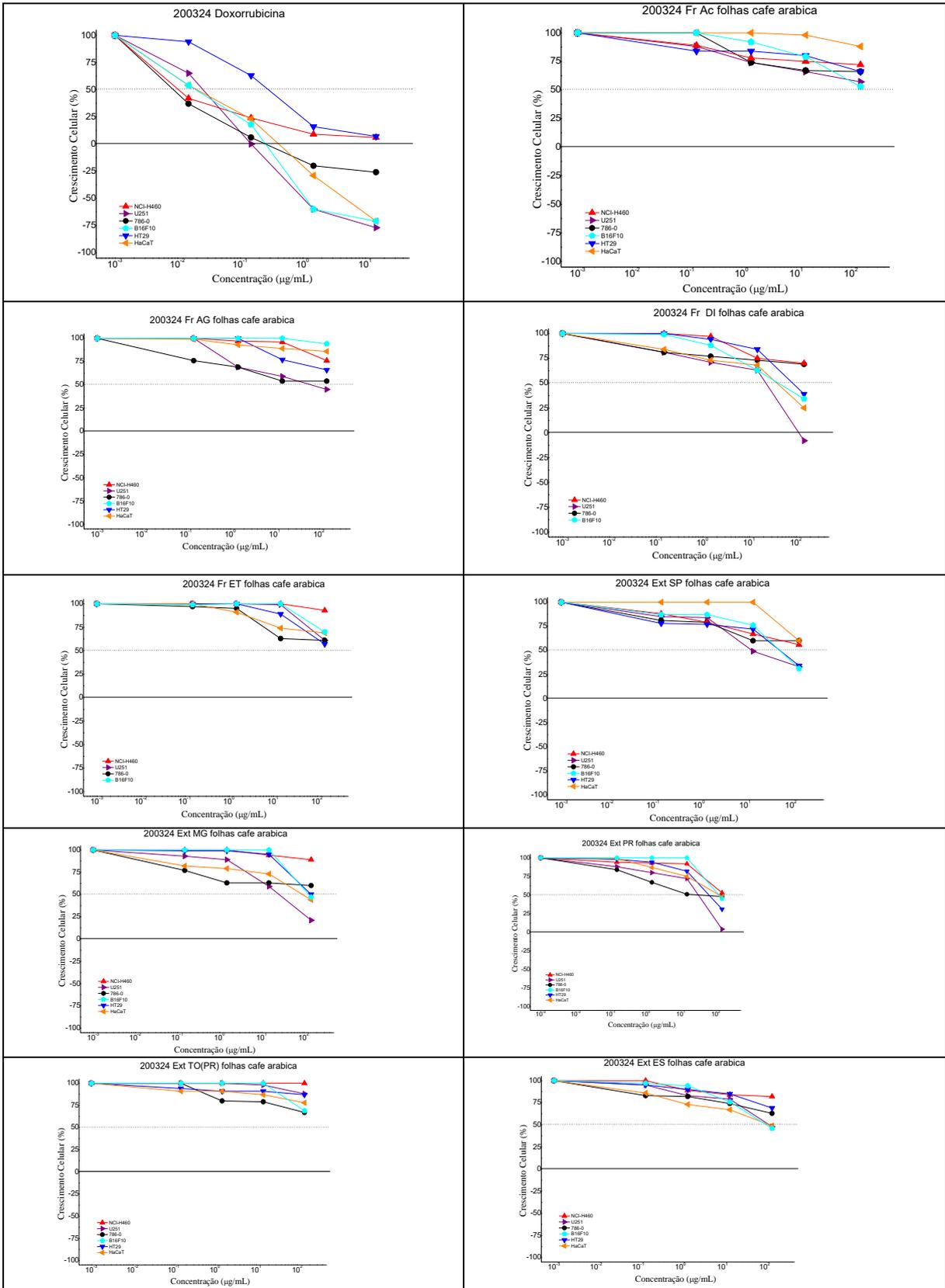
Segundo o método 2 de extração, os extratos MG (GI<sub>50</sub> = 24,4 ± 3,5 µg/mL), PR1 (GI<sub>50</sub> = 26,6 ± 14,5 µg/mL) e SP (GI<sub>50</sub> = 22,9 ± 10,8 µg/mL) apresentaram efeito citostático seletivo sobre a linhagem tumoral humana U251. Os demais extratos apresentaram pouco ou nenhum efeito sobre as linhagens celulares, incluindo a linhagem não tumoral humana HaCat, indicando uma possível segurança do uso.

**Tabela 14:** Resultados de GI<sub>50</sub> após 48 h de exposição de linhagens celulares a extratos de café arábica, segundo método de atividade antiproliferativa *in vitro*.

	U251	786-0	NCI-H460	HT29	HaCaT	B16F10
<b>Doxorrubicina</b>	0,015	<0,015	<0,015	0,26 ± 0,03	0,019 ± 0,041	0,018 ± 0,03
<b>Método 1 de extração</b>						
<b>AC</b>	>150	>150	>150	>150	>150	>150
<b>AG</b>	55,7 ± 49,7	>150	>150	>150	>150	>150
<b>DCM</b>	15*	>150	>150	91,2 ± 9,4	26,9 ± 19,5	43,3 ± 5,6
<b>Et</b>	>150	>150	>150	>150	>150	>150
<b>Método 2 de extração</b>						
<b>SP</b>	22,9 ± 10,8	>150	>150	150*	>150	54,9 ± 26,3
<b>ES</b>	150	>150	>150	>150	150	112,7 ± 8,5
<b>MG</b>	24,4 ± 3,5	>150	>150	150	150	148,42 ± 0,01
<b>PR1</b>	26,6 ± 14,5	48,7 ± 36,9	>150	66,7 ± 7,5	129,4 ± 26,9	147,22 ± 0,07
<b>PR2</b>	>150	>150	>150	>150	>150	>150

Linhagens tumorais humanas: U251 (glioblastoma); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células), HT-29 (Cólon; adenocarcinoma). Linhagem tumoral murina: B16F10 (melanoma). Linhagem não-tumoral humana: HaCat (queratinócito). GI<sub>50</sub>: *Growth Inhibition 50* – concentração necessária para inibir em 50% a proliferação celular (resultados com o erro padrão do cálculo da regressão sigmoidal). \* GI<sub>50</sub> estimada (não foi possível calcular a concentração efetiva a partir dos dados experimentais). Amostras: fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM), fração de etanol 70% (ET), extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

**Figura 17:** Atividade antiproliferativa *in vitro* de extratos de folha de café arábica em painel de linhagens celulares, tumorais e não-tumoral, após 48 horas de tratamento.



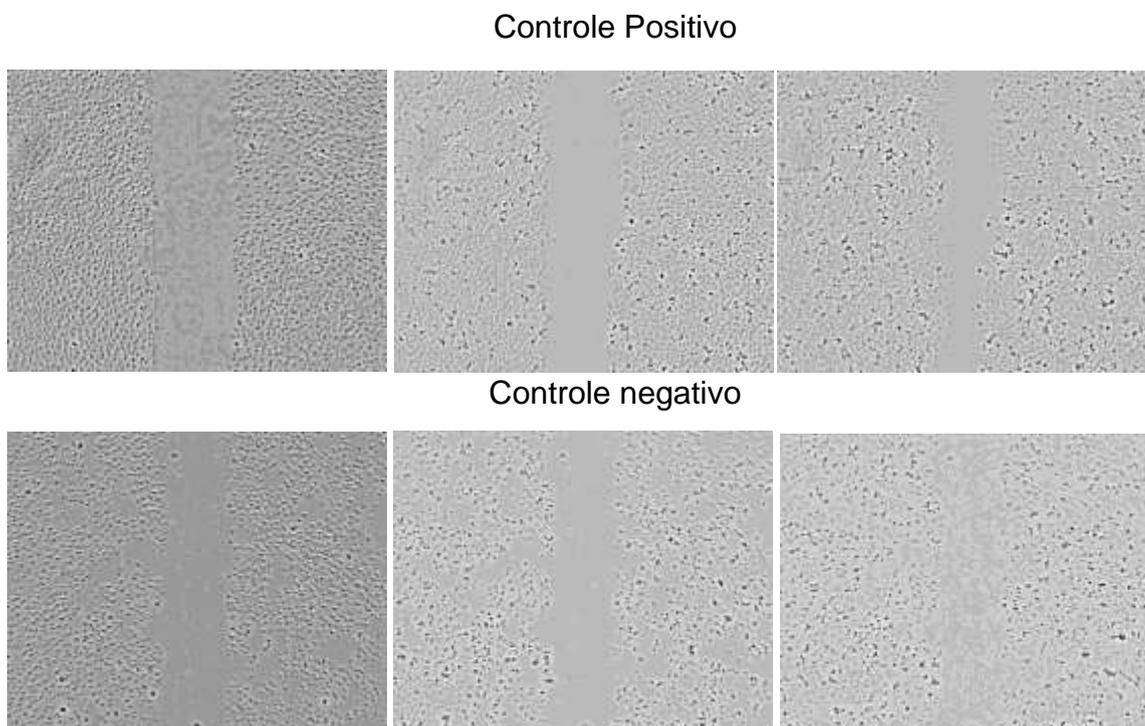
Linhagens tumorais humanas: cor roxa: U251 (glioblastoma), cor preta: 786-0 (rim), cor vermelha: NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células), cor azul escuro: HT-29 (Cólon; adenocarcinoma). Linhagem tumoral murina - cor azul claro: B16F10 (melanoma). Linhagem não-tumoral humana - cor laranja: HaCat (queratinócito). GI<sub>50</sub>: *Growth Inhibition 50* – concentração necessária para inibir em 50% a proliferação celular. Amostras: primeira coluna de cima para baixo: Doxorubicina, fração de água destilada (AG), fração de etanol 70% (ET), extrato Minas Gerais (MG) e extrato Paraná coleta dia 06/04

(PR2). Coluna da direita de cima para baixo: fração de acetato de etila (AC), extrato de diclorometano (DCM), extrato São Paulo (SP), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1) e extrato Espírito Santo (ES).

### 5.7. Avaliação sobre a migração celular *in vitro*

As microfotografias (Figura 18) foram analisadas e as porcentagens médias de migração celular relativa foram calculadas (Tabela 15). Os resultados foram dispostos em gráficos (Figuras 19 e 21), e foi realizada a análise de *Tukey* para verificação da diferença estatística entre as amostras (Figuras 20 e 22). Em relação ao teste realizado com a linhagem HaCat, nenhuma das amostras apresentou migração celular superior ao controle positivo (SBF 5% diluído em meio RPMI). Devido a variabilidade dos resultados entre as replicatas de análise, não foi possível verificar diferença estatística significativa entre as amostras. Apesar da variabilidade, podemos observar pela comparação das microfotografias que nessas condições o extrato de folhas de café não estimula a migração celular na linhagem celular HaCat.

**Figura 18:** Avaliação da influência de extratos de café arábica sobre a migração celular de queratinócitos imortalizados (HaCat), fotografias nos tempos 0, 12 e 24 horas, respectivamente, após a exposição.

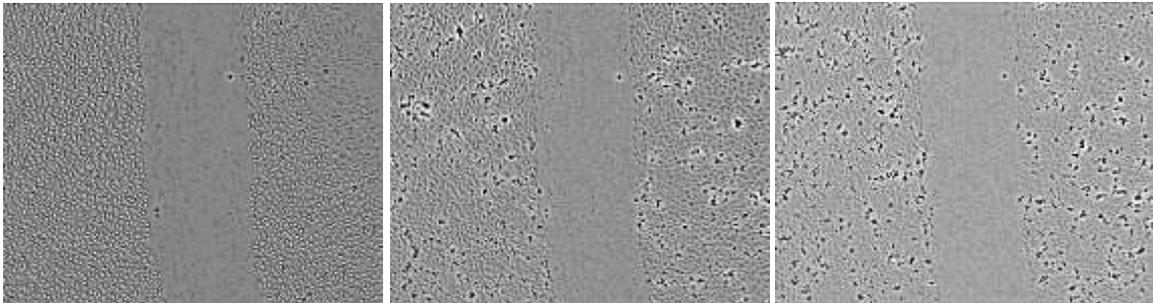


Continuação da fig. 18.

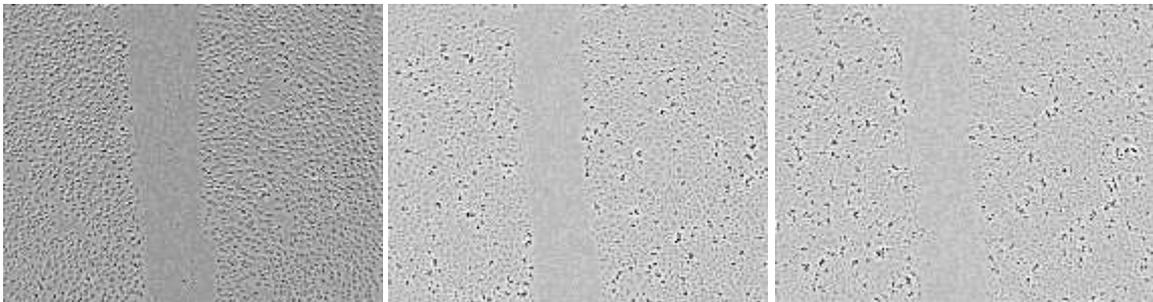
Amostra AC



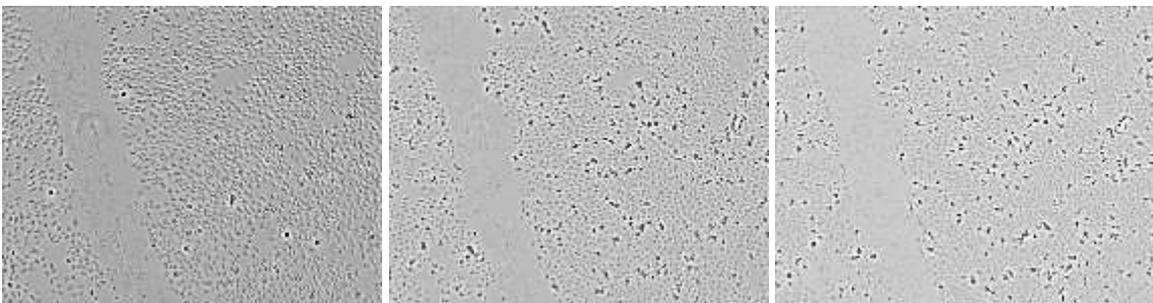
Amostra AG



Amostra DCM

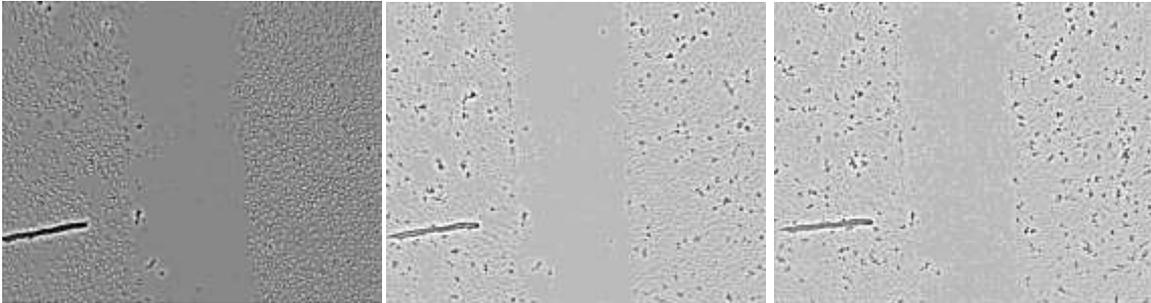


Amostra ET

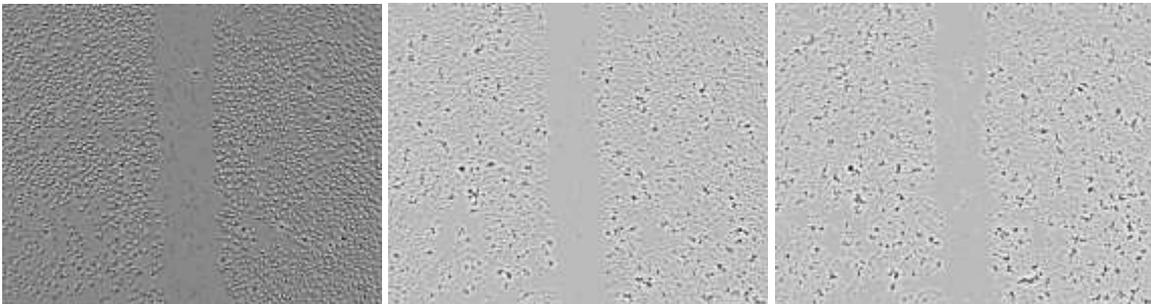


Continuação da fig. 18.

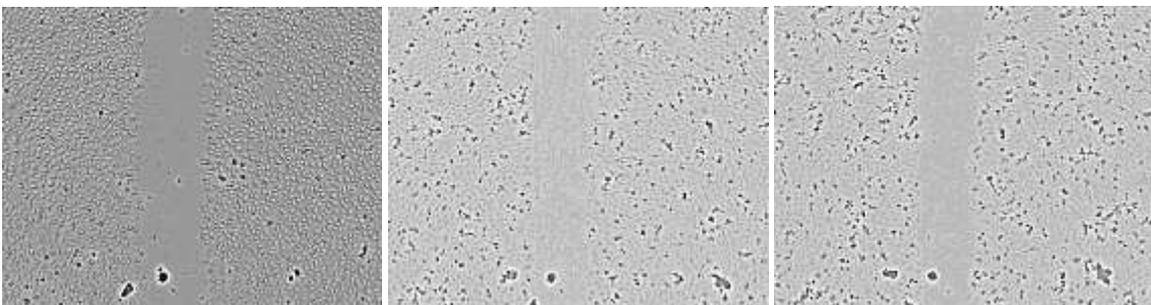
Amostra SP



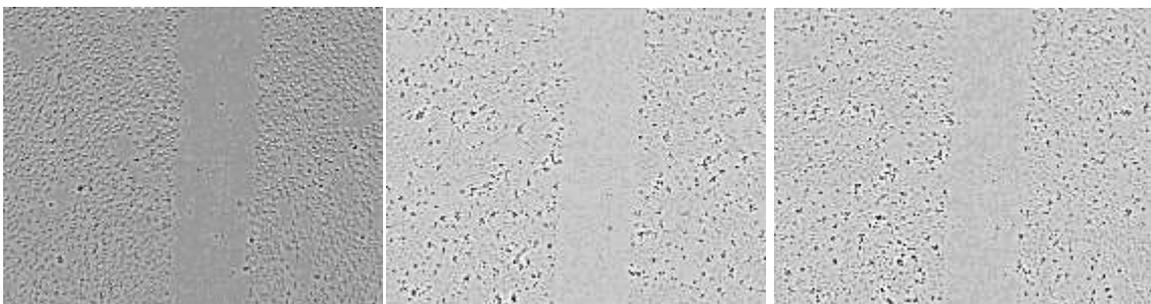
Amostra MG



Amostra PR1

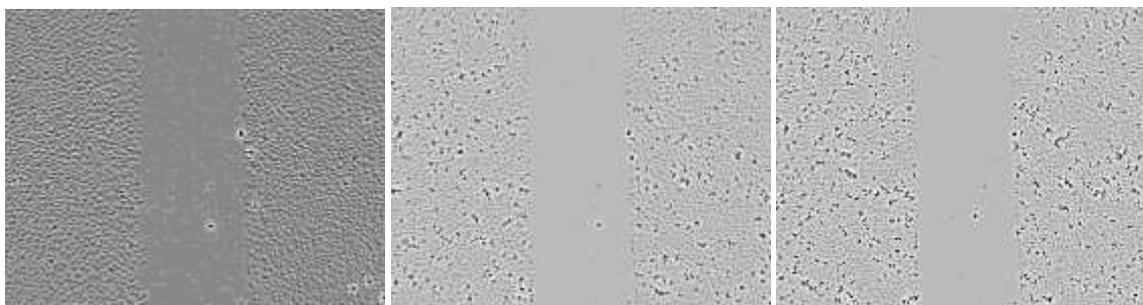


Amostra PR2



Continuação da fig. 18.

Amostra ES



Amostras: fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM), fração de etanol 70% (ET), extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

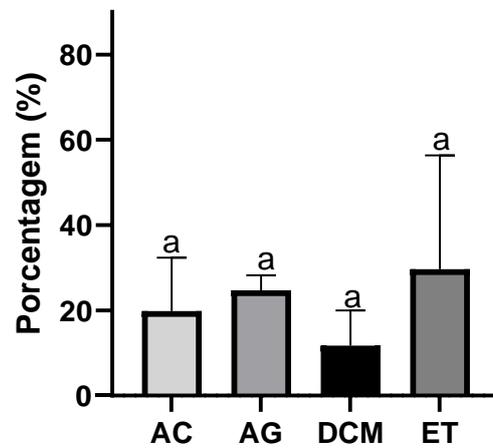
**Tabela 15:** Valores médios de porcentagem de migração celular relativa (MCR) após 24h de exposição de queratinócitos imortalizados (HaCat) a extratos de café arábica, segundo o ensaio de *scratch assay*.

Identificação da Amostra	Valores médios da porcentagem de migração celular relativa (%)
Segundo Método 1 de extração	
AC	19,62±10,23
AG	25,09±2,89
DCM	11,59±6,70
ET	29,93±21,79
Segundo Método 2 de extração	
SP	8,24±12,10
MG	40,18±8,53
PR1	17,63±1,52
PR2	19,40±19,54
ES	21,82±20,00

Amostras: fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM), fração de etanol 70% (ET), extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

**Figura 19:** Valores médios de porcentagem de migração celular relativa (MCR) após 24h de exposição de queratinócitos imortalizados (HaCat) a extratos de café arábica, segundo o ensaio de *scratch assay*, método 1 de extração.

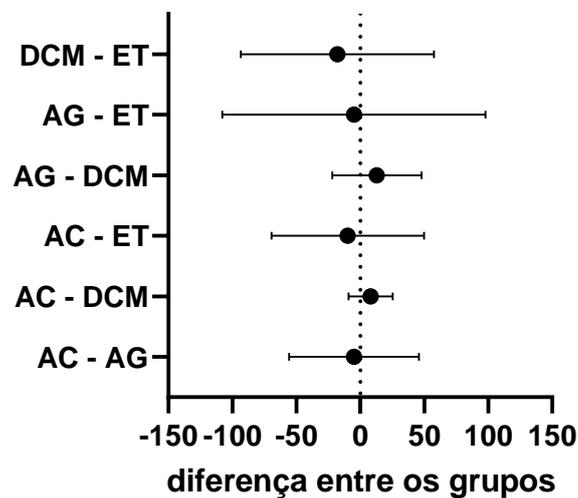
### Migração celular relativa (24h): Método 1



Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si. Avaliação pelo método *Tukey* com 95% confiança. Amostras: fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM) e fração de etanol 70% (ET).

**Figura 20:** Teste de *Tukey* assumindo intervalo de 95% de confiança para o ensaio *Scratch assay* segundo método 1 de extração.

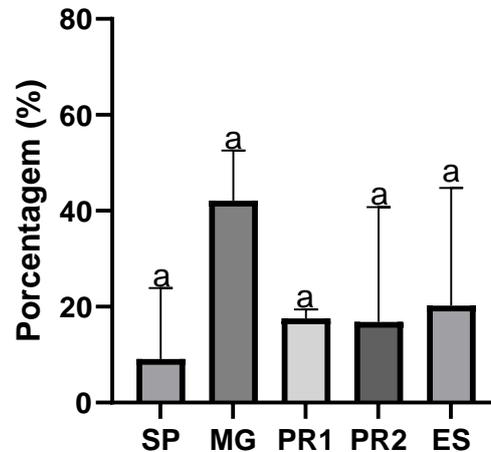
### Intervalo de confiança 95% (Tukey)



Intervalos que contém o zero possuem grupos com diferença estatística não significativa. Amostras: fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM) e fração de etanol 70% (ET).

**Figura 21:** Valores médios de porcentagem de migração celular relativa (MCR) após 24h de exposição de queratinócitos imortalizados (HaCat) a extratos de café arábica, segundo o ensaio de *scratch assay*, método 2 de extração.

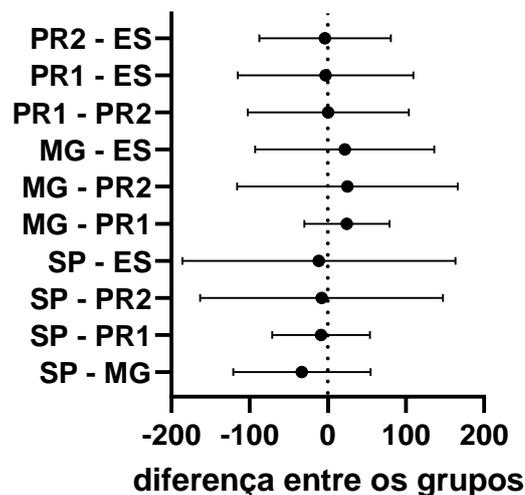
## Migração celular relativa (24h): Método 2



Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si. Avaliação pelo método *Tukey* com 95% confiança. Amostras: extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

**Figura 22:** Teste de *Tukey* assumindo intervalo de 95% de confiança para o ensaio *scratch assay* segundo método 2 de extração.

## Intervalo de confiança 95% (Tukey)



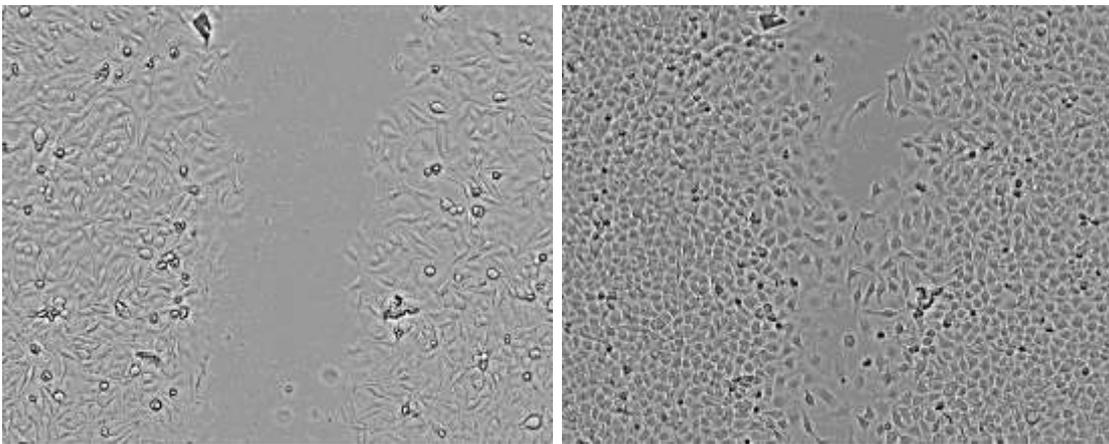
Intervalos que contém o zero possuem grupos com diferença estatística não significativa. Amostras: extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

A mesma dificuldade sobre a divergência entre os resultados das replicatas amostrais foi enfrentada durante o teste com a linhagem celular HGF-1. Além disso, durante a realização da ferida, devido à falta de experiência na execução do teste, a ponteira de 200uL não foi trocada entre as execuções, resultando em feridas com tamanhos bastante divergentes. A última fotografia obtida pelo software ocorreu no

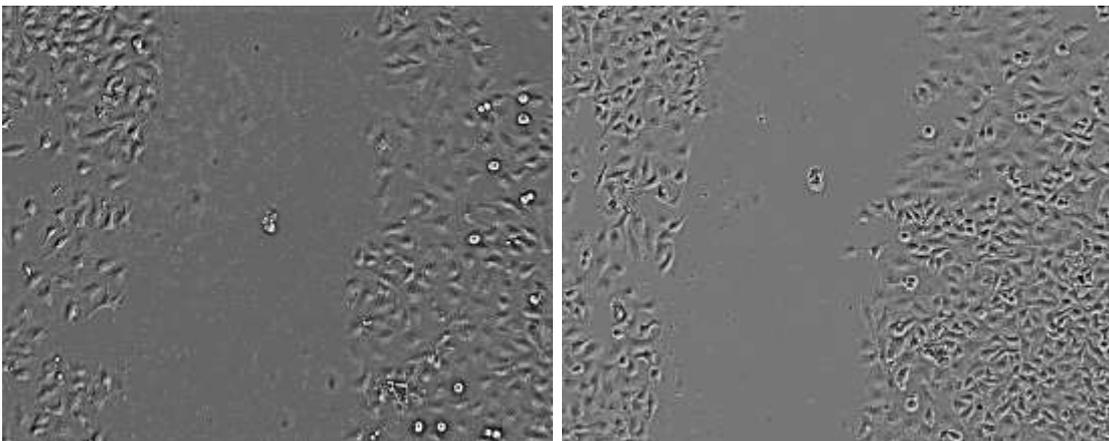
tempo de 17 horas devido a um erro durante a programação do seu funcionamento. Nem todas as replicatas realizadas puderam ser analisadas pelo ImageJ® não sendo possível o cálculo dos índices de migração celular relativa para as amostras. Abaixo seguem imagens fotografadas pelo software durante o tempo de execução do teste (Figura 23).

**Figura 23:** Avaliação da influência de extratos de café arábica sobre a migração celular de fibroblastos gengivais (HGF), fotografias nos tempos 0 e 17 horas, respectivamente, após a exposição.

#### Controle Positivo

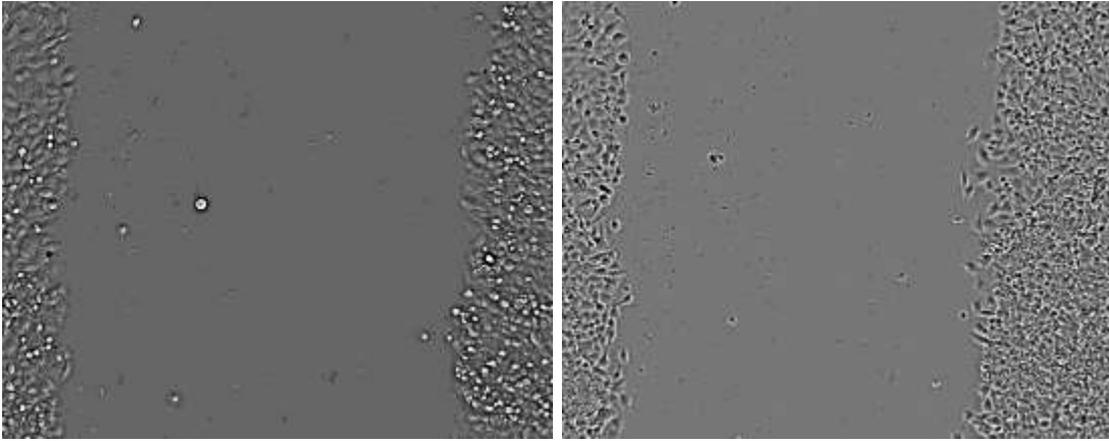


#### Controle Negativo

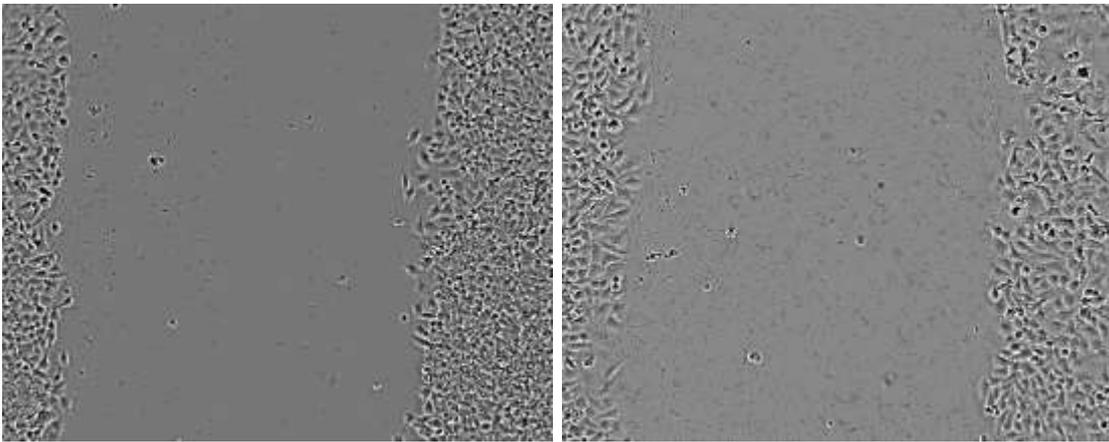


Continuação da fig.23.

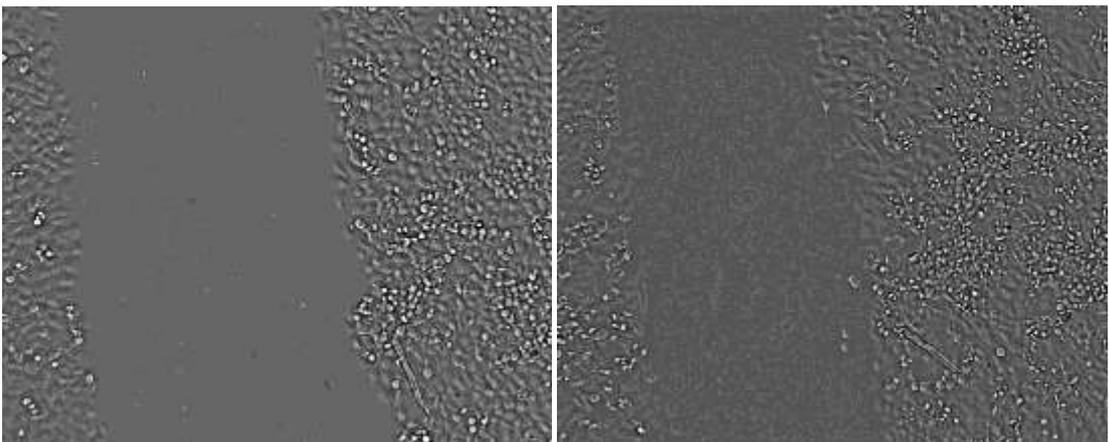
Amostra AC



Amostra AG

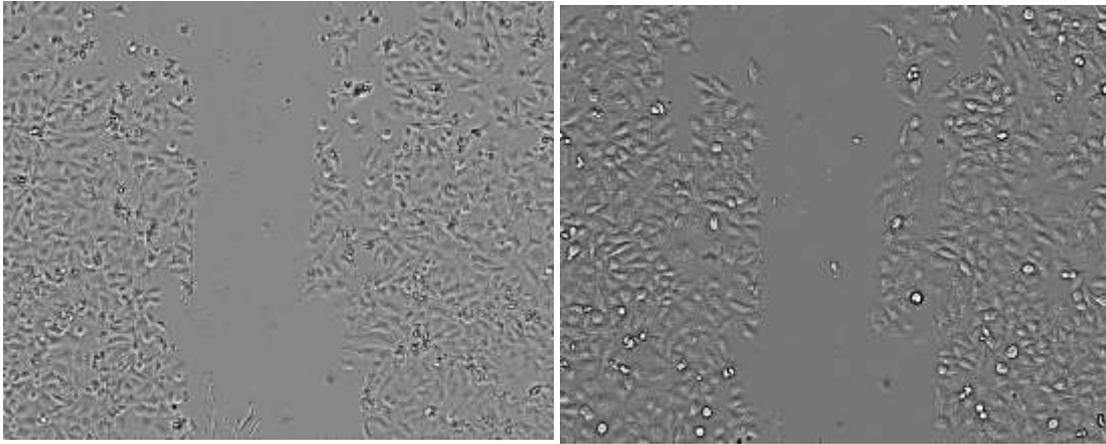


Amostra DCM

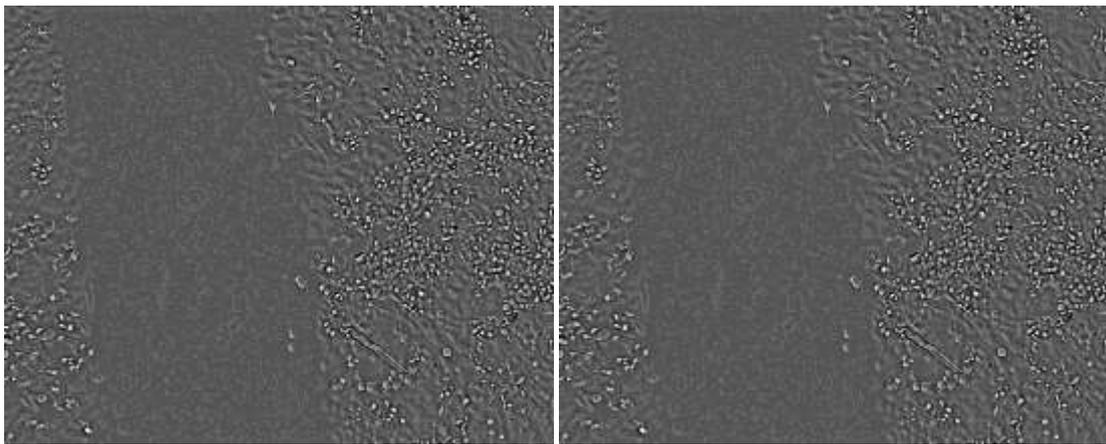


Continuação da fig.23.

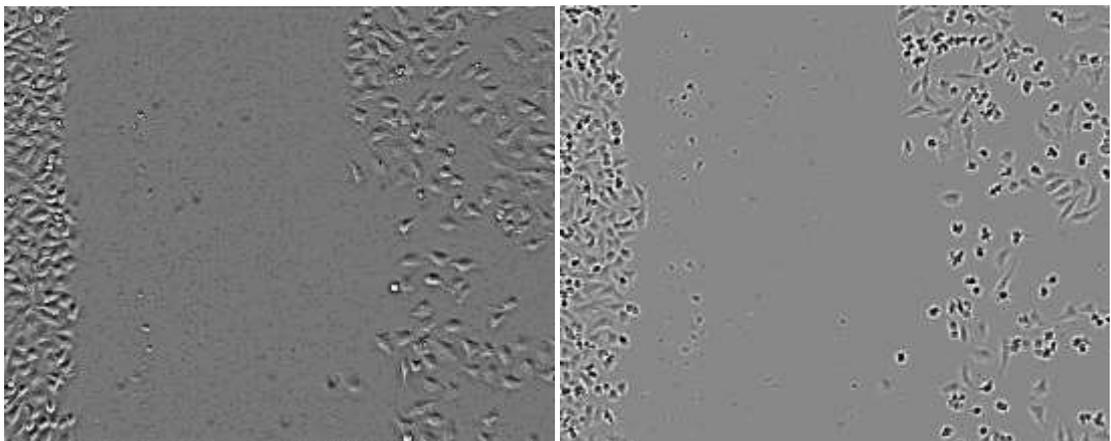
Amostra MG



Amostra SP

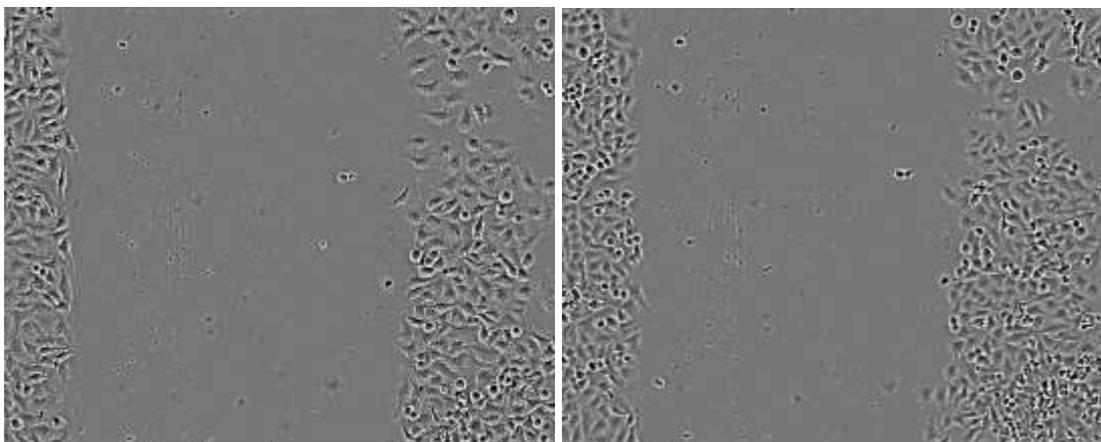


Amostra PR1

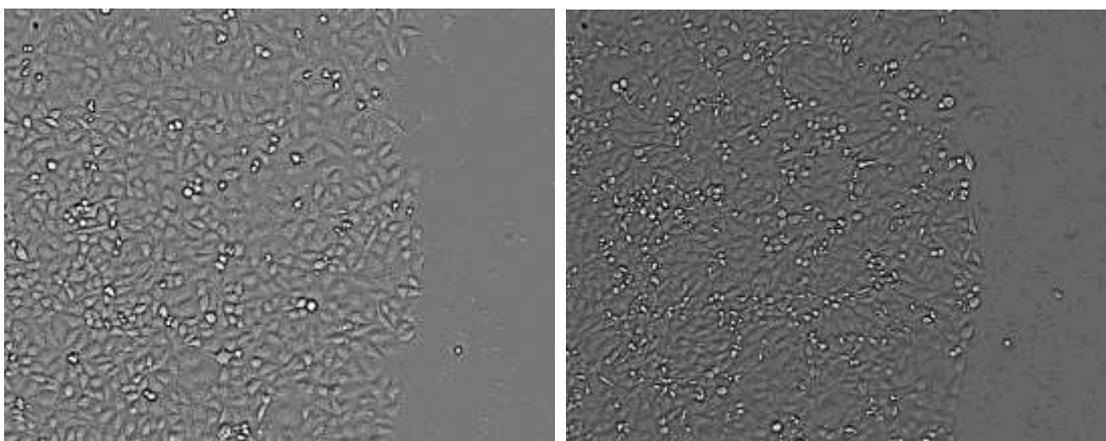


Continuação da fig.23.

Amostra PR2



Amostra ES



Amostras: fração de acetato de etila (AC), fração de água destilada (AG), extrato de diclorometano (DCM), fração de etanol 70% (ET), extrato São Paulo (SP), extrato Minas Gerais (MG), extrato Paraná coleta dia 23/03 (PR1), extrato Paraná coleta dia 06/04 (PR2) e extrato Espírito Santo (ES).

Apesar da migração celular relativa não ter sido calculada, é possível observar, através da comparação das microfotografias, que no controle positivo houve a migração das células em direção ao centro da placa, o que não foi observado no controle negativo e nas amostras de extratos de café, indicando que nessas condições o extrato de café não estimula a migração celular da linhagem celular HGF.

## 6. Discussão

A motivação desse trabalho foi o aproveitamento dos resíduos foliares da produção do café, através da produção de dados que resultem no lançamento de

novos produtos no mercado a partir de insumo nacional oriundo de fontes ecologicamente sustentáveis.

A estratégia adotada para este trabalho foi avaliar a variabilidade do perfil químico de amostras coletadas de quatro regiões distintas, explorar a atividade antioxidante, a proliferação em linhagens celulares e de migração celular dos extratos das folhas de *Coffea arabica* L. para compreender as suas potencialidades de aproveitamento na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos.

Os extratos de folhas de café arábica demonstraram atividade antioxidante e citostática seletiva, com variabilidades no perfil químico e farmacológico a depender da região e condições de extração e cultivo.

Para avaliação do perfil do extrato de folhas de café arábica, foram utilizados dois métodos de extração com objetivos diferentes. O método 1 de extração é um método de triagem, onde solventes com polaridades distintas foram empregados a fim de se obter uma separação de classes de compostos químicos, de acordo com a afinidade pelo solvente. Esse método pode ser empregado para conhecimento das diferentes atividades biológicas apresentadas pela planta, conforme a polaridade dos compostos químicos, e para auxiliar na escolha do solvente mais adequado na extração da planta de interesse.

O solvente acetato de etila possibilitou extração de maiores quantidades de compostos fenólicos (Folin-Ciocalteu e CCD) e de cafeína. Os resultados eram esperados, já que os compostos fenólicos são encontrados na natureza sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo solúveis em solventes orgânicos polares e água (SIMÕES *et al.*, 2007). As metilxantinas, por sua vez, são solúveis em água e soluções aquosas ácidas, etanol, solventes orgânicos clorados e soluções alcalinas (SIMÕES *et al.*, 2007). Durante a etapa de partição líquido-líquido, o solvente acetato de etila extraiu a cafeína em maior quantidade devido as características moleculares e sua maior afinidade, resultando assim pouca quantidade no solvente água.

Os extratos obtidos através do uso dos solventes acetato de etila e etanol 70% apresentaram maiores atividades antirradicalar, bem como maiores quantidades de compostos fenólicos. Os compostos fenólicos do café são responsáveis por diversas atividades (DAI; MUMPER, 2010), e as frações com maior polaridade têm demonstrado uma boa capacidade de extração de compostos com atividade antioxidante (SEGHE TO *et al.*, 2018), corroborando os resultados obtidos. Por apresentar atividade antioxidante, a folha do café pode ser melhor explorada na

cadeia industrial, com aplicação em alimentos com alegações funcionais, como adjuvante de formulação, na fabricação de cosméticos, em medicamentos que atuam em desordens de origem oxidativa, entre outros (ANGELO; JORGE, 2007; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Em relação a atividade antiproliferativa em células tumorais, resultados de  $GI_{50}$  inferiores de 30  $\mu\text{g/mL}$  no teste de triagem *in vitro* de amostras (FOUCHE *et al.*, 2008) são considerados promissores para subsequente avaliação. O extrato obtido através do uso do diclorometano apresentou atividade citostática frente a linhagem HaCat e U-251, devido a característica menos polar do solvente, possibilitando a extração de compostos com maior afinidade pela membrana celular. Os compostos fenólicos não estão correlacionados a essa atividade observada, de acordo com os resultados de fenólicos totais e CCD.

Como limitações desse método de extração, podemos citar o emprego do solvente diclorometano e acetato de etila que por suas características físico-químicas, apresentam toxicidade e impacto ambiental significativo (CAPELLO; FISCHER; HUNGERBÜHLER, 2007). Entretanto, para emprego em triagem das classes de compostos presentes na espécie o uso desses solventes é válido.

As coletas em diferentes condições e localidades nos permitiram avaliar a diversidade de compostos químicos e atividades biológicas de uma mesma espécie. O método 2 (turbólise) é um método no qual ocorre a trituração da droga vegetal aliado à homogeneização contínua junto ao solvente utilizado. É um método rápido, com bons rendimentos e como limitação cita-se a geração de calor e necessidade de acompanhamento por parte do pesquisador, para não ocasionar aumento excessivo na temperatura (SIMÕES *et al.*, 2007). O método foi empregado com o objetivo de comparar as diferentes condições de coleta, e verificar a influência da coleta nas atividades biológicas. Na área de produtos naturais os solventes etanol e água vêm sendo bastante utilizados, devido a sua ampla faixa de extração, bem como sua baixa toxicidade e biocompatibilidade, uma característica importante considerando uma formulação farmacêutica (AULTON, 2016; CAPELLO; FISCHER; HUNGERBÜHLER, 2007).

As amostras que originaram os extratos MG, SP, PR1 e ES foram coletadas durante a fase de enchimento do endosperma, enquanto a de PR2 foi coletada durante a colheita do fruto. As diferenças entre as cores e bandas apresentadas pelo monitoramento utilizando CCD nos indica a presença de compostos químicos

diferentes, dependendo da localidade e do estágio de amadurecimento do fruto em que a folha foi coletada. As condições geográficas e climáticas das regiões de coleta das folhas que originaram os extratos PR1, SP e MG, parecem ser favoráveis para obtenção de compostos fenólicos. As regiões com menor incidência de radiação e temperatura nos meses anteriores apresentaram maior composição fenólica, estudos na literatura corroboram esses dados (SALGADO, et al. 2008). Esses extratos também apresentaram maior atividade antioxidante e citostática frente a linhagem de glioblastoma (U-251). As condições que originaram os extratos ES e PR2 propiciaram maiores conteúdos de cafeína.

As plantas produzem metabólitos primários e secundários. Os metabólitos secundários têm a função de adaptação da espécie ao meio em que vivem e podem ser divididos nos grandes grupos: terpenos e esteroides, ácidos graxos e acetogeninas, taninos, compostos nitrogenados (alcaloides) e compostos fenólicos (VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010). Compostos nitrogenados como a cafeína, estão envolvidos nos mecanismos de defesa dos tecidos jovens e imaturos, contra patógenos e herbívoros (FUJIMORI; ASHIHARA, 1994). Os compostos fenólicos estão envolvidos em atividades antibacterianas, antifúngicas, defesa contra animais herbívoros pela diminuição da digestibilidade da planta, proteção contra raios ultravioletas, e outras (TREUTTER, 2006). A produção de determinado metabólito secundário, pode ser favorecida pelas características sazonais (MARÍN-GARZA *et al.*, 2018), práticas agrônômicas e fatores intrínsecos da planta (CIARAMELLI; PALMIOLI; AIROLDI, 2019; SOUARD *et al.*, 2018).

Os metabólitos secundários têm sido estudados amplamente pela comunidade científica, por causa de sua extensiva possibilidade de uso (ANGELO; JORGE, 2007; DE ARAÚJO *et al.*, 2021; MANACH *et al.*, 2004). Os compostos fenólicos possuem estruturas bem variadas, abrangendo estruturas químicas simples e complexas. Por definição, possuem ao menos um anel aromático e um hidrogênio do anel substituído por um grupo OH. Devido a estrutura química, são compostos altamente reativos, podendo formar pontes de hidrogênio facilitando a ligação com proteínas, e complexação com metais formando quelatos metálicos (SIMÕES *et al.*, 2007).

Nas folhas do café arábica já foram identificados diversos compostos fenólicos (Figura 26), relacionados a atividades biológicas diversas. Dos compostos fenólicos, podemos citar flavonoides como a rutina e quercetina; os ácidos fenólicos

como o ácido cafeico e ácido gálico e os ácidos clorogênicos, como o 5-CQA (AFFONSO *et al.*, 2016; DUANGJAI *et al.*, 2016; PATAY; BENCSIK; PAPP, 2016; ZUHAIR MOHD ZAIN, 2018) e xantonoides, como a mangiferina e isomangiferina (IMRAN *et al.*, 2017; PATAY; BENCSIK; PAPP, 2016; TREVISAN *et al.*, 2016).

A mangiferina exerce efeitos citoprotetores, atuando na prevenção de doenças degenerativas como aterosclerose, câncer, diabetes e obesidade (IMRAN *et al.*, 2017). Também demonstrou ser um agente potencial para cicatrização em ratos diabéticos, atividade antialérgica e antigenotóxica (IMRAN *et al.*, 2017; TAKEDA *et al.*, 2016; TREVISAN *et al.*, 2016). Esse composto tem ganhado destaque devido a presença de maiores quantidades nas folhas, em comparação ao grão de café (TREVISAN *et al.*, 2016).

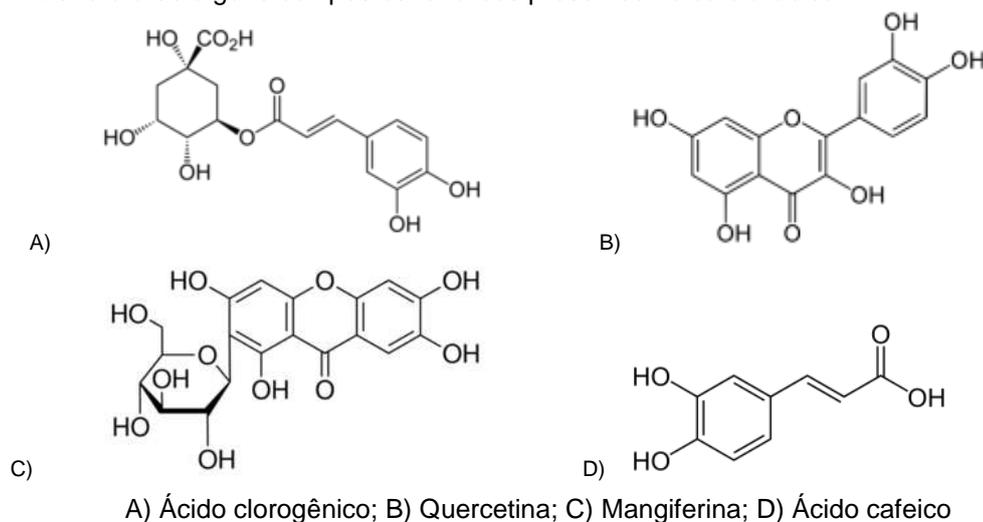
Diversos fatores podem influenciar a quantidade de compostos fenólicos na planta do café, como a intensidade da luz incidida sobre ela, região de crescimento, variedades dentro da espécie, idade das folhas, predadores existentes, entre outros (ALVES *et al.*, 2021; BATISTA *et al.*, 2021; CAMPA *et al.*, 2017; SALGADO *et al.*, 2008). Durante o ano, a quantidade de compostos fenólicos é alterada, as folhas colhidas em novembro demonstraram apresentar menos metabólitos que as demais coletas do ano de 2016 (SOUARD *et al.*, 2018). O conteúdo fenólico total em folhas jovens, independente de produção de fruto ou não na planta, é maior comparado às folhas maduras. Folhas jovens necessitam de compostos fenólicos para sua defesa, já que o tecido é do tipo não lignificado (SALGADO *et al.*, 2008). No momento da colheita, folhas jovens e maduras são arrancadas. Por esse estudo visar o aproveitamento de resíduos, a coleta das folhas foi orientada para ocorrer de forma aleatória, sem preferência de maturação, como ocorre durante a colheita do fruto.

Nossos resultados sugerem que as folhas de plantas que possuem frutos em fase de enchimento do endosperma possuem maiores quantidades de compostos fenólicos totais quando comparado a plantas que possuem o fruto maduro. Um outro estudo avaliou a quantidade de compostos fenólicos das folhas durante o amadurecimento do grão, entretanto os autores obtiveram maiores conteúdos de fenólicos em frutos maduros. Também verificaram, que independente do grau de maturação do fruto, folhas jovens possuem maiores conteúdos quando comparadas a folhas maduras (SALGADO *et al.*, 2008).

A altitude é outro fator que influencia na composição química das plantas. A quantidade de compostos fenólicos, como a mangiferina, demonstra correlação

positiva com a altitude de cultivo (CAMPA *et al.*, 2012). As fazendas estavam submetidas a faixas de atitudes distintas, que aparentemente não demonstraram influenciar de forma determinante na quantidade dos compostos fenólicos totais. É importante salientar também que cada variedade dentro da espécie *Coffea arabica* apresenta alterações específicas no doseamento de compostos fenólicos totais, frente às condições do ambiente em que se encontram (BATISTA *et al.*, 2021).

**Figura 24:** Estrutura de alguns compostos fenólicos presentes no café arábica.



Para determinação da atividade antioxidante, temos os métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos são baseados em cinética química, através da reação entre o oxidante e uma sonda oxidável. Como vantagens, é possível citar a possibilidade de uso de membranas biológicas (biorrelevantes) e maior especificidade, porém esse método exige experiência em cinética química por parte do analista sendo uma reação tempo dependente. Os métodos indiretos são métodos simples e de fácil execução tendo mecanismo de ação baseado na óxido-redução, através da reação entre sonda oxidante e os elétrons do antioxidante. Como limitações, é possível citar a não especificidade, além disso não são biorrelevantes. Nesse estudo, foram empregados métodos indiretos de determinação. É importante salientar que não existe nenhum método simples, universal que mensure quantitativamente e com robustez, para uma avaliação satisfatória do poder antioxidante de amostras, é necessário levar em consideração onde esta amostra será empregada e submetê-la a diferentes avaliações, com diferentes mecanismos de ação. Devido a paralisação decorrente da pandemia da COVID-19, não foi possível

incluir testes diretos para complementação do perfil antioxidante das amostras avaliadas, como estava previsto no projeto inicial.

A cafeína, outro composto de interesse, pertence ao grupo das metilxantinas, e são compostos sintetizados a partir de bases púricas possuindo caráter anfótero, ou seja, podem se comportar como ácidos ou bases. (SIMÕES *et al.*, 2007). A biossíntese da cafeína ocorre principalmente nos tecidos jovens, como botões florais, folhas jovens e endosperma. Conforme os frutos crescem a expressão de genes envolvidos na síntese aumenta nesses tecidos não sendo verificado migração da cafeína do pericarpo para as sementes (ASHIHARA; KATO; CROZIER, 2011; FUJIMORI; ASHIHARA, 1994). A rota de degradação da cafeína em teofilina é uma reação lenta no *Coffea arabica*, por isso o acúmulo de cafeína nos tecidos da planta. Além disso, os tecidos totalmente amadurecidos, deixam de expressar tais genes abundantes nas primeiras fases de desenvolvimento. Por isso, folhas jovens possuem maior teor de cafeína em comparação a folhas maduras (ASHIHARA; KATO; CROZIER, 2011; FUJIMORI; ASHIHARA, 1994).

A quantidade de cafeína aumenta durante a expansão do endosperma, permanecendo constante durante a etapa de maturação do fruto (DE CASTRO; MARRACCINI, 2006). Entretanto, nesse estudo, a completa maturação do fruto pareceu influenciar de forma positiva a concentração de cafeína nas folhas da planta, fatores adicionais podem estar envolvidos. Maiores quantidades de cafeína são encontradas em plantas parcialmente protegidas da luz e com maior disponibilidade de nitrogênio no solo (FUJIMORI; ASHIHARA, 1994; POMPELLI *et al.*, 2013). Fatores como, nutrientes do solo, chuva, estresse por pragas, altitude também influenciam no conteúdo de cafeína (ASHIHARA; KATO; CROZIER, 2011; CIARAMELLI; PALMIOLI; AIROLDI, 2019; DADO; ASRESAHEGN; GOROYA, 2019; MARÍN-GARZA *et al.*, 2018; OLECHNO *et al.*, 2021).

No corpo humano a cafeína é metabolizada em teobromina, teofilina e paraxantina (PATAY; BENCSIK; PAPP, 2016) com efeitos diversos. A nível celular, os efeitos fisiológicos das metilxantinas são atribuídos principalmente a atuação na modulação do receptor de adenosina, inibição da fosfodiesterase, regulação do nível de cálcio e modulação do receptor de ácido gama-aminobutírico, também conhecido como GABA (do inglês *Gamma-Amino Butyric Acid*) (FREDHOLM, 2011).

Já foi demonstrada atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer, no combate a Alzheimer e Parkinson, entre outros. (BRAGUINI *et al.*, 2018; CHEN, *et al.*,

2014; CHIANG *et al.*, 2014; CROTTY *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2009; MAUGERI *et al.*, 2018; ONTAWONG *et al.*, 2019). Na pele, induziu apoptose de queratinócitos danificados por luz ultravioleta e auxiliou na microcirculação, reduzindo inchaços (CHOI *et al.*, 2016; SIMÕES *et al.*, 2007). Cafeína e seus metabólitos teobromina e xantina previnem a oxidação lipídica através da inibição da produção de radicais livres, incluindo radical hidroxila, radical peroxila e oxigênio singlete (AZAM *et al.*, 2003; BRAGUINI *et al.*, 2018; ONTAWONG *et al.*, 2019).

Entretanto, seu consumo em excesso pode ocasionar distúrbios gastrointestinais, ansiedade, hipertensão, palpitações, insônia, tremor, dormência, espasmos musculares, dor de cabeça, aborto, entre outros (ASHIHARA; CROZIER, 2001; PATAY *et al.*, 2017). Devido ao mecanismo de ação de antagonismo dos receptores de adenosina, estudos demonstram atividade pró-convulsivante em casos de epilepsia, sendo a disfunção de adenosina uma característica patológica da epilepsia, contribuindo para a geração e disseminação das crises. O impacto das metilxantinas cafeína e teofilina nas convulsões e na excitotoxicidade depende do momento, da dose, e da frequência de uso (FREDHOLM, 2011).

Estudos comparativos entre a porcentagem de cafeína (%) contida nas folhas em relação ao grão de café, apresentam diferentes conclusões. No estudo de Dado, Asresahegn e Goraya (2019) realizaram avaliação do teor do grão verde de *Coffea arabica* e das folhas maduras retiradas do mesmo galho e obtiveram que o teor do grão foi superior a das folhas com 73,44±1,34% a 77,31±1,54% de diferença. Outro estudo, entre o grão verde e folhas de *Coffea arabica*, demonstrou que o teor do grão foi superior ao da folha de 11,7 a 30,6%, exceto na variedade *Laurina* que o conteúdo foi 13,9% maior nas folhas comparado ao teor do grão (OESTREICH-JANZEN, 2010). Em geral, as folhas de café arábica podem ser utilizadas como insumo na preparação de bebidas com menor teor de cafeína, como refrigerantes, chás e sucos, devido à presença de menor quantidade de cafeína em relação ao grão.

Os extratos com menor conteúdo de cafeína apresentaram atividade citostática frente a linhagem de glioblastoma. Entretanto, vários estudos demonstram que esse composto está envolvido na atividade de inibição de migração celular em linhagens celulares de glioma e efeito anti-carcinogênico em glioblastoma, por diminuição da proliferação celular e modulação de fatores do processo hipóxico e angiogênico (CHEN *et al.*, 2014; MAUGERI *et al.*, 2018).

As metilxantinas em geral têm seu uso investigado para o tratamento de câncer e doenças neurodegenerativas, estando correlacionados a atividade neuroprotetora (CROTTY *et al.*, 2020), atividade anti-inflamatória (OHTA; SITKOVSKY, 2011) produção do fluido cerebrospinal (HAN *et al.*, 2009), o que pode promover a limpeza ou diluição de neurotoxinas do cérebro, diminuindo o risco de gliomas. No glioblastoma especificamente, as metilxantinas atuam através da inibição da fosfodiesterase, que se encontra desregulada nessas células (OHTA; SITKOVSKY, 2011), na indução de morte celular por ativação da caspase 3 e regulação da proliferação celular pela inibição da via PI3K/PKB-mTOR (do inglês, *phosphoinositide 3-kinases/protein kinase B - mechanistic target of rapamycin*) uma via de sinalização intracelular importante na regulação do ciclo celular.

Um estudo prospectivo de coorte, encontrou uma relação inversa entre o consumo de chá verde e preto e o risco de glioma, como também uma correlação inversa sugestiva com o consumo de café (CREED, 2020), apesar de que nesse estudo o papel das metilxantinas na prevenção do glioma não foi estabelecido.

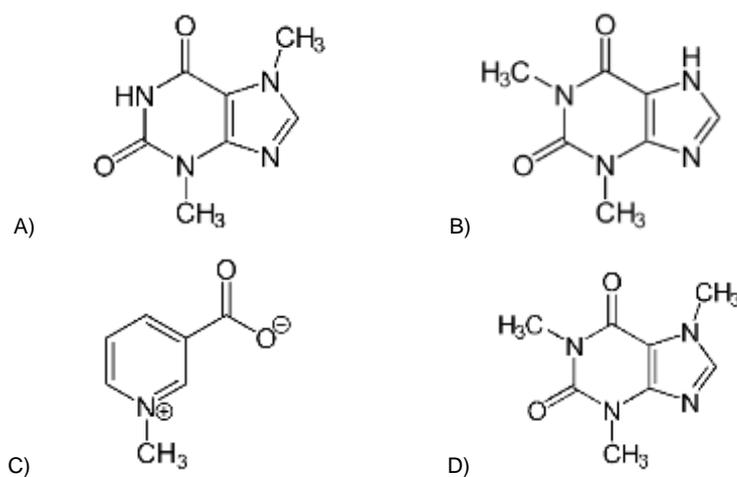
Outras metilxantinas além da cafeína, como a teofilina, trigonelina, teobromina, paraxantina são encontradas no grão e folhas de café (FUJIMORI; ASHIHARA, 1994; KARTAWIDJAJA, 2020) e podem também estar correlacionadas com a atividade citostática. A teofilina (1,3-dimetilxantina) demonstrou diminuição da metástase, atividade anti-inflamatória e diminuição da resistência das células neoplásicas frente a terapia medicamentosa. A teofilina também atua como um imunomodulador devido à ativação da proteína histona desacetilase 2 (HDAC-2), que desempenha um papel importante na expressão gênica dentro das células (FREDHOLM, 2011; OHTA; SITKOVSKY, 2011). Em células HeLa e MCF-7, a teofilina faz mediação do *splicing* alternativo através da inibição do fator de *splicing* rico em serina / arginina 3 e seus genes-alvo, o que acarreta em alterações epigenéticas, como a mudança da isoforma de p53 contribuindo para a diminuição da progressão do tumor (CHANG *et al.*, 2017).

A teobromina também regula a proliferação celular via inibição da regulação de sinal de quinase extracelular e morte celular pela ativação da proteína que atua na regulação do processo de autodestruição (JNK, do inglês c-Jun N-terminal cinase) e das proteínas quinases ativadas por mitogênio p38 (SUGIMOTO *et al.*, 2014). Porém, devido à ausência de um grupo metil, a teobromina possui uma atividade metabólica modesta, sendo limitada em sua distribuição no sistema nervoso central.

Particularmente, a cafeína pode induzir apoptose e parada do ciclo celular por meio de diferentes mecanismos, como o aumento da expressão de FoxO1 (do inglês, *the forkhead box class O*) e seu alvo pró-apoptótico Bim (BCL2L11) (SUN *et al.*, 2016), pela inibição da catepsina B, entre outros. (PÉREZ-PÉREZ *et al.*, 2019) Em células de glioma diminui a migração celular através da ativação da via do complexo de adesão ROCK (do inglês, *rho-associated protein kinase*) (CHEN *et al.*, 2014).

A atividade citostática do extrato de folhas de café provavelmente se deve ao complexo de metilxantinas (Figura 27) existentes, e seus possíveis efeitos sinérgicos. Estudos posteriores podem determinar a possível correlação da atividade citostática frente a linhagem de glioblastoma, realizando doseamento de outros compostos nitrogenados presentes nas folhas do café, que não foram doseadas por esse estudo.

**Figura 25:** Estruturas químicas de alguns dos alcaloides encontrados no café.



A) Teobromina; B) Teofilina; C) Trigonelina; D) Cafeína

É importante salientar que o glioblastoma é o tipo mais refratário e comum entre os gliomas, representando 56,6% dos casos. Os tratamentos atuais, como quimioterapia (Temozolamida), radioterapia e cirurgia não são eficientes, com a maioria dos pacientes tendo sobrevivido de um ano após iniciar o tratamento (Feng; Liu, 2021). Nesse contexto, é de suma importância o desenvolvimento de terapias adjuvantes que possam impedir a progressão do tumor e a destruição das células tumorais. Mais estudos de avaliação da atividade de migração celular dos extratos frente as linhagens celulares de glioma e glioblastoma, bem como avaliações de

atividade antiproliferativa em outras linhagens celulares, poderão elucidar a atividade inibitória e de contenção da progressão do extrato de folhas de café frente ao glioblastoma.

Através dos dados do teste antiproliferativo, a maior concentração não citostática obtida (15µg/mL) foi utilizada para avaliação da influência na migração celular de queratinócitos e fibroblastos. O teste foi motivado pelos estudos já existentes que demonstram o uso potencial dos compostos com atividade antioxidante na cicatrização, (DAS; BEHERA; PRAMANIK, 2017; DE MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009) e também pela atividade cicatrizante demonstrada pelos compostos isolados presentes na folha do café arábica (NAVEED *et al*, 2018). Entretanto, nesse estudo, não foi evidenciado estímulo de migração celular das células HaCat e HGF pelos extratos utilizados. A cicatrização de feridas é um processo complexo que se inicia logo após a injúria tecidual e pode ser dividido, quanto a eventos bioquímicos e celulares, em três estágios: inflamação, proliferação (e migração celular) e remodelação. Na primeira etapa, inflamação, inicia-se a cascata de componentes (citocinas, fatores de crescimento, plaquetas), quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos, entre outros, gerando radicais livres. Apesar da fase de inflamação ser importante para o sucesso do processo de cicatrização, o distúrbio das reações de óxido-redução resulta num nível persistente de estresse oxidativo e pode estar envolvido com inflamações crônicas, danos teciduais e ao DNA, peroxidação lipídica e inativação enzimática. Nesse contexto, o processo de cicatrização de feridas pode ser auxiliado através da administração tópica de moléculas antioxidantes que podem controlar o estresse oxidativo (AFFONSO *et al.*, 2016; DAS; BEHERA; PRAMANIK, 2017; GONZALEZ *et al.*, 2016). Também, estudos demonstram que as folhas de café apresentaram regulação positiva para a expressão gênica do colágeno, frente ao dano induzido por radiação UV-B (WU *et al.*, 2017). Estudos complementares podem evidenciar melhor o papel dos componentes das folhas no processo de cicatrização de feridas.

Esse estudo demonstrou que as condições de cultivo da planta, de coleta e métodos de extração empregados podem influenciar na composição dos extratos e conseqüentemente nas atividades biológicas, dando destaque aos resultados obtidos para os extratos PR1 e PR2 (método 2 de extração) que apresentaram diferenças estatísticas em todos os testes realizados, mesmo as amostras sendo coletadas na mesma área de cultivo e com diferença de cerca de 20 dias. Em relação ao método

1, o extrato DCM demonstrou potencial antiproliferativo, e as frações AC e ET demonstraram maior atividade antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos totais, entretanto visando o desenvolvimento de um produto farmacêutico, o método 2, demonstrou ser mais adequado, considerando os solventes e o processo de extração mais rápido. Nesse método, as amostras PR1, MG e SP demonstraram atividade citostática seletiva frente a linhagem U-251, atividade antioxidante e maior doseamento de compostos fenólicos totais. Os outros dois extratos, ES e PR2, também devem ser melhor investigados, já que apresentaram maior conteúdo de cafeína, um composto químico importante e com diversas atividades biológicas elucidadas.

Esse trabalho trata-se de um estudo prospectivo sobre a potencialidade do aproveitamento das folhas de café arábica. A partir dos resultados de atividades biológicas demonstradas neste trabalho, mais estudos serão necessários para estabelecer as possibilidades de aproveitamento das folhas desta cultura, que demonstram serem diversas, pela presença de compostos fenólicos e da cafeína. As atividades antioxidante e atividade citostática seletiva (U-251) permitirão avançar na compreensão do envolvimento destes extratos e seus componentes para o controle de doenças causadas pelo estresse oxidativo, no tratamento adjuvante do câncer, aplicação em cosméticos, na indústria alimentícia, entre outros.

Como perspectivas destaca-se:

- ✚ Doseamento da mangiferina nas amostras estudadas.
- ✚ Comparação do perfil químico do grão e folhas de café arábica.
- ✚ Avaliação da influência das variedades ou cultivares dentro da espécie *Coffea arabica* sobre a atividade biológica.
- ✚ Realização de testes utilizando outras metodologias para determinação do perfil antioxidante dos extratos.
- ✚ Avaliação da atividade antiproliferativa frente a outras linhagens celulares de glioma e glioblastoma.
- ✚ Realização de testes de migração celular com linhagens de glioma e glioblastoma, para avaliação da possível contenção sobre a metástase desses tumores.
- ✚ Identificação dos compostos químicos que estão correlacionadas a atividade citostática seletiva do extrato de folhas de *Coffea arabica*.
- ✚ Avaliação do efeito dos extratos frente a cicatrização de feridas na fase inflamatória e na estimulação de colágeno e de fatores de crescimento.

- ✚ Realização de testes de toxicidade dos extratos de folhas de café arábica.
- ✚ Associação dos extratos de folhas de *Coffea arabica* a outras plantas como a *Fredericia chica* (*Arrabideae chica* Verlot), objeto de estudo do nosso grupo.

## 7. Conclusão

A utilização das folhas consiste numa alternativa para melhor aproveitamento de resíduos da cultura do café, e complementação de renda dos pequenos e médios produtores rurais. As possibilidades de aplicação das folhas são diversas, devido a presença de compostos fenólicos e da cafeína em sua composição química. Os extratos de folhas do café apresentam atividade antioxidante e atividade citostática seletiva frente a linhagem U-251 (glioblastoma). Como potenciais aplicações de acordo com os compostos verificados, destacamos o uso tópico como cosmético, uso em medicamentos, componente adjuvante em formulações, fabricação de bebidas como chás e refrigerantes, produtos de higiene pessoal e como antioxidante em alimentos. Em feiras populares de produtos agropecuários, também podem ser comercializadas para uso em chás e outras bebidas pela população brasileira. Além disso, as folhas de café arábica constituem uma fonte para extração de compostos como a cafeína, que é utilizada pela indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica.

## 8. Referências

ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA. *In*: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO: ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA. Brasília, n. 4, 2021. p. 1–89.

AFFONSO, Regina Celis Lopes *et al.* Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and the Effect of the Aqueous Extract of Coffee ( *Coffea arabica* L.) Bean Residual Press Cake on the Skin Wound Healing . **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Florianópolis, v. 2016, p. 1–10, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/1923754>

ALVES, André Luíz *et al.* Antioxidant Activity and Stable Free Radicals in Robusta Green Coffee Genotypes. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 4, p. 37312–37330, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-275>

ALVES, Rita C. *et al.* Antiradical activity, phenolics profile, and hydroxymethylfurfural in espresso coffee: Influence of technological factors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, D.C, v. 58, n. 23, p. 12221–12229, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf1031229>

ANGELO, Priscila Milene; JORGE, Neuza. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ASHIHARA, Hiroshi; CROZIER, Alan. Caffeine: A well known but little mentioned compound in plant science. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 407–413, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02055-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02055-6)

ASHIHARA, Hiroshi; KATO, Misako; CROZIER, Alan. Distribution, biosynthesis and catabolism of methylxanthines in plants. **Handbook of Experimental Pharmacology**, Deli, v. 200, p. 11–31, 2011. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2_2)

AULTON, Michael E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. v. 4

AZAM, Sonish *et al.* Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Medical Science Monitor**, New York, v. 9, n. 9, p. 325–331, 2003.

BATISTA, Eunice R. *et al.* Increased atmospheric co2 combined with local climatic variation affects phenolics and spider mite populations in coffee trees. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 3, p. 1–14, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120190696>

BOWE, W. P.; PUGLIESE, S. COSMETIC BENEFITS OF NATURAL INGREDIENTS. **Journal of drugs and dermatology**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 1019–1027, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1145/2634317.2634336>

BRAGUINI, W. L. *et al.* Lipid profile and activity of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in mice treated with hesperidin and coffee. **PharmacologyOnline**, [S. l.], v. 1, p. 15–23, 2018.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, Amsterdam, n. 4, 1995. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

CAMPA, Claudine *et al.* A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. **Annals of botany**, Oxford, v. 110, n. 3, p. 595–613, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aob/mcs119>

CAMPA, Claudine *et al.* Juvenile coffee leaves acclimated to low light are unable to cope with a moderate light increase. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, p. 1126, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01126>

CANNELL, M. G. R. Physiology of the Coffee Crop. **Coffee**, [s. l.], p. 108–134, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6657-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6657-1_5)

CAPELLO, Christian; FISCHER, Ulrich; HUNGERBÜHLER, Konrad. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 9, n. 9, p. 927–993, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b617536h>

CARVALHO, Carlos Henrique Siqueira de. **Cultivares de café**. Brasília: EMBRAPA, 2007.

CAVATTE, P C *et al.* Functional analysis of the relative growth rate, chemical composition, construction and maintenance costs, and the payback time of *Coffea arabica* L. leaves in response to light and water availability. **Journal of Experimental Botany**, F.M. Damatta, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil, v. 63, n. 8, p. 3071–3082, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/ers027> LK -  
<http://bj7rx7bn7b.search.serialssolutions.com?sid=EMBASE&issn=00220957&id=doi:10.1093%2Fjxb%2Fers027&atitle=Functional+analysis+of+the+relative+growth+rate%2C+chemical+composition%2C+construction+and+maintenance+costs%2C+and+the+payback+time+of+Coffea+arabica+L.+leaves+in+response+to+light+and+water+availability&stitle=J.+Exp.+Bot.&title=Journal+of+Experimental+Botany&volume=63&issue=8&spage=3071&epage=3082&aulast=Cavatte&aufirst=Paulo+C.&auinit=P.C.&aufull=Cavatte+P.C.&>

CAVIN, C. *et al.* Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 40, n. 8, p. 1155–1163, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00029-7](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00029-7)

CECAFÉ. **Conselho dos Exportadores de Café do Brasil**. São Paulo, 2021. Disponível em: <https://www.cecafe.com.br/sobre-o-cafe/producao/>. Acesso em: 20 ago. 2021.

CHANG, Yung-Lung *et al.* Theophylline exhibits anti-cancer activity via suppressing SRSF3 in cervical and breast cancer cell lines. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 60, p.

101461–101474, 2017. Disponível em: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/). Acesso em: 19 jul. 2021.

CHEN, Jin-Cherng *et al.* Tetrandrine and Caffeine Modulated Cell Cycle and Increased Glioma Cell Death via Caspase-Dependent and Caspase-Independent Apoptosis Pathways. **Nutrition and Cancer**, Abingdon-on-Thames, v. 66, n. 4, p. 700-706, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01635581.2014.902974>

CHEN, Xiumin. A review on coffee leaves: Phytochemicals, bioactivities and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Abingdon-on-Thames, v. 59, n. 6, p. 1008–1025, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546667>

CHEN, Xiu Min; MA, Zhili; KITTS, David D. Effects of processing method and age of leaves on phytochemical profiles and bioactivity of coffee leaves. **Food Chemistry**, Barking, v. 249, p. 143–153, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.073>

CHEN, Ying *et al.* Caffeine inhibits migration in glioma cells through the ROCK-FAK pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, Englewood Cliffs, v. 33, n. 6, p. 1888–1898, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000362966>

CHIANG, Hsiu Mei *et al.* Role of Coffea arabica Extract and Related Compounds in Preventing Photoaging and Photodamage of the Skin. *In: COFFEE IN HEALTH AND DISEASE PREVENTION*. San Diego, [s. n.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00058-9>

CHOI, Bogyong; KOH, Eunmi. Spent coffee as a rich source of antioxidative compounds. **Food Science and Biotechnology**, Tokyo, v. 26, n. 4, p. 921–927, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0144-9>

CHOI, Hyeon Son *et al.* Topical application of spent coffee ground extracts protects skin from ultraviolet B-induced photoaging in hairless mice. **Photochemical and Photobiological Sciences**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 779–790, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c6pp00045b>

CIARAMELLI, Carlotta; PALMIOLI, Alessandro; AIROLDI, Cristina. Coffee variety, origin and extraction procedure: Implications for coffee beneficial effects on human health. **Food Chemistry**, Tokyo, v. 278, p. 47–55, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.063>

COSTA, Anabela S.G. *et al.* Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 53, p. 350–357, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.006>

CROTTY, Grace F. *et al.* Association of caffeine and related analytes with resistance to Parkinson disease among LRRK2 mutation carriers: A metabolomic study. **Neurology**, Minneapolis, v. 95, n. 24, p. e3428–e3437, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010863>

DADO, Adane Tadesse; ASRESAHEGN, Yoseph Alresawum; GOROYA, Kusse Gudishe. Comparative study of caffeine content in beans and leaves of *Coffea arabica* using UV / Vis spectrophotometer. **International Journal of Physical Sciences** [S. l.], v. 14, n. 14, p. 171–176, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5897/IJPS2019.4814>

DAI, Jin; MUMPER, Russell J. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 10, p. 7313–7352, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>

DAMATTA, Fabio M *et al.* Ecophysiology of coffee growth and production. **Braz. J. Plant Physiol**, Londrina, v. 19, n. 4, p. 485–510, 2007.

DAMATTA, Fábio M *et al.* Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Braz. J. Plant Physiol**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 55–81, 2006.

DAS, Urmimala; BEHERA, Sudhanshu Shekhar; PRAMANIK, Krishna. Ethno-Herbal-Medico in Wound Repair: An Incisive Review. **Phytotherapy Research**, [S. l.], v. 31, n. 4, p. 579–590, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.5786>

DE ALMEIDA, Ricardo Farias *et al.* Nutraceutical compounds: Echinoids, flavonoids, xanthenes and caffeine identified and quantitated in the leaves of *Coffea arabica* trees from three regions of Brazil. **Food Research International**, Amsterdam, v. 115, p. 493–503, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.006>

DE ANDRADE, Jailson Bittencourt *et al.* Determinação de Cafeína em Bebidas Através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). **Química Nova**, São Paulo, n. 4., 1995.

DE ARAÚJO, Fábio Fernandes *et al.* Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 338, p. 127535, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535>

DE CASTRO, Renato D.; MARRACCINI, Pierre. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 175-199, 2006.

DE MENDONÇA, Ricardo José; COUTINHO-NETTO, Joaquim. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 257–262, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962009000300007>

DEL RIO, M. Jimenez *et al.* **Composition for enhancing brain activity. United States Patent US10537604 B2**. Concessão: 2020.

DUANGJAI, Acharaporn *et al.* Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. **Integrative Medicine Research**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p. 324–331, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.09.001>

DURÁN, Carlos A. A. *et al.* Coffee: General Aspects and its Use beyond Drink. **Revista Virtual de Química**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 107–134, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170010>

ECHEVERRIA, M.C.; NUTI, M. Valorisation of the Residues of Coffee Agro-industry: Perspectives and Limitations. **The Open Waste Management Journal**, Sharjah, v. 10, n. 1, p. 13–22, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1876400201710010013>

EMBRAPA CAFÉ Disponível em: <http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/consorcio/separador2/observatorio-do-cafe> Acesso em: setembro de 2021.

FARRIS, Patricia. Idebenone , green tea , and Coffeeberry ® extract : new and innovative antioxidants. **Dermatology Therapy**, Amsterdam, v. 20, n. 13, p. 322–329, 2007.

FISK, Whitney A. *et al.* The use of botanically derived agents for hyperpigmentation: A systematic review. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Amsterdam, v. 70, n. 2, p. 352–365, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2013.09.048>

FOUCHE, G. *et al.* In vitro anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 455–461, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.005>

FRANCA, Adriana S.; OLIVEIRA, Leandro S. Alternative Uses for Coffee Husks — a Solid Waste From Green Coffee Production. **Chemical, Biological and Environmental Engineering**, Corvallis, p. 21–24, 2009. Disponível em: [https://doi.org/10.1142/9789814295048\\_0005](https://doi.org/10.1142/9789814295048_0005)

FREDHOLM, Bertil B. **Methylxantines**, London, [s. n.], 2011. ISSN 01712004.v. 200 Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2_4)

FUJIMORI, Naoko; ASHIHARA, Hiroshi. Biosynthesis of theobromine and caffeine in developing leaves of *Coffea arabica*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 36, n. 6, p. 1359–1361, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89724-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89724-1)

GUERRA-GUIMARÃES, Leonor *et al.* Proteomic analysis of apoplastic fluid of *Coffea arabica* leaves highlights novel biomarkers for resistance against *Hemileia vastatrix*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 1, p. 478, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00478>

GUPTA, Saurabh; SAINI, Mamta; SINGH, Thakur Gurjeet. Updated pharmacological, clinical and phytochemical prospects of green coffee : A review. **Plant Archives**, Etawah, v. 20, n. 1, p. 3820–3827, 2020.

HAN, Myoung Eun *et al.* Regulation of cerebrospinal fluid production by caffeine consumption. **BMC Neuroscience**, London, v. 10, p. 110, 2009. Disponível em:

<https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-110>

HIRAKAWA, Nobuhiro *et al.* Anti-invasive activity of niacin and trigonelline against cancer cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 69, n. 3, p. 653–658, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1271/bbb.69.653>

HOLLINGSWORTH, Robert G.; ARMSTRONG, John W.; CAMPBELL, Earl. Caffeine as a repellent for slugs and snails. **Nature**, London, v. 417, n. 6892, p. 915–916, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/417915a>

HUANG, Chih-Yang *et al.* GABA tea ameliorates cerebral cortex apoptosis and autophagy in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of functional foods**, Amsterdam, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.11.020>

IMRAN, Muhammad *et al.* Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders. **Lipids in Health and Disease**, London, v. 16, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0449-y>

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA Disponível em: <https://bdmep.inmet.gov.br/> Acesso em: Novembro de 2021.

IRIONDO-DEHOND, Amaia *et al.* Coffee silverskin extract protects against accelerated aging caused by oxidative agents. **Molecules**, Basel, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules21060721>

IVAMOTO, S T *et al.* Transcriptome analysis of leaves, flowers and fruits perisperm of *Coffea arabica* L. Reveals the differential expression of genes involved in raffinose biosynthesis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169595> LK - <http://bj7rx7bn7b.search.serialssolutions.com?sid=EMBASE&issn=19326203&id=doi:10.1371%2Fjournal.pone.0169595&atitle=Transcriptome+analysis+of+leaves%2C+flowers+and+fruits+perisperm+of+Coffea+arabica+L.+Reveals+the+differential+expression+of+genes+involved+in+raffinose+biosynthesis&stitle=PLoS+ONE&title=PLoS+ONE&volume=12&issue=1&spage=&epage=&aulast=Ivamoto&aufirst=Suzana+Tiemi&aunit=S.T.&aufull=Ivamoto+S.T.&coden=POLNC&isbn=&pages=-&date=2017&aunit1=S&aunit>

JOSEPH, Jan *et al.* The neurotransmitter  $\gamma$ -aminobutyric acid is an inhibitory regulator for the migration of SW 480 colon carcinoma cells. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 62, n. 22, p. 6467–6469, 2002.

KENCONOJATI, H *et al.* In vitro study of an ethanolic extract of coffee leaves to inhibit freshwater pathogenic bacteria. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, Bristol, v. 236, p. 012082, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/236/1/012082>

KLINGEL, Tizian *et al.* A Review of Coffee By-Products Including Leaf ., **Foods**, Basel, v. 9, p. 1–20, 2020.

KOGURE, Akinori *et al.* Effects of caffeine on the uncoupling protein family in obese

yellow KK mice. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Oxford, v. 29, n. 5–6, p. 391–394, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03675.x>

LAMORDE, Mohammed *et al.* Medicinal plants used by traditional medicine practitioners for the treatment of HIV/AIDS and related conditions in Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 43–53, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.04.004>

LEDERER, M. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)90416-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)90416-9)

LEE, Kyung Jin; CHOI, Jea Ho; JEONG, Hye Gwang. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 45, n. 11, p. 2118–2125, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.05.010>

MISHRA, Manoj K. Genetic Resources and Breeding of Coffee (*Coffea* spp.). *In*: AL-KHAYRI J., JAIN S., Johnson D. (org.). **Advances in Plant Breeding Strategies: Nut and Beverage Crops**. London: Springer, 2019. v. 21, p. 1–9. *E-book*.

MANACH, Claudine *et al.* Polyphenols: Food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, Oxford, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>

MARCHEFAVE, Gustavo G. *et al.* Experimental mixture design solvent effects on pigment extraction and antioxidant activity from *Coffea arabica* L. leaves. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 146, p. 713–721, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.01.073>

MARÍN-GARZA, Tania *et al.* Bioactive composition of coffee leaves during an annual cycle. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Chapingo, v. 41, n. 4, p. 365–372, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.4.365-372>

MARTINS, A L. **História do café**. São Paulo: Editora Contexto, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1108/00907321211228336>

MARTINS, Edson Júnior *et al.* A Relação entre a variação do preço da saca de café e o desempenho dos pequenos produtores de São João do Manhuaçu-MG. *In*: 2019, Manhuaçu. **Anais do seminário científico do UNIFACIG V**. Manhuaçu: [s. n.], 2019. p. 1–12.

MARTINS, Samuel C.V. *et al.* In high-light-acclimated coffee plants the metabolic machinery is adjusted to avoid oxidative stress rather than to benefit from extra light enhancement in photosynthetic yield. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 4, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094862>

MATIELLO, J B; DIAS, J R; FRANCO, Lucas. Produtividade e custos na produção de café orgânico em região de altitude elevada no sul de Minas *In: 2017, Anais do Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras*. Poços de Caldas: n. 43, 2017. p.1.

MAUGERI, Grazia *et al.* Caffeine Effect on HIFs/VEGF Pathway in Human Glioblastoma Cells Exposed to Hypoxia. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 18, n. 10, p. 1432–1439, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1871520618666180209151750>

MAUREL, Jean-Claude *et al.* **Diglyceride and sterol based organometallic complexes and pharmaceutical compositions and dietetic products containing them. US Patent US-6129924-A**. Concessão: 1996.

MONKS, Anne *et al.* Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 83, n. 11, p. 757–766, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jnci/83.11.757>

MOREIRA, Mariana Dias *et al.* Solid coffee waste as alternative to produce carotenoids with antioxidant and antimicrobial activities. **Waste Management**, Amsterdam, v. 82, p. 93–99, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.10.017>

MURATA, K.; YASUDA, H. **Anti-helicobacter pylori and food and drink for anti-gastritis, and gastric and duodenal ulcer, containing the same**. Concessão: 1997.

MURTHY, Pushpa S.; MADHAVA NAIDU, M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 66, p. 45–58, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.06.005>

NAGASAMPAGI, B. A. *et al.* Sterols of coffee. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 10, n. 5, p. 1101–1107, 1971. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89946-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89946-X)

NAVEED, Muhammad *et al.* Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 67-74, 2018.

OESTREICH-JANZEN, S. Chemistry of coffee. *In: COMPREHENSIVE NATURAL PRODUCTS II: CHEMISTRY AND BIOLOGY*. London, [s. n.], 2010. v. 3, p. 1085–1117. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00708-5>

OHTA, Akio; SITKOVSKY, Michail. Methylxanthines, Inflammation, and Cancer: Fundamental Mechanisms Akio Ohta and Michail Sitkovsky Contents. *In: HANDBOOK OF EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY*. London, [s. n.], 2011. p. 469–481. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2_19)

OLECHNO, Ewa *et al.* Influence of Various Factors on Caffeine Content in Coffee Brews. **Foods**. Basel, v. 10, n. 1208, p. 29, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10061208>. Acesso em: 30 jun. 2021.

ONTAWONG, Atcharaporn *et al.* Lipid-lowering effects of Coffea arabica pulp aqueous extract in Caco-2 cells and hypercholesterolemic rats. **Phytomedicine**, Amsterdam, v. 52, p. 187–197, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.06.021>

PATAY, Éva Brigitta *et al.* Comparative phytochemical analysis of Coffea benghalensis Roxb Ex Schult, Coffea arabica L. and Coffea liberica Hiern. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Haikou, v. 11, n. 8, p. 480, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/1995-7645.240084>

PATAY, Eva Brigitta *et al.* Coffea arabica: A Plant with Rich Content in Caffeine. **The Question of Caffeine**, London, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.68149>

PATAY, Éva Brigitta; BENCSIK, Tímea; PAPP, Nóra. Phytochemical overview and medicinal importance of Coffea species from the past until now. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Haikou, v. 9, n. 12, p. 1127–1135, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.11.008>

PEREIRA, Sérgio Parreiras *et al.* Crescimento, produtividade e bienalidade do cafeeiro em função do espaçamento de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 2, p. 152–160, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000200006>

PÉREZ-PÉREZ, Daniel *et al.* Methylxanthines: Potential Therapeutic Agents for Glioblastoma. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 12, n. 130, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph12030130>. Acesso em: 28 jul. 2021.

POMPELLI, Marcelo F *et al.* The effect of light and nitrogen availability on the caffeine, theophylline and allantoin contents in the leaves of Coffea arabica L. **Aims Environmental Science**, Springfield, v. 1, p. 1–11, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3934/environsci.2013.1.1>

PRABHAKAR, Pranav Kumar; DOBLE, Mukesh. Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes. **Phytomedicine**, Amsterdam, v. 16, n. 12, p. 1119–1126, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.05.021>

PRIOR, Ronald L.; WU, Xianli; SCHAICH, Karen. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

QUIJANO-CÉLIS, Clara; PIEDRAHITA, David; PINO, Jorge A. Essential oil of Coffea arabica L. var. Castillo leaves from Colombia. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, Abingdon-on-Thames, v. 18, n. 2, p. 486–488, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.985734>

RATANAMARNO, Sujitra; SURBKAR, Sunate. Caffeine and catechins in fresh coffee leaf (Coffea arabica) and coffee leaf tea. **Maejo Int. J. Sci. Technol.** Chiang Mai, n. 3,

2017.

ROSS, Ivan A. Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses. **Medicinal Plants of the World**, Totowa v. 30, 2005. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-59259-887-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-887-8_8)

SALGADO, Paula Rodrigues *et al.* Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. **Scientia Agricola**, São Paulo, v. 65, n. 4, p. 354–359, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000400005>

SCHMID, Kathrin *et al.* Traditional use of herbal remedies in livestock by farmers in 3 swiss cantons (Aargau, Zurich, Schaffhausen). **Forschende Komplementarmedizin**, Basel, v. 19, n. 3, p. 125–136, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000339336>

SEGHE TO, Luciana *et al.* Antioxidant extracts of coffee leaves and its active ingredient 5-caffeoylquinic acid reduce chemically-induced inflammation in mice. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 126, p. 48–57, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.027>

SEGHE TO, Luciana. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DAS FOLHAS DE CAFÉ ( *Coffea arabica* L .) AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI- INFLAMATÓRIA TÓPICA DAS FOLHAS DE CAFÉ ( *Coffea arabica* L .). [s. l.], p. 0–107, 2017.

SILVEIRA, J. S. M; CARVALHO, C H S de. Efeito da época de irrigação sobre o crescimento do ramo plagiotrópico e da longevidade foliar do café conilon. *In:* , 1996, Águas de Lindóia, SP. **Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras.Trabalhos apresentados**. Águas de Lindóia, SP: n. 22, 1996. p. 99.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre [s. n.], 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010005>

SITE DO CAFÉ. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://sitedocafe.com.br/loja/cha/chasnobres/cha-da-folha-de-cafe/>. Acesso em: Agosto de 2021.

SOUARD, Florence *et al.* Metabolomics fingerprint of coffee species determined by untargeted-profiling study using LC-HRMS. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 245, n. July 2017, p. 603–612, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.022>

SUÁREZ-QUIROZ, M. L. *et al.* Anti-Aspergillus activity of green coffee 5-O-caffeoyl quinic acid and its alkyl esters. **Microbial Pathogenesis**, Amsterdam, v. 61–62, p. 51–56, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.05.005>

SUGIMOTO, Naotoshi *et al.* Theobromine, the primary methylxantine found in *Theobroma cacao*, prevents malignant glioblastoma proliferation by negatively regulating phosphodiesterase-4, extracellular signal-regulated kinase, Akt/mammalian target of rapamycin kinase, and nuclear factor. **Nutrition and Cancer**. Philadelphia, v. 66, n.6, p. 419-423, 2014.

SUN, Fei *et al.* Caffeine-induced nuclear translocation of FoxO1 triggers Bim-mediated

apoptosis in human glioblastoma cells. **Tumor Biology**, London, v. 37, n. 3, p. 3417–3423, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4180-x>

TAKEDA, Tomoya *et al.* Mangiferin, a novel nuclear factor kappa B-inducing kinase inhibitor, suppresses metastasis and tumor growth in a mouse metastatic melanoma model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 306, p. 105–112, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.07.005>

TREUTTER, Dieter. Significance of flavonoids in plant resistance: A review. **Environmental Chemistry Letters**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 147–157, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10311-006-0068-8>

TREVISAN, Maria T.S. *et al.* Quantitation by HPLC-UV of Mangiferin and Isomangiferin in Coffee (*Coffea arabica*) Leaves from Brazil and Costa Rica After Solvent Extraction and Infusion. **Food Analytical Methods**, [s. l.], v. 9, n. 9, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0457-y>

VALARINI, Valdemar; BATAGLIA, Ondino Cleante; FAZUOLI, Luiz Carlos. Macronutrientes em folhas e frutos de cultivares de café arábica de porte baixo. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 661–672, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0006-87052005000400016>

VIZZOTO, Marcia; KROLOW, Ana Cristina; WEBER, Gisele Eva Bruch. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. **Embrapa Clima Temperado**, Pelotas, 2010. p. 16. Disponível em: <https://doi.org/10.5216/pat.v41i2.12571>

WOLDESENEBET, Addisu. **Nutritional composition , phytochemical screening , processing methods and Sensory attributes of a brew made from infusions of matured leaves of Arabica coffee tree consumed in Sidama, Kambata and Harar communities, Ethiopia.** 73 f. 2015. Addis Ababa, 2015. Disponível em: [http://213.55.95.56/bitstream/handle/123456789/1359/Addisu Woldesenbet.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://213.55.95.56/bitstream/handle/123456789/1359/Addisu%20Woldesenbet.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

WU, Po Yuan *et al.* Alleviation of ultraviolet B-induced photodamage by *Coffea arabica* extract in human skin fibroblasts and hairless mouse skin. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 4, p. 782, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18040782>

ZHAO, Wenfang *et al.* Study on Quality Components and Sleep- promoting Effect of GABA Black Tea. **Food and function**, Cambridge, v. 3, p. 10, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b000000x>

ZUHAIR MOHD ZAIN, Muhammad. Composition and Health Properties of Coffee Bean. **European Journal of Clinical and Biomedical Sciences**, New York, v. 3, n. 5, p. 97, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.11648/j.ejcb.20170305.13>

## **9. Anexos**

Anexo 1: Certidão de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**

**Cadastro nº A7FCAC1**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A7FCAC1**  
Usuário: **UNICAMP**  
CPF/CNPJ: **46.068.425/0001-33**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

**Espécie**

**Coffea arabica**

Título da Atividade: **AVALIAÇÃO IN VITRO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO EXTRATO DE FOLHAS DE CAFÉ (Coffea arabica L.)**

**Equipe**

<b>ALINE RANGEL SILVA ARAUJO</b>	<b>UNICAMP</b>
<b>ANA LÚCIA TASCA GOIS RUIZ</b>	<b>UNICAMP</b>
<b>MARY ANN FOGLIO</b>	<b>UNICAMP</b>
<b>JOÃO ERNESTO DE CARVALHO</b>	<b>UNICAMP</b>
<b>DAYANA JOICY SANTANA</b>	<b>UNICAMP</b>
<b>KAIO EDUARDO BUGLIO</b>	<b>UFSCAR</b>
<b>CAMILA SIMÕES SOARES</b>	<b>UNICAMP</b>

Data do Cadastro: **20/10/2019 12:17:56**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:07** de **03/12/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**